



HAL
open science

Encéphalites auto-immunes associées aux anticorps anti-LGI1 : étude physiopathologique des crises d'épilepsie chez les patients et dans un nouveau modèle animal

Paul Baudin

► **To cite this version:**

Paul Baudin. Encéphalites auto-immunes associées aux anticorps anti-LGI1 : étude physiopathologique des crises d'épilepsie chez les patients et dans un nouveau modèle animal. Neurosciences. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS259 . tel-03650051

HAL Id: tel-03650051

<https://theses.hal.science/tel-03650051>

Submitted on 24 Apr 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

École doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

Présentée par

Paul BAUDIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité Neurosciences

Encéphalites auto-immunes associées aux anticorps anti-LGI1

*Étude physiopathologique des crises d'épilepsie chez les
patients et dans un nouveau modèle animal.*

Soutenue publiquement le 22 Octobre 2021, devant un jury composé de :

Dr. Valérie CREPEL	Rapportrice
Pr. Sylvain RHEIMS	Rapporteur
Pr. Jérôme HONNORAT	Examineur
Pr. Marianne RENNER	Examinatrice
Pr. Stéphane CHARPIER	Examineur
Pr. Vincent NAVARRO	Directeur de thèse

ABSTRACT

Epilepsy is a frequent disease affecting more than 50 million people worldwide, with various outcome and etiologies. Among them, autoimmune encephalitis (AIE) are serious diseases, which may cause severe neurological sequelae when the initiation of immunotherapy is delayed. In 2010, the leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1) protein was identified as the target of autoantibodies in a subgroup of AIE, that mainly causes seizures. Patients with AIE associated with anti-LGI1 antibodies display tonic-dystonic motor seizures (TDS), which are atypical, and pathognomonic of this disorder. They also present limbic seizures, which are common to other encephalitis. The mechanisms at the origin of these seizures are poorly understood. Several studies have shown a direct pathogenic role of anti-LGI1 antibodies, via an alteration in the expression and function of Kv1 channels and AMPA receptors. However, the link between these pathological disturbances and the epileptic seizures has never been demonstrated.

The main objective of my PhD work was to determine whether anti-LGI1 autoantibodies were responsible for epileptic seizures in patients and to investigate the underlying pathophysiological mechanisms. I thus conducted my study along 3 axes.

1/ I first studied the role of anti-LGI1 autoantibodies in the genesis of seizures, via *in vivo* injections in rodents. I purified the antibodies from the serum of LGI1 patients and control patients. Then I performed acute or chronic injections of pure CSF or purified serum IgG into mice and rats brains. The electrophysiological recordings with surface EEG electrodes or intracranial electrodes at the injection site, did not show any epileptic-like activity.

2/ Given the absence of seizures induced by passive transfer of antibodies *in vivo*, which has since been confirmed by two other research teams, I decided to inhibit the Kv1 channels without using autoantibodies. Via *in vivo* injections of dendrotoxin-K (DTX), a specific inhibitor of Kv1.1, into the primary motor cortex of adult rats, I sought to indirectly reproduce the disturbances observed *in vitro* by anti-LGI1 antibodies. This approach did reproduce the pathognomonic TDS in rats. To validate this rodent TDS model, I studied a cohort of 12 patients who displayed TDS during EEG-EMG-video sessions. I found similar clinical and EEG-EMG features in patients and in the DTX rats' model. In addition, I showed that TDS in rats could be stopped by retigabine, an antiepileptic drug that potentiates voltage-dependent K⁺ channels.

3/ The new DTX-induced TDS model allowed to explore the neural mechanisms underlying TDS. I performed extracellular and intracellular neuronal recordings *in vivo* in sedated rats after injection of DTX. I described the neuronal activities associated with TDS, and I proposed a neural scenario that could explain the high frequency of these seizures and their regularity.

My thesis work showed the central role of Kv1.1 disruption in the emergence of TDS and suggests that the potentiation of neuronal K⁺ currents could be an effective strategy to improve the treatment of seizures in the early management of anti-LGI1 AIE. The new *in vivo* animal model could be used in future research to better characterize ictogenesis mechanisms in this frequent AIE.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury, les professeurs Sylvain Rheims, Marianne Renner, Jérôme Honnorat et Valérie Crépel, qui ont accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse, et qui m'honorent de leur présence. Je remercie les professeurs Jérôme Honnorat et Antoine Depaulis d'avoir pris le temps de participer à mes comités de suivi de thèse, et qui m'ont donné de très bons conseils scientifiques et méthodologiques pour m'aider à orienter mon travail.

Un grand merci à Vincent Navarro, qui m'a ouvert les portes dès le Master 2, à la fois au laboratoire mais aussi dans son service d'épileptologie. Merci pour ta confiance, et pour m'avoir fait découvrir ta passion pour la neurologie. Merci pour tes nombreux conseils ainsi que tes encouragements qui m'ont beaucoup aidé. Merci de m'avoir toujours motivé, et de m'avoir permis de conserver un lien avec la médecine pendant toutes ces années.

Je tiens également à remercier Stéphane Charpier et Séverine Mahon. Vous avez été d'une aide indispensable au moment le plus dur de ma thèse. Merci pour votre implication dans mes recherches, et pour la façon dont vous avez su partager avec moi vos réflexions et vos connaissances scientifiques. Je n'aurais pas pu développer ce projet transversal sans vos connaissances et votre aide inestimables.

Je me rends compte de la chance que j'ai eu de travailler dans cette équipe de recherche, dynamique et pleine de bonne humeur, mais aussi aux profils variés et où on trouve toujours quelqu'un pour nous aider. Ces années passées à travailler à vos côtés sont pour moi de très belles années.

Un merci tout particulier à Aurélie Hanin. Chacune des étapes de la thèse, nous les avons vécues ensemble. Merci d'avoir été mon binôme pendant ces cinq années. Tu as été un soutien permanent du début jusqu'à la fin, tant d'un point de vu scientifique qu'humain.

Je remercie Antoine Carton-Leclercq et Manon Boyer, pour tous ces bons moments passés. Votre présence constante et votre amitié m'a été précieuse tout au long de ma thèse. Les nuits à chasser les neurones avec vous vont me manquer.

Je remercie Stephen Whitmarsh, qui a été mon mentor pour les analyses informatiques et la programmation. Je te remercie d'avoir été aussi généreux sur le temps passé à me former et sur le partage de tes scripts et de tes connaissances. Je remercie Katia Lehongre qui m'a aidé à y voir clair entre tous les formats de fichiers entre les nombreuses machines d'acquisition de l'hôpital et du laboratoire. Je remercie Louis Cousyn, qui m'a aidé à me plonger dans le monde des encéphalites, et à m'en sortir face à la tonne de dossiers de patients. Je remercie Sarah Lecas, toujours présente pour nous trouver des neurones magnifiques. Je remercie Delphine Roussel pour le travail d'équipe qu'on a su développer ensemble. Merci pour ta présence constante lors des expériences les plus compliquées. Je remercie aussi Mario, Sandrine, Valerio, Virginie, Bertrand, pour votre sympathie, ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Merci à Sofia et Pierre, le binôme d'enfer, derniers arrivés, qui prennent la succession du poste d'électrophysique que j'ai usé pendant 4 ans. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite dans vos recherches.

Je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué à mon goût pour la recherche et qui m'ont fait arriver jusqu'ici. Merci à Tristan Lepage, qui a été un soutien moral et scientifique sans faille pour la préparation du concours de l'École de l'INSERM, sans qui je n'aurais jamais

fait ma thèse. Merci à Ali-Kémal Aydin également, qui a grandement participé à ma motivation à me lancer dans la thèse. Merci pour ton soutien, pour toutes ces discussions scientifiques mais aussi politiques, et échiquéennes, passionnantes. Je remercie François Santinon, et Matthieu Ribon qui ont inauguré mon entrée dans la recherche et qui ont participé à mon envie de continuer. Merci Matthieu pour toutes les pauses cafés (et toutes les pommes).

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille. Vous m'avez apporté un équilibre indispensable, avec votre affection, votre présence, et vos encouragements. En particulier, un grand merci à mon frère, Alexis, pour son aide en toutes circonstances.

Et je finirai par adresser un merci spécial, du fond du cœur, pour toi, Eva. Merci pour ta patience, ton optimisme, et ton soutien infallible.

SOMMAIRE

ABSTRACT	I
REMERCIEMENTS	III
SOMMAIRE	1
Liste des abréviations	5
I. INTRODUCTION	7
1 LES ÉPILEPSIES	9
1.1 Définitions.....	9
1.1.1 Épilepsie	9
1.1.2 Crises d'épilepsie	11
1.2 Les différentes épilepsies : classification de l'ILAE	12
1.2.1 Le type de crises	13
1.2.2 Le type d'épilepsie.....	13
1.2.3 Le syndrome épileptique.....	14
1.2.4 Étiologies.....	14
1.2.5 Comorbidités	15
1.3 Anomalies électriques associées aux crises d'épilepsie.....	16
2 LES ENCÉPHALITES AUTO-IMMUNES.....	19
2.1 Définitions.....	19
2.2 Épidémiologie	21
2.3 Sémiologie générale.....	21
2.4 Classification des EAI.....	21
2.4.1 Identification des auto-anticorps.....	22
2.4.2 Antigènes extracellulaires.....	23
2.4.3 Antigènes intracellulaires	26
2.4.4 EAI séronégatives.....	26
2.5 Physiopathologie des auto-anticorps.....	27
2.5.1 Accès des anticorps au SNC	27
2.5.2 Modes d'action des auto-anticorps	29
2.6 Origine de l'auto-immunité.....	31
2.6.1 Tumeurs	31
2.6.2 Infections	31
2.6.3 Prédisposition génétique	32
2.6.4 Inconnue	33
2.7 Encéphalites auto-immunes et épilepsies.....	33
2.7.1 Crises symptomatiques aiguës secondaires à une EAI.....	34
2.7.2 Épilepsies associées à une auto-immunité	34

2.8	<i>EAI associées aux anticorps anti-LGII</i>	35
2.8.1	Caractéristiques démographiques	36
2.8.2	Phénotypes cliniques	36
2.8.3	Histoire de la maladie	42
2.8.4	Résultats biologiques	43
2.8.5	Traitements	44
3	LGII : UNE PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LE DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL ET LE FONCTIONNEMENT DES NEURONES	45
3.1	<i>Structure et expression de LGII, et partenaires moléculaires</i>	46
3.1.1	Structures du gène et de la protéine LGII	46
3.1.2	Expression de LGII	47
3.1.3	Partenaires moléculaires de LGII	49
3.2	<i>Fonctions de LGII</i>	54
3.2.1	Rôles de LGII au cours du développement	54
3.2.2	Rôles de LGII dans le contrôle de canaux ioniques neuronaux	57
3.3	<i>Maladies associées à LGII</i>	61
3.3.1	Maladies génétiques associées à LGII	62
3.3.2	Maladies auto-immunes associées à LGII	65
4	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	69
II.	RÉSULTATS	71
5	L'INJECTION D'ANTICORPS ANTI-LGII DANS LE CORTEX M1 OU L'HIPPOCAMPE DE RONGEUR NE PERMET PAS LE DÉCLENCHEMENT DE CRISES	73
5.1	<i>Introduction</i>	73
5.2	<i>Matériels et méthodes</i>	74
5.2.1	Animaux	74
5.2.2	Patients	74
5.2.3	Purification des IgG de sérum de patients.....	75
5.2.4	Injections aiguë et enregistrements <i>in vivo</i> multi-échelles chez le rat sédaté	76
5.2.5	Injection chronique et enregistrements EEG-vidéo de longue durée chez l'animal vigile	78
5.2.6	Analyse des signaux électrophysiologiques.....	79
5.3	<i>Résultats</i>	80
5.3.1	Injections aiguës de LCR et d'IgG purifiées de sérum	80
5.3.2	Injections chroniques de LCR et d'IgG purifiées de sérum	82
6	L'INHIBITION DE Kv1.1 DANS LE CORTEX MOTEUR DE RAT REPRODUIT LES CRISES TONIQUES-DYSTONIQUES DES EAI À ANTICORPS ANTI-LGII	85
6.1	<i>Contexte scientifique</i>	85
6.2	<i>Démarche expérimentale</i>	86
6.3	<i>Principaux résultats</i>	87
	<i>Article</i>	89

III. DISCUSSION	139
7 TRANSFERT PASSIF IN VIVO D'AUTO-ANTICORPS HUMAINS.....	141
7.1 <i>Un modèle animal avec phénotype atténué par rapport aux patients</i>	<i>142</i>
7.2 <i>Méthodes d'injection et diffusion des IgG.....</i>	<i>143</i>
8 PHYSIOPATHOLOGIE DES TDS	145
8.1 <i>Un nouveau modèle in vivo de TDS</i>	<i>146</i>
8.2 <i>Rôle de l'inhibition de Kv1.1 dans la genèse des TDS.....</i>	<i>148</i>
8.3 <i>Fréquence élevée et régularité des TDS</i>	<i>150</i>
9 LIMITES DE LA MODÉLISATION PAR LA DTX DES EAI À ANTICORPS ANTI-LGI1.....	153
10 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	155
IV. ANNEXES	159
A. MOLECULAR STRUCTURE, PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS AND DISRUPTION-RELATED DISEASES OF LGI1 PROTEIN	161
B. DISTURBANCES OF BRAIN CHOLESTEROL METABOLISM: A NEW EXCITOTOXIC PROCESS ASSOCIATED WITH STATUS EPILEPTICUS	201
V. RÉFÉRENCES.....	221
RÉSUMÉ	242

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADLTE *autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy* (épilepsie autosomique dominante du lobe temporal latéral)

BHE barrière hémato-encéphalique

CA1, CA3 Corne d'Ammon 1, 3

EAI encéphalite auto-immune

ECoG électrocorticogramme

EEG électroencéphalogramme

EMG électromyogramme

FBDS *faciobrachial dystonic seizures* (crises dystoniques brachio-faciales)

FLAIR *fluid attenuated inversion recovery*

G_m conductance membranaire

HEK *human embryonic kidney*

ILAE *International League Against Epilepsy* (ligue internationale contre l'épilepsie)

IRM imagerie par résonance magnétique

KI knock-in

KO knock-out

LCR liquide céphalorachidien

LFP *local field potential* (potentiel de champ local)

M1 cortex moteur primaire

PBS phosphate-buffered saline (tampon phosphate salin)

PtA cortex pariétal associatif

R_m résistance membranaire

SNC système nerveux central

SNP système nerveux périphérique

TDS *tonic-dystonic seizures* (crise tonique-dystonique)

TDW *tonic-dystonic wave* (onde tonique-dystonique)

TEP au 18F-FDG tomographie par émission de positons au 18F-fluoro-désoxy-glucose

V_m potentiel membranaire

NOMS DE MOLÉCULES :

ADAM11, ADAM22, ADAM23 *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11, 22, 23*

AMPA-R récepteurs à l'α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate

AQP4 aquaporine-4

CASK *calcium/calmodulin dependent serine protein kinase*

CASPR2 *contactin-associated protein-like 2*

DTX dendrotoxine

EPTP *epitempin*

GABA-b-R récepteur métabotrope à l'acide gamma-aminobutyrique

HLA *human leucocyte antigen*

IgG, IgA, IgM immunoglobuline G, A, M

KCNA1, KCNA2 *K⁺ voltage-gated channel subfamily A member 1, 2*

LGI1 *leucine-rich glioma-inactivated 1*

LRR *leucine-rich repeat*

MAGUK *membrane-associated guanylate kinase*

NgR1 *nogo receptor 1*

NMDA-R récepteurs à l'acide N-méthyl-D-aspartique

PSD93, PSD95 *postsynaptic density protein 93, 95*

SAP97 *synapse-associated protein 97*

VGKC *voltage-gated K⁺ channel (canal K⁺ dépendant du voltage)*

I. INTRODUCTION

CHAPITRE 1

LES ÉPILEPSIES

L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde (Ngugi et al. 2010), ce qui en fait selon l'OMS l'une des affections neurologiques les plus fréquentes. La prévalence de l'épilepsie est de 6,4 cas pour 1 000 individus et son incidence est de 67,8 cas pour 100 000 individus par an (Fiest et al. 2017). La prévalence et l'incidence sont plus élevées dans les pays où les revenus sont les plus faibles (Fiest et al. 2017). Ce résultat pourrait en partie résulter d'une fréquence plus élevée d'accidents de la route, de traumatismes à la naissance et de troubles neurologiques causés par des infections (Singh et Trevick 2016). L'incidence de l'épilepsie est plus élevée dans les âges extrêmes de la vie, avant 10 ans et après 60 ans (Fiest et al. 2017).

1.1 Définitions

Des définitions de l'épilepsie et des crises d'épilepsie ont été établies par la Ligue Internationale Contre l'Épilepsie (ILAE) et le Bureau International pour l'Épilepsie, et elles font aujourd'hui consensus (Fisher et al. 2005, 2014).

1.1.1 Épilepsie

L'épilepsie est une maladie neurologique définie par la prédisposition durable à générer des crises d'épilepsie, ainsi que par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques

et sociales qui en découlent (Fisher et al. 2005). Les causes menant à l'épilepsie sont nombreuses, et les symptômes sont très hétérogènes. Le diagnostic était initialement établi quand le patient avait subi deux crises d'épilepsies non provoquées, à plus de 24 h d'intervalle (Fisher et al. 2005). Cette définition a été modifiée en 2014 (Fisher et al. 2014), indiquant que l'épilepsie est diagnostiquée en cas de :

- survenue d'au moins deux crises non provoquées à plus de 24 h d'intervalle,
- survenue d'une crise non provoquée, associée à une probabilité de survenue d'autres crises d'au moins 60% (risque général de récurrence observé après deux crises non-provoquées) dans les 10 prochaines années,
- diagnostic d'un syndrome épileptique.

Il y a donc moins de patients épileptiques que de patients ayant déjà eu une ou plusieurs crises d'épilepsie. En effet, il y a de nombreux cas de crises isolées, causés par un événement ponctuel tel qu'un traumatisme crânien ou une intoxication (Leach et al. 2012), soulignant l'importance du caractère spontané des crises dans la définition de l'épilepsie. De même, l'écart de plus de 24 h entre deux crises est important, afin que le cerveau ait pu retrouver un état normal. L'actualisation de 2014 permet aussi au médecin de mettre en place des traitements après une seule crise non provoquée, s'il y a un risque de récurrence élevé. La définition de 2014 instaure le concept de « résolution de l'épilepsie », qui définit les critères pour déterminer qu'un patient n'est plus atteint d'épilepsie. L'épilepsie est considérée comme étant résolue pour (1) les personnes qui avaient un syndrome épileptique dépendant de l'âge et qui ont dépassé l'âge maximal correspondant, et (2) pour les personnes qui sont restées sans crise depuis au moins 10 ans, dont 5 ans sans prise d'antiépileptiques (Fisher et al. 2014).

L'épilepsie n'est pas spécifique aux humains et a été décrite, de manière spontanée, chez des animaux de compagnie (Delk 2012; Potschka et al. 2015). De plus, une épilepsie spontanée, ou déclenchée dans des buts de recherche scientifique, a déjà été décrite à la fois chez l'ensemble des vertébrés (mammifères (Potschka et al. 2015), oiseaux (Delk 2012), poissons (Cho et al. 2017), batraciens (Pratt et Khakhalin 2013), reptiles (Gómez et al. 1990)), mais aussi chez les nématodes (Locke et al. 2009) et les mouches (Saras et al. 2017). Il semble ainsi que toute espèce pourvue d'un système nerveux central puisse être en capacité de développer de l'épilepsie.

L'épilepsie correspond à un symptôme commun à différentes maladies, et présente une grande hétérogénéité entre les patients. Par conséquent on parle souvent *des* épilepsies, au pluriel, plutôt que *de l'épilepsie*, mais les deux termes peuvent être employés.

1.1.2 Crises d'épilepsie

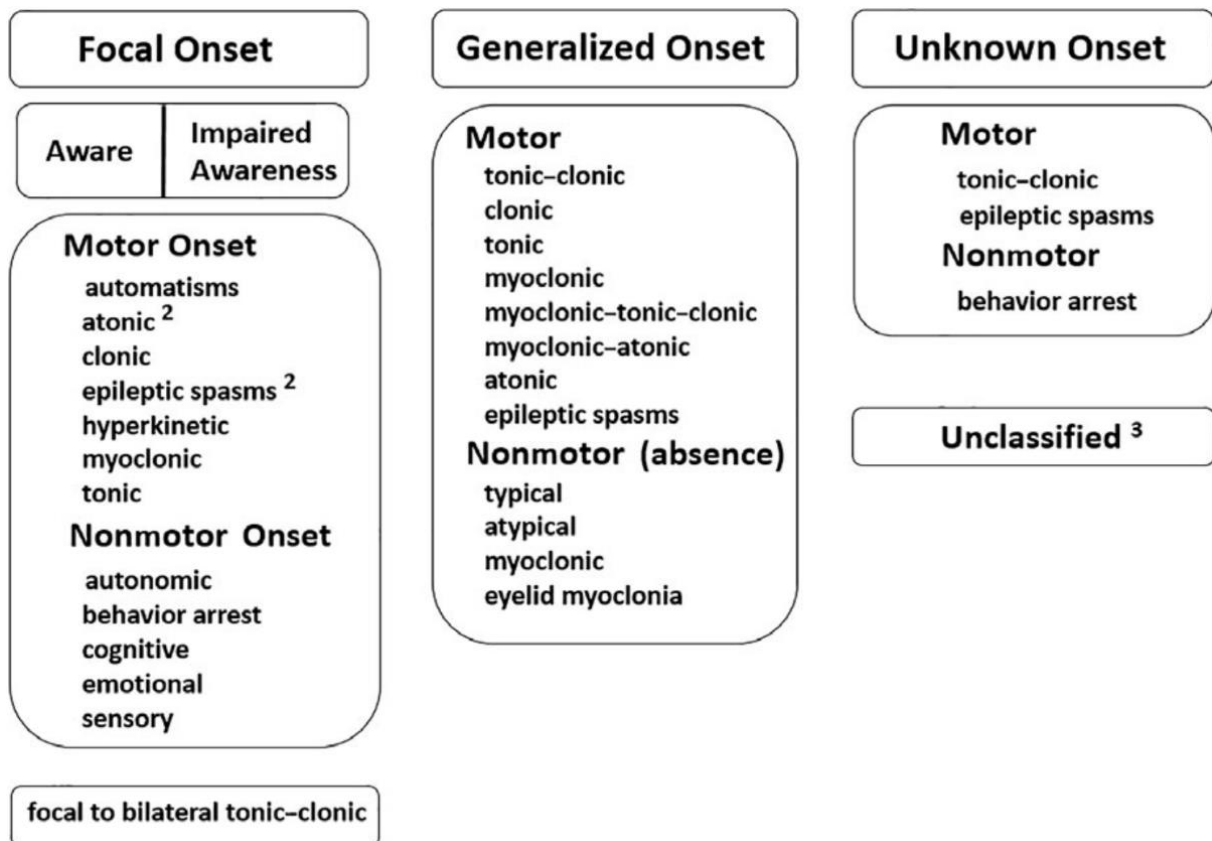


Figure 1. Classification des crises d'épilepsie selon l'ILAE (Fisher et al. 2017)

Une crise d'épilepsie correspond à l'ensemble des signes ou symptômes causés par une activité neuronale anormalement élevée ou anormalement synchronisée dans le cerveau (Fisher et al. 2005). Une crise est délimitée dans le temps. Si la crise dure plus de 5-15 minutes (durée variable selon le type de crise), ou bien si plusieurs crises s'enchaînent sans récupération complète de la conscience du patient, on parle d'état de mal épileptique (Brophy et al. 2012).

Il y a beaucoup d'hétérogénéité dans la sémiologie des crises entre les patients, notamment due à la différence de localisation des foyers épileptiques et aux différentes voies de propagation des crises. Néanmoins, au sein d'un même patient, le foyer et la propagation

sont le plus souvent similaires voire identiques d'une crise à l'autre (Berg et al. 2010). La liste des différents types de crises selon l'ILAE est présentée dans la figure 1.

Quand l'ensemble du cerveau, notamment le cortex des deux hémisphères, est impliqué dans la génération de la crise, on parle de crise généralisée. Quand les crises commencent de manière localisée, on parle de crise focale. Ces crises sont déclenchées au sein d'un foyer épileptique et peuvent se diffuser dans une région plus grande, avec ou sans généralisation (Fisher et al. 2017).

1.2 Les différentes épilepsies : classification de l'ILAE

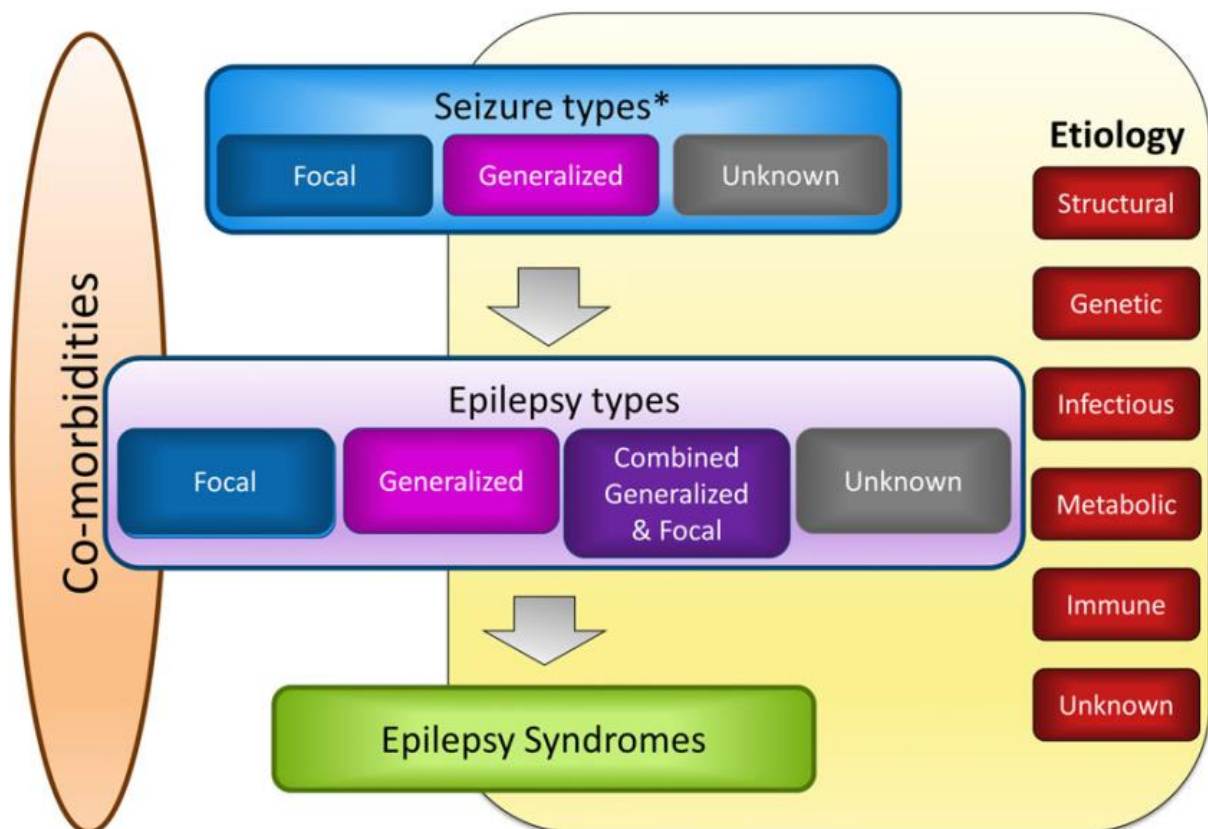


Figure 2. Organisation de la classification des épilepsies, selon l'ILAE (Scheffer et al. 2017)

Les épilepsies sont associées à une grande diversité de causes et de symptômes. Une classification est donc nécessaire pour aider au diagnostic et mieux identifier les facteurs pouvant déclencher les crises, influencer le pronostic, ou permettre de guider la stratégie thérapeutique. La classification renseigne également sur les risques de comorbidités,

notamment les difficultés d'apprentissage, la déficience intellectuelle, et le risque de mortalité tel que la mort soudaine inattendue dans l'épilepsie (*Sudden Unexpected Death in Epilepsy*, SUDEP). Elle permet aussi de séparer les patients en groupes homogènes, utiles pour la recherche fondamentale et la recherche clinique (Scheffer et al. 2017).

L'ILAE a proposé une classification des épilepsies, qui a évolué à plusieurs reprises depuis le milieu du XX^{ème} siècle pour suivre les avancées scientifiques cliniques et fondamentales. Aujourd'hui, c'est la dernière version de la classification, qui date de 2017, qui fait consensus (Fig. 2) (Fisher et al. 2017; Scheffer et al. 2017).

1.2.1 Le type de crises

La première étape de la classification repose sur l'identification du type de crises (Fig. 1 et 2). Cette classification suppose que le clinicien ait déjà posé un diagnostic de crise d'épilepsie, car elle n'est pas un algorithme pour distinguer les événements épileptiques des événements non épileptiques.

Les crises sont classées selon leur mode d'apparition : focale, généralisée et inconnue. Ainsi, une crise focale secondairement généralisée sera classée parmi les crises focales, et appelée « crise focale évoluant vers une crise bilatérale tonique-clonique » (« *focal to bilateral tonico-clonic seizure* »). Pour les crises focales, on précise, si cela est possible, si l'individu a une conscience altérée ou non pendant la crise.

1.2.2 Le type d'épilepsie

Les différents types d'épilepsie sont définis en fonction du type de crises que présente le patient. Il y a les épilepsies focales, les épilepsies généralisées, les épilepsies combinées généralisées et focales, et les épilepsies « inconnues » où le clinicien n'est pas capable de déterminer si le type d'épilepsie est focal ou généralisé en raison de l'insuffisance des informations disponibles (Fig. 2). Le groupe d'épilepsies combinées généralisées et focales existe, car il y a des patients qui ont à la fois des crises généralisées et des crises focales.

1.2.3 Le syndrome épileptique

Les épilepsies sont aussi classées en fonction des syndromes qu'elles induisent. Un syndrome épileptique est une entité clinique distincte, caractérisée par des symptômes cliniques et électrophysiologiques, et par une homogénéité d'étiologie, d'évolution, de pronostic et de réponse aux traitements. Ainsi, l'identification d'un syndrome épileptique, quand cela est possible, permet de faciliter la prise en charge. Il existe de nombreux syndromes bien décrits, tels que l'épilepsie-absence chez l'enfant, le syndrome de West et le syndrome de Dravet. La mise en évidence d'un syndrome épileptique n'est pas toujours possible, et parfois seule la classification des crises et des épilepsies peut être faite.

1.2.4 Étiologies

L'étiologie fait référence à la cause sous-jacente de l'épilepsie. Elle est primordiale car, dans certains cas, le traitement de la cause est bien plus efficace que le traitement de l'épilepsie seule. Elle doit être prise en compte à chaque étape de la classification. L'ILAE a défini 6 catégories d'étiologies (Fig. 2), qui ne sont pas hiérarchisées, ni exclusives dans la mesure où plusieurs étiologies peuvent se cumuler :

- *Étiologie structurelle* : Une anomalie structurelle augmente fortement le risque de développer une épilepsie. Elle peut être mise en évidence par l'imagerie cérébrale, ou par des anomalies sur l'EEG. Les anomalies structurelles peuvent être acquises, par exemple à la suite d'un accident vasculaire cérébral, d'un traumatisme ou d'une infection. Elles peuvent aussi être d'origine génétique, avec des mutations causant des malformations du développement cortical.
- *Étiologie génétique* : Les épilepsies génétiques résultent directement d'une mutation génétique connue ou présumée. La mutation peut être héritée ou *de novo*.
- *Étiologie infectieuse* : Il s'agit de la cause d'épilepsie la plus répandue dans le monde (Vezzani et al. 2016). Les épilepsies d'origine infectieuse sont directement causées par une infection connue (encéphalite, méningite), dans laquelle les crises sont un symptôme central. Ces infections peuvent entraîner secondairement des lésions structurelles et conduire à un développement post-infectieux de l'épilepsie.
- *Étiologie métabolique* : Une épilepsie métabolique est une épilepsie qui résulte directement d'un trouble métabolique connu ou présumé. Les troubles métaboliques font

référence à des changements biochimiques systémiques, tels que la porphyrie, l'urémie, ou les aminoacidopathies. Les troubles métaboliques sont la plupart du temps associés à un défaut génétique, mais ils peuvent aussi être acquis, par exemple par une carence ou une intoxication.

- *Étiologie immune* : Les épilepsies de cause dysimmunitaire résultent directement d'un trouble immunitaire neurologique, mis en évidence par la présence d'auto-anticorps dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) ciblant des antigènes cérébraux, ou par une inflammation du SNC sans infection. Elles sont détaillées dans la partie 2 de cette introduction. Le terme d'épilepsie auto-immune a été récemment remis en cause et modifié par l'ILAE (Steriade et al. 2020), qui distingue désormais les crises symptomatiques aiguës secondaires à une encéphalite auto-immune, et les épilepsies associées à une auto-immunité (cf. paragraphe 2.7).
- *Étiologie inconnue* : Cette étiologie rassemble toutes les épilepsies dont la cause n'est pas encore connue, ce qui correspond à au moins un tiers des épilepsies. Dans cette catégorie, il n'est pas possible de poser un diagnostic spécifique en dehors de la sémiologie électroclinique. L'absence de cause retrouvée dépend en partie des possibilités d'examen complémentaires possibles pour le patient, qui varient en fonction des centres de santé au sein d'un pays, mais aussi entre les pays.

1.2.5 Comorbidités

De nombreuses comorbidités peuvent accompagner l'épilepsie, et ont un impact très important sur la vie des patients. Comme l'étiologie, il est important que la présence de comorbidités soit prise en compte à chaque étape de la classification (Fig. 2), pour permettre une identification précoce, un diagnostic et une prise en charge appropriés. Les comorbidités peuvent être par exemple des problèmes d'apprentissage, des problèmes psychologiques ou des problèmes comportementaux, et sont de gravité variable. Dans les épilepsies les plus sévères, de graves comorbidités peuvent être observées, comme par exemple des déficits moteurs ou des déficits de mémoire. Des troubles psychiatriques, notamment anxiété et dépression, sont également souvent associés.

1.3 Anomalies électriques associées aux crises d'épilepsie

Les signaux EEG, qui sont générés par les potentiels post-synaptiques neuronaux corticaux, permettent une évaluation en temps réel de l'activité cérébrale. L'analyse de l'EEG, en particulier des crises et des décharges épileptiformes intercritiques, joue un rôle crucial dans le diagnostic de l'épilepsie (Scheffer et al. 2017).

Les crises sont observables sur l'EEG, car elles induisent des signaux électriques anormaux provenant des régions cérébrales affectées. Ces signaux correspondent à des oscillations dont la fréquence ou l'amplitude sont différentes de l'activité normale (Fig. 3A-B). Les patients peuvent également présenter des anomalies à l'EEG entre les crises, appelées décharges épileptiformes intercritiques (Fig. 3C). Il peut s'agir de pointes, ou d'oscillations à haute ou très haute fréquence. Les décharges épileptiformes intercritiques ne sont pas suffisamment longues et organisées pour être considérées comme des crises. Elles sont parfois la seule anomalie rencontrée sur l'EEG de routine (Chen et Koubeissi 2019).

La localisation, la caractérisation fréquentielle et l'amplitude des oscillations paroxystiques sont importants pour l'identification des syndromes, des étiologies, et pour classer les crises (Scheffer et al. 2017). De plus, l'évolution des tracés EEG intercritiques et critiques permettent d'indiquer une amélioration ou une aggravation de la maladie. Dans le cas d'une épilepsie généralisée, le patient présente généralement une décharge de pointes-ondes généralisées sur l'EEG (Fig. 3B). Dans le cas d'une épilepsie focale, la localisation des anomalies intercritiques ou de la crise sur l'EEG permet de déterminer les régions cérébrales affectées, et sont donc utiles au diagnostic (Fig. 3A). De plus, certaines crises, dites infracliniques, ne sont visibles qu'à l'EEG, et n'ont pas de traduction clinique. Afin de localiser avec précision la région initiatrice des crises chez les patients ayant une épilepsie focale résistante aux médicaments antiépileptiques, les patients peuvent bénéficier de l'implantation d'électrodes intracérébrales. L'objectif est de réséquer, par une chirurgie, la région localisée (Kalamangalam et Tandon 2016). Là encore, le signal électrique produit par les crises est utilisé pour diagnostiquer et traiter les patients.

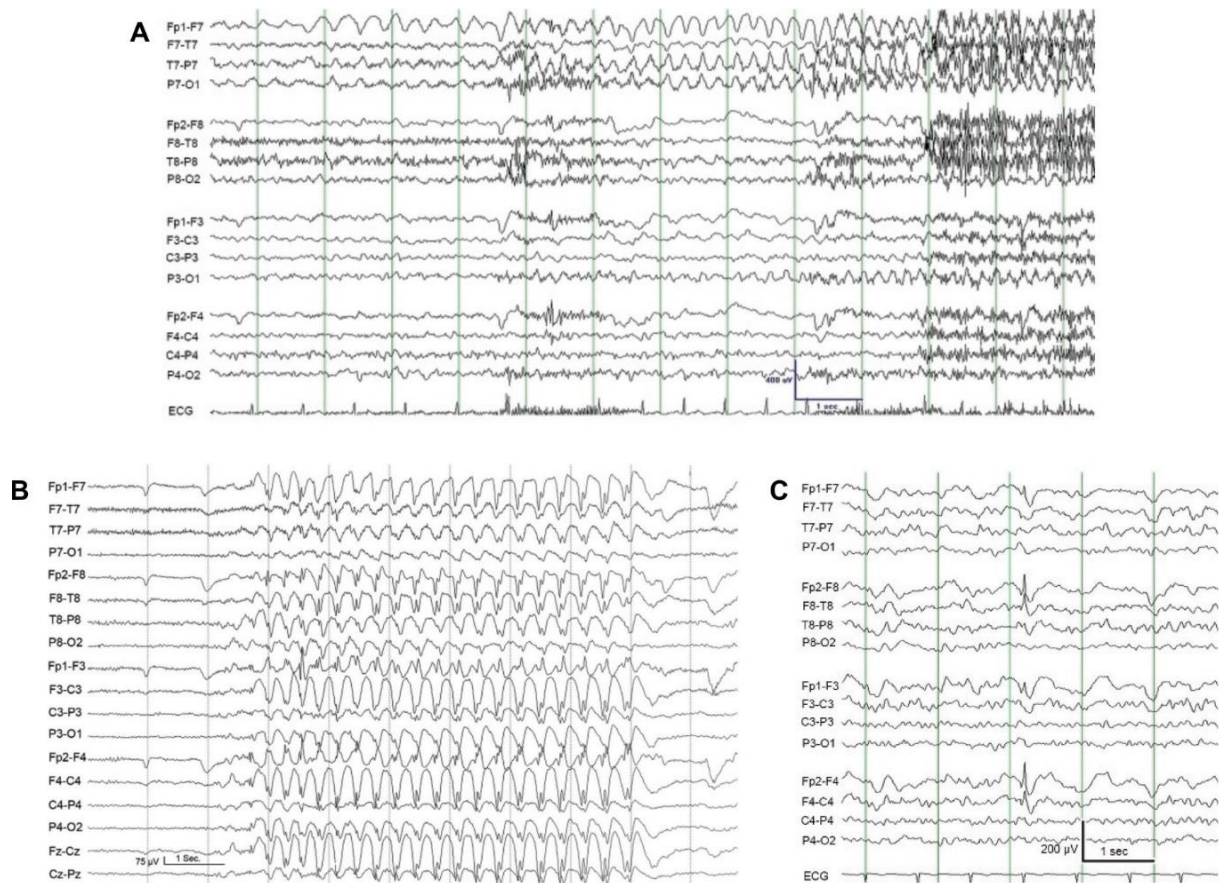


Figure 3. Exemples d'activités épileptiques visibles à l'EEG. Figure adaptée de (Chen et Koubeissi 2019). **(A)** Exemple d'un début de crise focale, chez un patient atteint d'épilepsie temporale gauche. Des décharges rythmiques delta, évoluant vers une activité thêta, sont visibles sur les électrodes temporales gauches. **(B)** Exemple de crise généralisée typique d'une épilepsie absence, montrant une décharge de pointes-ondes d'environ 3 Hz. **(C)** Exemple de décharge épileptiforme intercritique, avec une amplitude maximale sur la région fronto-polaire droite (Fp2).

CHAPITRE 2

LES ENCÉPHALITES AUTO-IMMUNES

Depuis 2017, la ligue internationale contre l'épilepsie a ajouté l'auto-immunité à la liste des étiologies contribuant à l'épilepsie (Scheffer et al. 2017). Les encéphalites auto-immunes (EAI) constituent un groupe de syndromes auto-immuns récemment décrit, responsable d'un nombre croissant d'épilepsies pharmacorésistantes jusque-là inexpliquées (Goodfellow et Mackay 2019). Une épilepsie est dite pharmacorésistante lorsque les crises d'épilepsie persistent malgré l'administration de deux molécules antiépileptiques adaptées, utilisées de manière appropriée (Kwan et al. 2009). Environ un tiers des patients atteints d'EAI développent des crises d'épilepsie, et cela explique environ 1% des épilepsies totales, soit plusieurs centaines de milliers de personnes dans le monde (Chen et al. 2021a).

2.1 Définitions

Le consortium international des encéphalites (*International Encephalitis Consortium*) a défini en 2013 des critères diagnostiques pour l'encéphalite et l'encéphalopathie (Venkatesan et al. 2013). Le critère principal repose sur la preuve d'une altération de l'état mental (diminution ou altération du niveau de conscience, léthargie, changement de comportement) d'une durée de plus de 24 heures sans autre cause identifiée. Il s'agit d'un critère obligatoire pour parler d'encéphalite ou d'encéphalopathie. A cela s'ajoutent des critères mineurs, dont deux sont

requis pour une encéphalite/encéphalopathie possible, et trois ou plus pour une encéphalite/encéphalopathie probable ou confirmée (Venkatesan et al. 2013) :

- une fièvre à au moins 38 °C dans les 72 heures avant ou après les troubles de l'état mental,
- des crises généralisées ou focales non attribuables à un trouble épileptique préexistant,
- de nouvelles apparitions de signes neurologiques focaux,
- une pléiocytose du LCR (numération leucocytaire $\geq 5/\text{mm}^3$),
- des anomalies du parenchyme cérébral à l'imagerie,
- des anomalies à l'EEG non imputables à d'autres causes.

Les encéphalites sont caractérisées par une inflammation cérébrale, qui peut être d'origine infectieuse, ou d'origine auto-immune. Les encéphalopathies quant à elles représentent des processus physiopathologiques différents. Elles ne sont pas forcément associées à une inflammation des tissus cérébraux, et peuvent être d'origine métabolique, toxique, ou associées à des agents infectieux. Il peut y avoir une superposition entre les encéphalites et les encéphalopathies d'étiologie infectieuse (Venkatesan et al. 2013).

Les EAI sont des encéphalites où une cause auto-immune a été identifiée, par la mise en évidence d'auto-anticorps ciblant un antigène neuronal ou glial, intracellulaire ou extracellulaire. Dans certains cas, le diagnostic d'EAI peut être posé en l'absence d'auto-anticorps retrouvés, si les résultats cliniques, biologiques (ponction lombaire) et radiologiques sont similaires à des tableaux typiques d'EAI. On parle alors d'EAI séronégative (cf. paragraphe 2.4.4).

La découverte d'auto-anticorps a permis de reclasser certaines maladies, et a ouvert d'importantes opportunités diagnostiques et thérapeutiques. La meilleure compréhension des rôles des anticorps dans les maladies neurologiques a été une révolution dans la prise en charge des EAI ces 10 dernières années. Plus de 40 auto-anticorps, ciblant des antigènes neuronaux ou gliaux, intracellulaires ou extracellulaires, sont connus aujourd'hui. Toutefois, il est probable que davantage d'auto-anticorps soient impliqués dans les maladies neurologiques, car tous les ans de nouveaux auto-antigènes sont découverts. Par exemple, des auto-anticorps dirigés contre la sous-unité 2 du récepteur kainate (GluK2) ont très récemment été identifiés chez 8 patients atteints d'EAI (Landa et al. 2021).

2.2 Épidémiologie

Il est difficile d'étudier l'incidence des EAI, étant donné que ce sont des maladies découvertes récemment, et que de nouveaux anticorps sont découverts régulièrement. Une étude épidémiologique de 2018 estimait l'incidence des EAI à 0.8 pour 100 000 habitants par an, et la prévalence à 13.7/100 000 habitants, aux États-Unis (Dubey et al. 2018a). Il y a une augmentation significative de l'incidence des EAI cette dernière décennie, due à une augmentation du nombre d'auto-anticorps connus, et à une amélioration des diagnostics (Dubey et al. 2018b).

2.3 Sémiologie générale

Les symptômes principaux des EAI sont des troubles comportementaux, des troubles moteurs, ainsi que des déficits de mémoire, des crises d'épilepsie, et des troubles végétatifs. Les manifestations neurologiques peuvent être aiguës ou subaiguës et se développent généralement en 6 semaines (Dutra et al. 2018). L'état de mal épileptique est la principale raison conduisant les patients atteints d'EAI à être hospitalisés en réanimation (Harutyunyan et al. 2017). Par rapport à la population générale, les patients atteints d'EAI ont une plus forte incidence de crises (Ong et al. 2014). Une méta analyse systématique récente des 42 articles avec des cohortes de plus de 50 patients atteints d'EAI et de crises d'épilepsie, a permis d'estimer la prévalence des crises au sein des EAI, qui était de 42% (Chen et al. 2021a).

2.4 Classification des EAI

Les EAI sont classées selon le type d'auto-anticorps retrouvé chez les patients, selon qu'ils ciblent des antigènes intracellulaires ou extracellulaires. Cela détermine des mécanismes physiopathologiques et des prises en charge différentes (Fig. 4). Dans certains cas, aucun anticorps n'est identifié, on parle alors d'EAI séronégative (Graus et al. 2016). Les différents auto-anticorps sont associés à des syndromes présentant des spécificités propres concernant les symptômes, le pronostic et le traitement. La recherche de l'antigène ciblé par les auto-anticorps est donc une étape clé du diagnostic et de la prise en charge des patients.

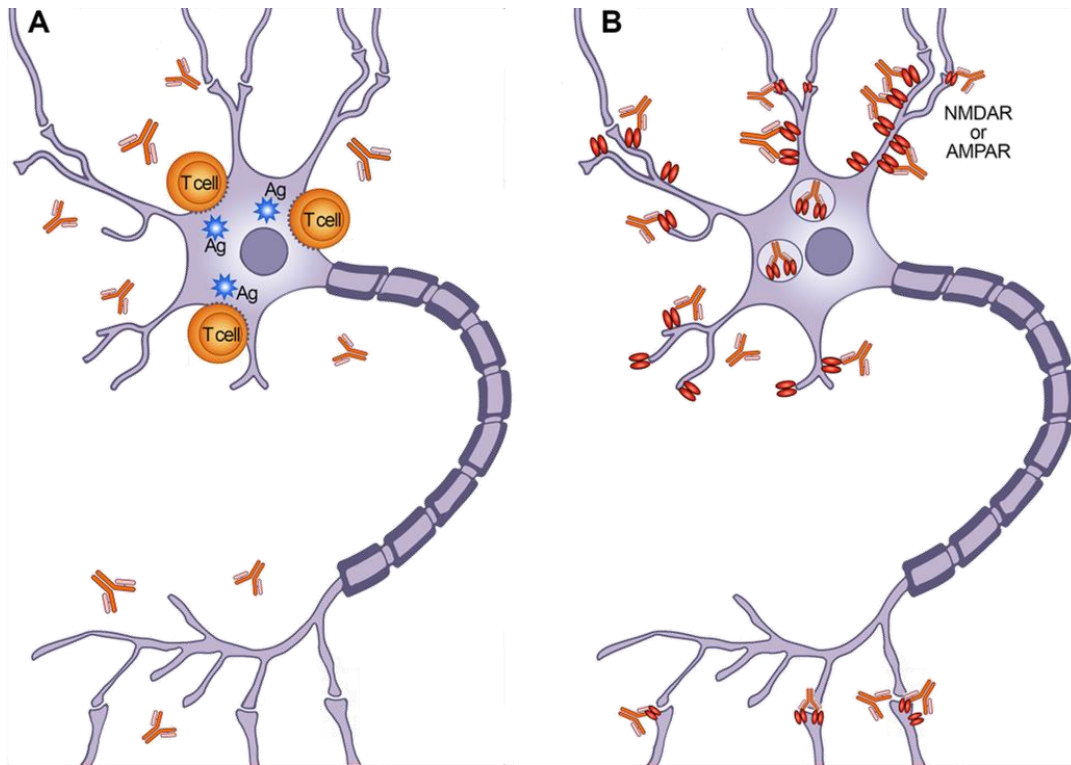


Figure 4. Différents mécanismes physiopathologiques associés aux auto-anticorps ciblant des antigènes intracellulaires ou extracellulaires (Dalmau et al. 2017). **(A)** Les auto-anticorps dirigés contre des protéines intracellulaires ne sont pas impliqués de manière directe dans la physiopathologie. Les études sur des biopsies ou des autopsies de ces patients montrent des infiltrats inflammatoires importants de cellules T cytotoxiques entourant les neurones, et provoquant une dégénérescence neuronale. Les patients répondent rarement aux immunothérapies visant à éliminer les anticorps ou les cellules productrices d'anticorps. **(B)** Les auto-anticorps dirigés contre les protéines extracellulaires ont un effet pathogène direct sur les protéines ciblées. Les patients répondent souvent bien aux immunothérapies.

2.4.1 Identification des auto-anticorps

Les autoanticorps associés aux EAI se lient à des épitopes antigéniques conformationnels. Pour cette raison, les tests utilisés pour identifier les auto-anticorps, dans le sérum ou le LCR de patients, sont basés sur l'utilisation de cellules, capables de produire l'antigène sous sa forme native, y compris les modifications post-traductionnelles (Prüss 2021; Ramanathan et al. 2021a).

La technique de référence pour la détection d'auto-anticorps utilise des cellules HEK293 transfectées pour exprimer l'antigène d'intérêt, puis fixées. Ces tests montrent une sensibilité élevée, pour des auto-antigènes prédéfinis. La liaison des auto-anticorps à l'antigène d'intérêt est visualisée avec des anticorps secondaires marqués par fluorescence (Fig. 5A).

En utilisant la même technique de marquage, des neurones vivants peuvent être incubés avec du sérum ou du LCR de patient, pour détecter des autoanticorps ciblant des antigènes extracellulaires. Le fait que les cellules ne soient pas perméabilisées, contrairement aux cellules HEK transfectées et fixées, permet de s'assurer que l'auto-anticorps cible un antigène extracellulaire (Fig. 5B).

Des tests sur des coupes de cerveau de rongeur ou de singe, permettent de détecter la liaison d'auto-anticorps à une grande variété d'épitopes sur les neurones, les cellules gliales et l'endothélium. En particulier, ces tests peuvent mettre en évidence une réaction auto-immune contre un antigène inconnu. Les patrons de marquage, et la localisation subcellulaire, sont typiques pour chaque antigène, et peuvent donc permettre d'identifier des antigènes connus, ou au contraire de suggérer que l'antigène ciblé n'a pour le moment jamais été décrit (Fig. 5C).

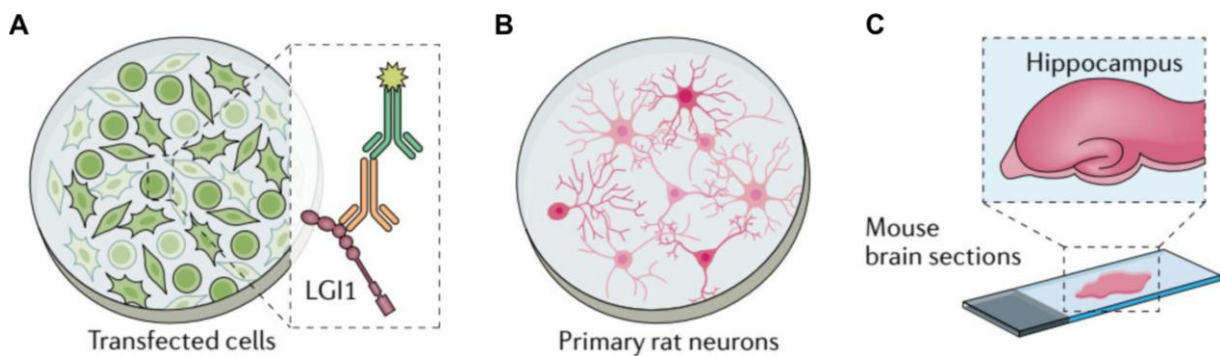


Figure 5. Diagnostic des auto-anticorps dans les maladies auto-immunes neurologiques. Figure adaptée de (Prüss 2021).

2.4.2 Antigènes extracellulaires

Les anticorps dirigés contre des antigènes extracellulaires définissent une classe d'EAI qui répond bien aux immunothérapies. Pour la plupart des patients, un diagnostic précoce et une mise en route rapide de l'immunothérapie donnent de bons résultats, avec un bon pronostic (Sell et al. 2021). Après l'immunothérapie, plus de 80% des patients présentant des crises deviennent libres de crises, là où les traitements antiépileptiques classiques n'arrêtaient les crises que chez environ 15% des patients (de Bruijn et al. 2019). Ces EAI peuvent également causer de la mort neuronale et des atrophies, par des mécanismes d'excitotoxicité associés aux crises et/ou par des processus inflammatoires (González-Burgos et al. 2009). Cela peut conduire à des lésions tissulaires entraînant des séquelles irréversibles, comme l'atrophie de l'hippocampe souvent observée dans les encéphalites à anticorps anti-LGI1 en cas de traitement

tardif (Ghimire et al. 2020). Le diagnostic et le traitement précoce est un enjeu majeur pour le pronostic des patients.

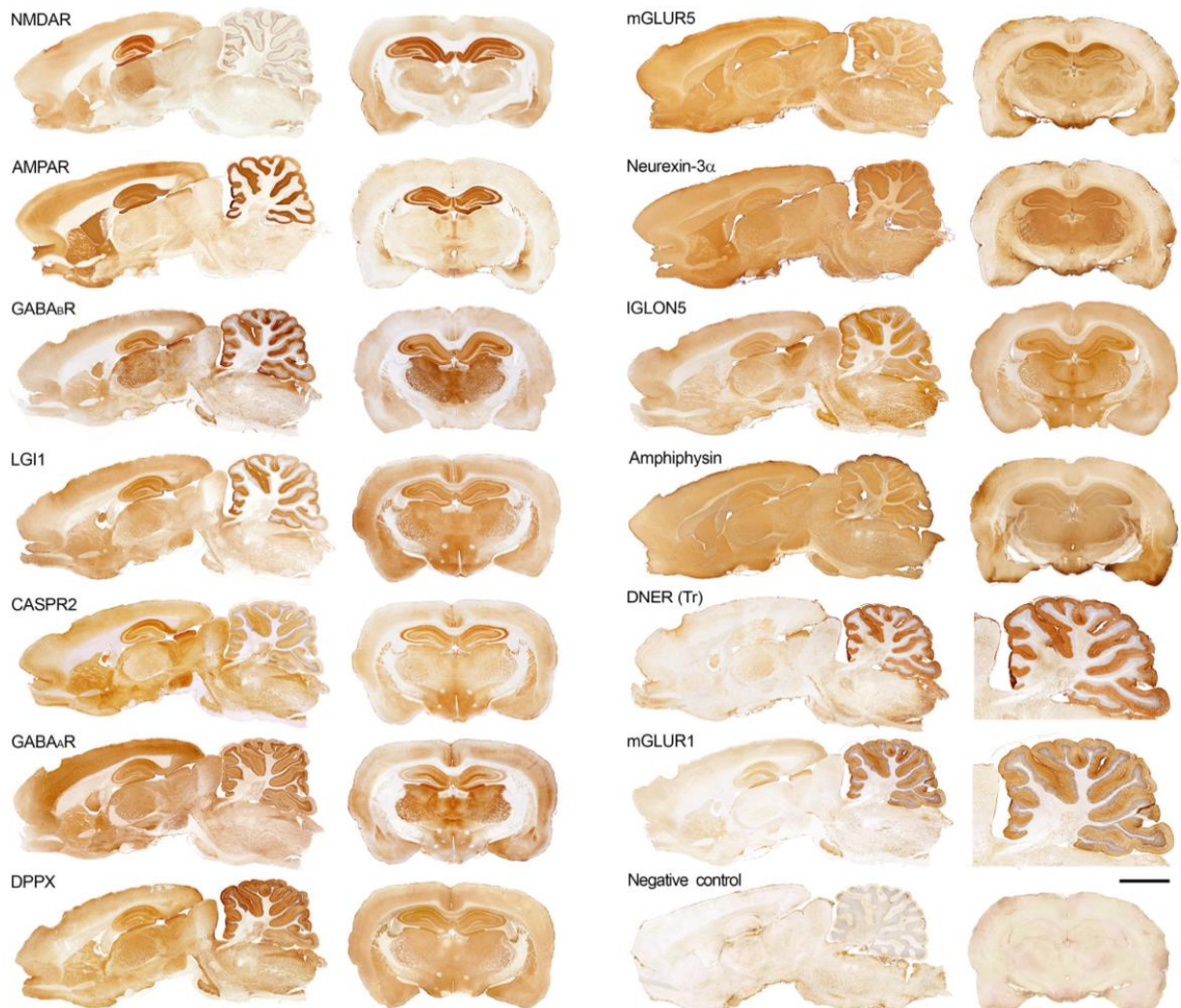


Figure 6. Immunomarcage de coupes sagittales et coronales de cerveau de rat avec des auto-anticorps de patients ciblant des antigènes extracellulaires (Dalmau et al. 2017). Barre horizontale = 2 mm. La liste d'antigènes extracellulaires n'est pas exhaustive.

Les anticorps ciblant des antigènes extracellulaires montrent un marquage typique du neuropile du cerveau de rat, sans marquage des corps cellulaires (Fig. 6, Fig. 7A, Fig. 7C). L'accessibilité des anticorps circulants à leur cible *in vivo* (Fig. 7E) et la bonne réponse aux immunothérapies, qui suppriment les anticorps ou les cellules produisant des anticorps, suggère un rôle pathogène direct des anticorps. Cela a été confirmé par des modèles *in vivo* et *in vitro* pour de nombreuses EAI, telles que les EAI associées à des anticorps ciblant les récepteurs AMPA (AMPA-R) (Peng et al. 2015), les récepteurs NMDA (NMDAR-R), (Planagumà et al. 2015), l'amphiphysine (Werner et al. 2016), la protéine LGI1 (Petit-Pedrol et al. 2018;

Ramberger et al. 2020), la protéine CASPR2 (Saint-Martin et al. 2019), ou les récepteurs kainate (Landa et al. 2021). Ces études montrent que les anticorps perturbent de manière directe ou indirecte des canaux ioniques neuronaux, et donc l'activité neuronale. Ce groupe d'EAI est donc médié par une auto-immunité humorale.

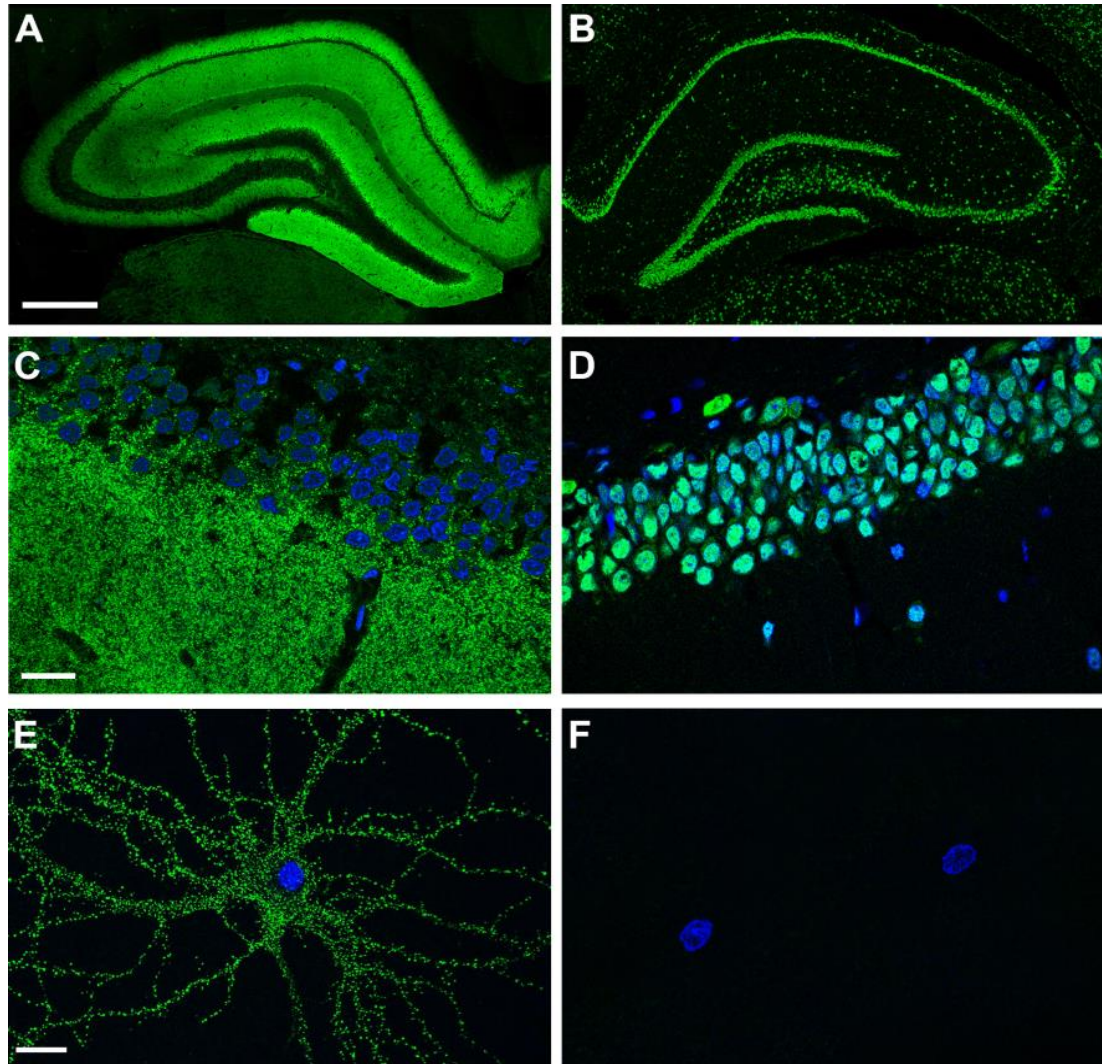


Figure 7. Comparaison de la réactivité cérébrale et neuronale des anticorps dirigés contre un antigène de surface ou un antigène intracellulaire (Dalmau et al. 2017). (A) Coupe coronale d'hippocampe de rat, marquée avec des auto-anticorps anti-NMDA-R (extracellulaires) de patients, comparée à (B) un marquage par des auto-anticorps anti-Hu (intracellulaires), après perméabilisation des cellules. (C-D) Grossissement des images A et B, respectivement. Les auto-anticorps anti-NMDA-R montrent une réactivité intense avec le neuropile de l'hippocampe, sans marquage des corps cellulaires des neurones, alors que les auto-anticorps anti-Hu ne réagissent qu'avec les corps cellulaires des neurones. (E) Les auto-anticorps anti-NMDA-R réagissent avec les auto-antigènes dans les neurones vivants non perméabilisés en culture. (F) Les auto-anticorps anti-Hu n'atteignent pas l'antigène intracellulaire dans les neurones vivants. Barres horizontales : A, B 500 μ m; C, D 20 μ m; E, F 10 μ m.

2.4.3 Antigènes intracellulaires

Les auto-anticorps dirigés contre des antigènes intracellulaires sont associés à des syndromes paranéoplasiques. Les syndromes neurologiques paranéoplasiques sont des affections qui ne sont pas causées par des métastases ou des effets locaux du cancer, mais qui sont associées à une réponse immunitaire induite par le cancer, contre des protéines neuronales (Graus et Dalmau 2019). La détection d'anticorps ciblant des antigènes intracellulaires indique dans plus de 80% des cas la présence d'un cancer sous-jacent (Graus et Dalmau 2019). Ainsi, ces anticorps sont d'excellents biomarqueurs des syndromes paranéoplasiques, à la différence des anticorps ciblant des antigènes extracellulaires qui peuvent être associés ou non à des cancers (Dalmau et al. 2017).

Dans les études utilisant des cultures de neurones, les anticorps ne peuvent pas accéder à leur cible intracellulaire sans perméabilisation cellulaire (Fig. 7F), ce qui va dans le sens d'une absence de rôle pathogène des anticorps. En plus des auto-anticorps, les patients développent des réponses cellulaires T cytotoxiques importantes contre le système nerveux. Des études d'autopsies de patients ont montré des infiltrats étendus de lymphocytes T cytotoxiques entourant les neurones et provoquant une perte neuronale et une prolifération microgliale (Bernal et al. 2002; Blumenthal et al. 2006; Bien et al. 2012). Les lymphocytes T partageraient la même spécificité antigénique que les auto-anticorps (Albert et al. 1998).

Ainsi, dans ces EAI, la pathogenèse est médiée par des cellules T cytotoxiques. Les auto-anticorps sont présents comme des biomarqueurs de la réponse auto-immune et ne jouent pas de rôle pathogène direct dans la génération ou l'aggravation de la maladie. Par conséquent, les patients atteints de ces syndromes développent des lésions irréversibles, et leurs réponses aux immunothérapies sont le plus souvent limitées (Keime-Guibert et al. 2000).

2.4.4 EAI séronégatives

Dans certains cas, les patients présentent toutes les caractéristiques d'une EAI, mais aucun auto-anticorps n'est identifié (Graus et al. 2018; Schubert et al. 2019). Il s'agit des EAI « séronégatives ». De telles EAI pourraient être expliquées par la présence d'auto-anticorps qui n'ont pour le moment jamais été identifiés. Des critères ont été publiés en 2016 pour objectiver leur diagnostic et aider à la mise en place d'une immunothérapie même en l'absence d'auto-anticorps (Tableau 1) (Graus et al. 2016). Ces critères sont également utiles pour mettre en

place des immunothérapies en urgence, sans attendre le résultat de la recherche d'anticorps qui peut être longue et parfois faussement négative.

Critère 1	Progression rapide (moins de 3 mois) de déficits de la mémoire de travail (perte de mémoire à court terme), d'une altération de l'état mental ou de symptômes psychiatriques
Critère 2	Exclusion des syndromes bien définis d'encéphalite auto-immune (par exemple : encéphalite limbique typique, encéphalite du tronc cérébral de Bickerstaff, encéphalomyélite aiguë disséminée)
Critère 3	Absence d'auto-anticorps retrouvés dans le sérum et le LCR, et au moins deux des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> • Anomalies IRM évocatrices d'une encéphalite auto-immune • Pléiocytose, bandes oligoclonales spécifiques ou index IgG élevé (ou les deux), dans le LCR • Biopsie cérébrale montrant des infiltrats inflammatoires et excluant d'autres troubles, par exemple une tumeur
Critère 4	Exclusion raisonnable de causes alternatives

Tableau 1. Critères pour une EAI probable séronégative. Tableau adapté de (Graus et al. 2016). Le diagnostic peut être posé quand les quatre critères sont présents.

2.5 Physiopathologie des auto-anticorps

Nous avons vu que les anticorps dirigés contre des antigènes intracellulaires ne jouent pas de rôle pathogène direct. Dans cette partie, nous nous intéresserons donc uniquement aux anticorps dirigés contre des antigènes extracellulaires.

2.5.1 Accès des anticorps au SNC

Afin d'exercer leurs effets pathologiques sur leurs antigènes, les auto-anticorps doivent accéder au SNC. L'entrée d'auto-anticorps peut se produire *via* la diffusion d'IgG, ou *via* le passage de lymphocytes B, de la périphérie vers le SNC.

Dans les EAI associées à des anticorps dirigés contre des antigènes extracellulaires, les concentrations médianes d'auto-anticorps dans le sérum sont 4 à 640 fois plus élevées que celles du LCR (Fig. 8) (Sun et al. 2020). Par conséquent, la recherche d'auto-anticorps est souvent

plus sensible dans le sérum, si bien que la recherche dans le LCR n'est plus systématiquement effectuée pour certaines EAI. C'est le cas des EAI associées aux anticorps anti-LGI1, anti-MOG, ou anti-AQP4 (Prüss 2021). En revanche, dans l'encéphalite à anticorps anti-NMDA-R, dans environ 15 % des cas, les anticorps ne sont pas détectables dans le sérum (Gresa-Arribas et al. 2014).

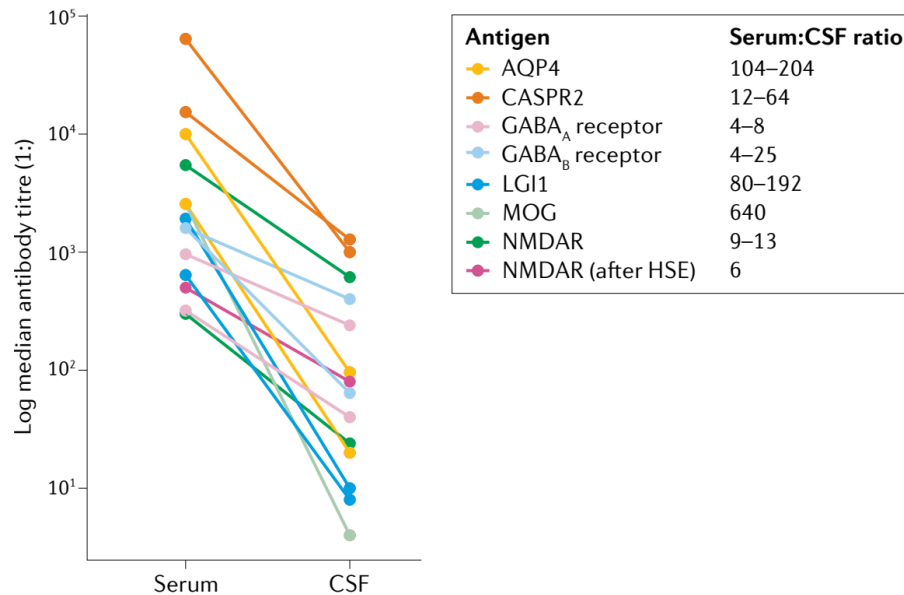


Figure 8. Valeurs de titration médianes d'anticorps dans le sérum et le LCR de différentes EAI (Sun et al. 2020). Ces résultats montrent que les auto-anticorps sont systématiquement présents à des niveaux plus élevés dans le sérum que dans le LCR, ce qui impliquerait qu'ils soient générés initialement en périphérie.

Cette plus forte concentration d'auto-anticorps dans le sérum semble indiquer que leur synthèse a lieu initialement en périphérie. Leur présence dans le SNC pourrait alors découler d'une diffusion des IgG à travers la BHE. Dans des conditions physiologiques, le passage des anticorps est possible mais en quantités très faibles, ne pouvant pas expliquer le taux élevé d'anticorps retrouvés dans le LCR des patients (Diamond et al. 2009). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des anticorps à travers la BHE, notamment la diffusion *via* l'altération des jonctions serrées causée par des cytokines systémiques entre les cellules endothéliales de la BHE, ou bien par l'intermédiaire de transporteurs (Platt et al. 2017).

Une synthèse intrathécale d'anticorps a également été démontrée, notamment chez les EAI à anticorps anti-NMDA-R. Chez les patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDA-R ou anti-LGI1, des lymphocytes B et des plasmocytes ont été observés dans le SNC (Tüzün et al. 2009; Bien et al. 2012) et dans le LCR (Kreye et al. 2016; Kornau et al. 2020). L'étude des

anticorps produits par ces cellules a permis de montrer qu'une partie de ces lymphocytes produisait des anticorps dirigés contre les auto-antigènes de la maladie (NMDA-R et LGI1, respectivement).

La contribution relative des deux mécanismes dans l'accès des anticorps à leur cible, la synthèse intrathécale et la diffusion d'anticorps de la périphérie vers le SNC, n'est pour le moment pas connue. Toutefois, les modèles de transfert passif d'auto-anticorps dirigés contre le SNC ont nécessité une ouverture active artificielle de la BHE ou une injection directement au sein du SNC (Planagumà et al. 2015; Petit-Pedrol et al. 2018; Duan et Verkman 2020). Cela suggère que la diffusion seule des anticorps périphériques à travers la BHE n'est pas suffisante, et cela va dans le sens d'une nécessité de synthèse au sein du SNC. Il a aussi été suggéré qu'une ouverture active de la BHE chez les patients, pouvait survenir, causée par exemple par une infection ou par la prise de drogues, comme la cocaïne.

2.5.2 Modes d'action des auto-anticorps

Les anticorps associés aux EAI sont principalement de la classe des IgG, et en particulier des IgG1 et des IgG4 (Fig. 9). La détection d'IgA ou d'IgM est plus rare et leur implication dans la physiopathologie a été peu étudiée (Graus et al. 2016).

Les IgG1 sont la principale sous-classe d'IgG dans le sérum (60 % des IgG totales) (Vidarsson et al. 2014) et sont identifiées dans la plupart des EAI. Ces anticorps sont capables de connecter (*cross-link*) leurs cibles antigéniques les unes aux autres, conduisant à leur internalisation (Dalmau et al. 2008). Les IgG1 peuvent aussi se lier aux récepteurs Fc γ , ce qui induit une phagocytose ou une cytotoxicité, et elles activent le complément, créant une réaction inflammatoire active (Vidarsson et al. 2014).

La proportion d'IgG4 dans le sérum est quant à elle, faible (environ 4 % des IgG totales) (Vidarsson et al. 2014). Cette sous-classe prédomine dans les EAI associées aux anticorps anti-LGI1, anti-CASPR2, anti-DPPX et anti-IgLON5 (Dalmau et al. 2017). Les IgG4 ont une faible affinité pour les récepteurs Fc γ et n'activent pas le complément (Vidarsson et al. 2014). De plus, elles échangent entre elles, de manière aléatoire, la moitié de leur molécule pour former des IgG4 bispécifiques monovalentes, les rendant incapables de lier ensemble deux antigènes identiques et de former des complexes induisant l'internalisation de leur cible (van der Neut

Kolfschoten et al. 2007). Ainsi, les IgG4 ne sont pas des anticorps pro-inflammatoire, mais médient plutôt des interactions protéine-protéine inhibitrices avec leurs cibles (Konecny 2018)

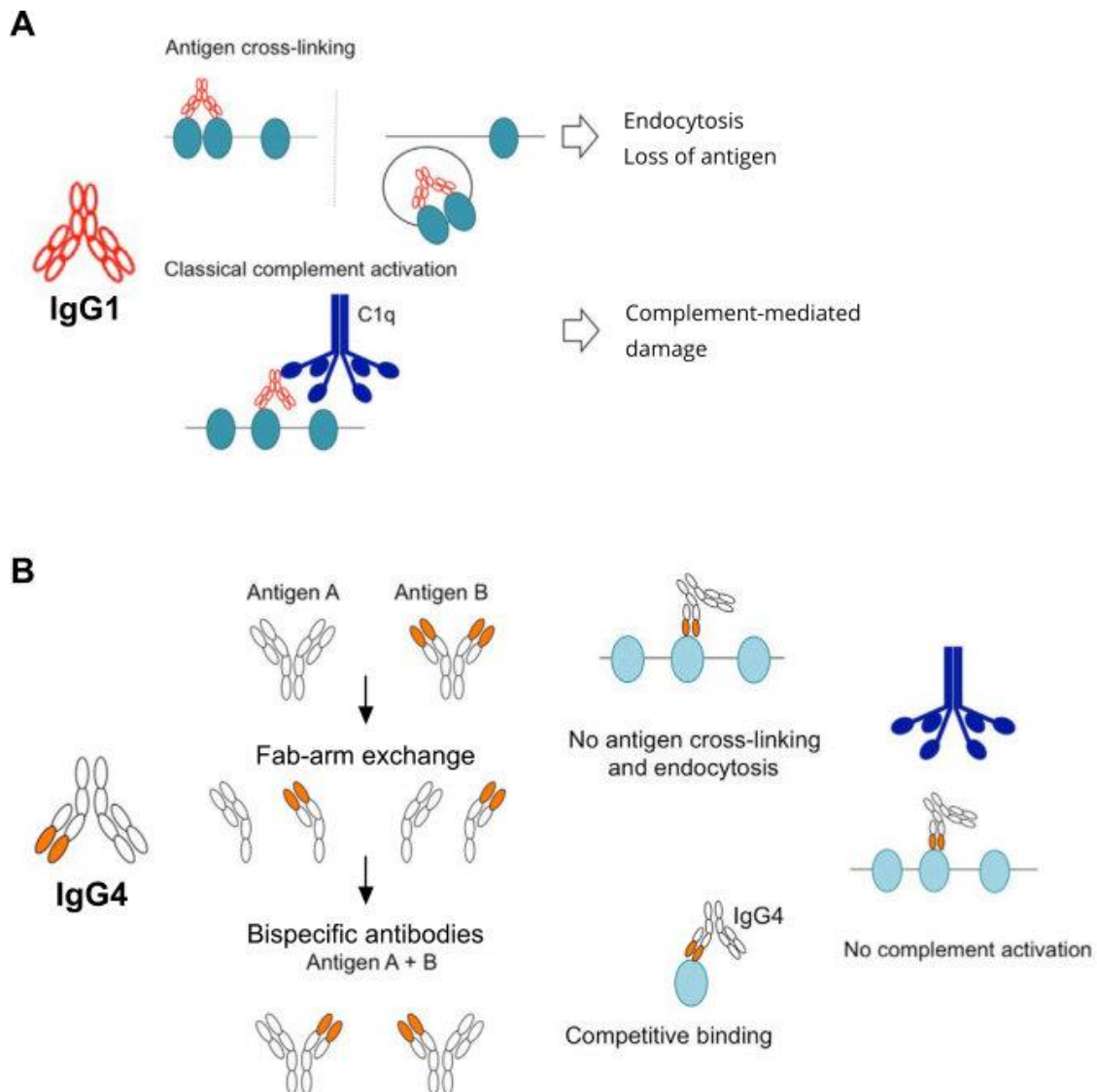


Figure 9. Différents modes d'action des IgG1 et des IgG4, les deux principaux isotopes d'anticorps retrouvés dans les EAI. Figure adaptée de (Konecny 2018). (A) Les IgG1 sont des anticorps bivalents, qui ont deux sites de liaisons pour le même antigène. Elles peuvent lier plusieurs antigènes entre eux (*cross-linking*), et induire leur internalisation. De plus, elles peuvent induire une réaction inflammatoire, notamment en activant le complément. (B) Les IgG4 échangent entre elles, de manière aléatoire, des moitiés de molécules, ce qui les rend bispécifiques. Elles ont deux sites de liaisons, pour des antigènes différents. Elles ne peuvent donc pas lier deux antigènes identiques entre eux, ne permettant pas la formation d'importants complexes antigènes-anticorps, et leur internalisation. De plus, elles n'activent pas la voie du complément. L'action des IgG4 sur leurs antigènes serait liée à une interaction compétitive inhibitrice.

2.6 Origine de l'auto-immunité

2.6.1 Tumeurs

Les EAI, en fonction des antigènes ciblés, peuvent être associées ou non à des tumeurs, avec des fréquences et des types tumoraux dépendants de l'auto-antigène. Les anticorps ciblant des antigènes intracellulaires sont quasiment systématiquement, dans plus de 80% des cas, associés à des tumeurs (Graus et Dalmau 2019). Pour les anticorps ciblant des antigènes extracellulaires, cette association tumorale est plus variable. Par exemple, les EAI à anticorps anti-NMDA-R et anti-GABA_B-R montrent une association robuste et spécifique à des cancers (Höftberger et al. 2013; Dalmau et al. 2019). En revanche, les EAI à anticorps anti-LGI1 et anti-CASPR2 ne sont pas associées à des tumeurs spécifiques et la plupart des patients ne présentent aucune tumeur (Irani et al. 2010; Lai et al. 2010; Gadoth et al. 2017).

Cette association entre auto-immunité et tumeurs est expliquée par l'expression ectopique d'antigènes neuronaux dans les tumeurs malignes, conduisant à une réponse immunitaire anti-tumorale en réaction croisée avec la protéine apparentée du SNC (Prüss 2021).

2.6.2 Infections

Plusieurs études montrent que des infections virales peuvent déclencher une auto-immunité contre le système nerveux central. L'EAI à anticorps anti-NMDA-R est la première EAI à avoir été associée à une infection (Prüss et al. 2012). Près d'un tiers des patients atteints d'encéphalite à herpès simplex développent par la suite une EAI à anticorps anti-NMDAR (Armangue et al. 2018). Cela a été confirmé par un modèle *in vivo*, où 4 sur 6 souris infectées par le virus Herpes Simplex 1 ont développé des anticorps sériques anti-NMDA-R, entre 3 et 8 semaines après l'infection (Linnoila et al. 2019). Des infections par des virus de l'herpès ont également été associées à des encéphalites à anticorps anti-AMPA-R et anti-GABA_B-R, ainsi qu'à des anticorps anti-neuronaux non caractérisés (Linnoila et al. 2016). Une étude chez des patients atteints de symptômes neurologiques graves après infection par le SARS-COV2, et avec une absence de virus dans le LCR, s'est intéressée à la présence d'auto-anticorps (Franke et al. 2021). Après application de sérum ou de LCR de patients sur des coupes de souris, les auteurs ont mis en évidence, chez tous les patients ($n = 11$), un marquage anti-neuronal. Les antigènes ciblés étaient Yo, NMDA-R, ainsi que d'autres antigènes non identifiés.

Différents mécanismes ont été postulés concernant le déclenchement de maladies neurologiques auto-immunes suite à une infection (Husari et Dubey 2019) :

- Le mimétisme moléculaire : la similarité structurelle et/ou de séquence d'acides aminés entre l'agent pathogène et l'auto-antigène peuvent conduire à une réponse immunitaire croisée.
- La propagation d'épitopes : les dommages cellulaires causés par une infection peuvent entraîner la libération d'un auto-antigène, déclenchant une réponse auto-immune.
- L'activation « spectateur » (*bystander activation*) : l'infection peut conduire à l'activation de lymphocytes auto-réactifs, déclenchant une réponse immunitaire contre des auto-antigènes. C'est ce mécanisme qui serait à l'origine de l'association de l'encéphalite à virus herpès simplex et de l'EAI à anticorps anti-NMDA-R (Armangue et al. 2018).

2.6.3 Prédisposition génétique

De nombreuses maladies auto-immunes présentent des associations plus ou moins fortes avec les haplotypes de l'antigène leucocytaire humain (*human leukocyte antigen*, HLA), suggérant l'importance que peut avoir la contribution génétique dans la génération de maladies auto-immunes (Dendrou et al. 2018). Concernant les encéphalites auto-immunes :

- Environ 90% des patients avec des anticorps anti-LGI1 sont positifs pour HLA-DRB*07:01 (Kim et al. 2017; van Sonderen et al. 2017; Binks et al. 2018; Mueller et al. 2018)
- Les patients avec des anticorps anti-CASPR2 ont une nette surreprésentation de HLA-DRB1*11:01 (Binks et al. 2018).
- Les anticorps anti-IgLON5 sont fortement corrélés avec HLA-DRB1*10:01 et HLA-DQB1*05:01 (Gelpi et al. 2016; Gaig et al. 2017).
- Les anticorps anti-AQP4 sont associés à HLA-DRB1*03:01 (Estrada et al. 2018) et à HLA-DRB1*16:02 (Yoshimura et al. 2013).
- Les anticorps anti-NMDA-R ont une faible association avec HLA-B*07:02 (Mueller et al. 2018) et avec HLA-DRB1*16:02 (Shu et al. 2019).

Bien que probablement aucun des allèles ne soit le seul facteur de susceptibilité impliqué dans le déclenchement de l'auto-immunité, ces associations anticorps-HLA suggèrent que les

interactions restreintes entre lymphocytes T et B, médiées par le HLA, sont essentielles à la génération d'auto-anticorps.

2.6.4 Inconnue

Chez la plupart des patients atteints d'EAI associées à des anticorps dirigés contre des protéines extracellulaires, la cause déclenchant l'auto-immunité n'est pas connue. Notamment, la recherche de tumeur ou d'infection virale récente est négative, et les facteurs génétiques prédisposant connus ne sont pas retrouvés. Le jeune âge et l'absence de facteurs de risque tumoral chez certains patients, ainsi qu'un long suivi clinique pendant lequel les patients restent sans tumeur, soutiennent l'existence d'autres déclencheurs immunologiques inconnus (Dalmau et al. 2017).

2.7 Encéphalites auto-immunes et épilepsies

L'épilepsie est l'une des manifestations cliniques majeures dans beaucoup d'EAI (cf. paragraphe 2.3). Le concept d'épilepsie auto-immune a été introduit pour la première fois en 2002, lors du congrès international de Genève sur l'auto-immunité (Levite 2002). Depuis 2017, l'ILAE a ajouté l'auto-immunité à la liste des étiologies contribuant à l'épilepsie (cf. paragraphe 1.2.4) (Scheffer et al. 2017). La définition de cette étiologie est essentielle car elle permet d'identifier un groupe de patients pour lesquels des thérapies différentes doivent être utilisées (des immunothérapies), par rapport aux épilepsies causées par d'autres étiologies.

Le terme d'épilepsie auto-immune peut poser problème car il ne permet pas la distinction importante entre épilepsie et crises d'épilepsie (cf. paragraphe 1.1). De plus, ce terme accentue l'importance des crises qui surviennent dans ces maladies, au détriment des autres symptômes neurologiques importants. Le terme d'épilepsie peut donc être jugé inapproprié, voire potentiellement contre-productif, étant donné la stigmatisation sociale et les restrictions associées aux crises d'épilepsie (Geis et al. 2019). Dans ce contexte, l'ILAE a récemment publié un article pour clarifier la terminologie, notamment en différenciant les crises symptomatiques aiguës et l'épilepsie associée à une auto-immunité (Tableau 2) (Steriade et al. 2020).

2.7.1 Crises symptomatiques aiguës secondaires à une EAI

En référence à la terminologie actuelle de l'ILAE, les crises survenant chez des patients atteints d'EAI associées à des anticorps ciblant des antigènes extracellulaires, sont plutôt des crises symptomatiques aiguës que de l'épilepsie, bien que les crises prennent parfois des semaines, voire des mois, pour se résoudre. En effet, dans ces EAI, le fait que les crises s'arrêtent après une immunothérapie et qu'il n'y ait plus besoin de traitement anti épileptique (cf. paragraphe 2.4.2) va contre le concept d'épilepsie qui est caractérisé par une prédisposition durable aux crises non provoquées (Geis et al. 2019). Pour ces patients, l'ILAE suggère le terme de « crises symptomatiques aiguës secondaires à une encéphalite auto-immune » (Steriade et al. 2020). Cette terminologie montre la nécessité de découvrir la cause sous-jacente et indique que les crises sont la conséquence d'une maladie auto-immune.

	Crises symptomatiques aiguës secondaires à une EAI	Épilepsies associées à une auto-immunité
Maladie concernée	EAI associées à des anticorps ciblant des antigènes extracellulaires	EAI associées à des anticorps ciblant des antigènes intracellulaires Encéphalite de Rasmussen Épilepsie persistante après une EAI aiguë
Physiopathologie supposée	Ictogénèse médiée par les anticorps	Épileptogénèse causée par des lésions structurelles post-encéphalitiques et/ou par l'inflammation cérébrale médiée par les lymphocytes T
Traitements	Immunothérapie Traitement antiépileptique (en général non efficace seul)	Traitements antiépileptiques (en général inefficaces) Chirurgie de l'épilepsie (en général, réponse incomplète) Immunothérapie (en général, réponse faible)
Symptômes sur le long terme	Les crises s'arrêtent généralement avec la rémission de l'encéphalite. Potentiellement, arrêt du traitement antiépileptique Potentiellement, déficits cognitifs chroniques	Épilepsie focale pharmacorésistante fréquente Potentiellement, déficits cognitifs chroniques

Tableau 2. Crises symptomatiques aiguës secondaires à une EAI versus épilepsies associées à une auto-immunité. Tableau adapté de (Steriade et al. 2020).

2.7.2 Épilepsies associées à une auto-immunité

A l'inverse, certains patients atteints d'EAI auto-immune ont des crises qui deviennent chroniques et résistantes aux traitements antiépileptiques et à l'immunothérapie. Il s'agit en particulier des EAI associées à des anticorps ciblant des antigènes intracellulaires, mais aussi

de certaines EAI associées à des anticorps dirigés contre des antigènes extracellulaires qui peuvent présenter des lésions cérébrales irréversibles en cas de traitement tardif (cf. paragraphes 2.4.2 et 2.4.3). Dans ce contexte, la persistance de crises malgré l'immunothérapie suggère une prédisposition durable, ce qui est en accord avec la définition de l'ILAE de l'épilepsie.

En revanche, le terme d'épilepsie auto-immune impliquerait que l'étiologie serait seulement auto-immune. Or, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, une cause structurelle peut exister, comme une atrophie de l'hippocampe, séquelle de la réaction auto-immune (Carreño et al. 2017). Pour cette raison, l'ILAE propose le terme d' « épilepsie *associée* à une auto-immunité » (« *autoimmune-associated epilepsy* »), pour souligner le fait que, en plus des facteurs auto-immuns, des lésions structurelles suite à l'encéphalite peuvent également contribuer à la prédisposition chronique de ces patients à faire des crises (Steriade et al. 2020). De plus, puisque l'immunothérapie n'est souvent pas efficace dans ces cas, et que des traitements antiépileptiques classiques, voire une neurochirurgie, peuvent être envisagés (Carreño et al. 2017), le terme d'épilepsie auto-immune pourrait être trompeur quant à la conduite à tenir (Steriade et al. 2020).

2.8 EAI associées aux anticorps anti-LGI1

L'EAI à anticorps anti-LGI1 est la deuxième cause d'EAI, après les EAI à anticorps anti-NMDA-R. Elle représente environ 25 % (de 17,6 à 34,6 % selon les études) de toutes les EAI (de Bruijn et al. 2019; Shen et al. 2020; Ilyas-Feldmann et al. 2021; Qiao et al. 2021b; Shan et al. 2021), et est celle la plus fréquemment identifiée dans les unités d'épilepsie (Cousyn et al. 2021).

Les EAI associées à des anticorps anti-LGI1 ont été décrites pour la première fois en 2010 (Irani et al. 2010; Lai et al. 2010). Avant cela, elles étaient incluses dans un groupe de syndromes impliquant le système nerveux central et périphérique, définis par la présence d'anticorps dirigés contre des canaux potassiques dépendants du voltage (*voltage-gated K⁺ channels*, VGKC) (Vincent et al. 2004). Il a ensuite été démontré que les anticorps anti-VGKC ne ciblaient en fait pas les canaux potassiques, mais plutôt LGI1, ou bien la protéine *contactin-associated protein-like 2* (CASPR2), qui sont deux protéines participant au complexe VGKC (Irani et al. 2010; Lai et al. 2010). Le terme d' « encéphalite à anticorps anti-VGKC » a donc

été redéfini en deux entités : l'encéphalite à anticorps anti-LGI1 et l'encéphalite à anticorps anti-CASPR2, et ces deux encéphalites présentent des symptômes et un pronostic distincts.

2.8.1 Caractéristiques démographiques

Les patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 ont un âge médian de 56-65 ans, et sont plus souvent des hommes que des femmes, avec un ratio de 2:1 (Irani et al. 2011; Navarro et al. 2016; van Sonderen et al. 2016a; Gadoth et al. 2017; Binks et al. 2021; Li et al. 2021; Lin et al. 2021; Qiao et al. 2021a; Zhao et al. 2021). Les données de plusieurs cohortes suggèrent qu'il existe une prédisposition génétique à cette maladie, car il y a une forte association avec les allèles de classe II de l'antigène leucocytaire humain (*Human Leukocyte Antigen*, HLA). En particulier, l'allèle HLA-DRB1*07:01 a été retrouvé chez 88-91% des patients (Kim et al. 2017; van Sonderen et al. 2017; Binks et al. 2018; Muñoz-Castrillo et al. 2021). Les patients qui ne portent pas cet allèle seraient plus jeunes (âge médian : 46 ans), plus fréquemment des femmes, avec moins de symptômes psychiatriques et présenteraient une atteinte moindre du lobe frontal (Muñoz-Castrillo et al. 2021).

2.8.2 Phénotypes cliniques

Les EAI à anticorps anti-LGI1 touchent principalement deux régions cérébrales : le cortex moteur et la face interne du lobe temporal (Fig. 10) (Navarro et al. 2016). L'atteinte du cortex moteur se traduit par la survenue de crises toniques-dystoniques (*tonic-dystonic seizures*, TDS), aussi appelées crises dystoniques faciobrachiales (*faciobrachial dystonic seizures*, FBDS). Ces crises sont pathognomoniques de l'EAI à anticorps anti-LGI1. Lorsque le lobe temporal interne est atteint, les patients développent une encéphalite limbique, qui peut associer des crises temporales internes et des troubles cognitifs, prédominant sur la mémoire.

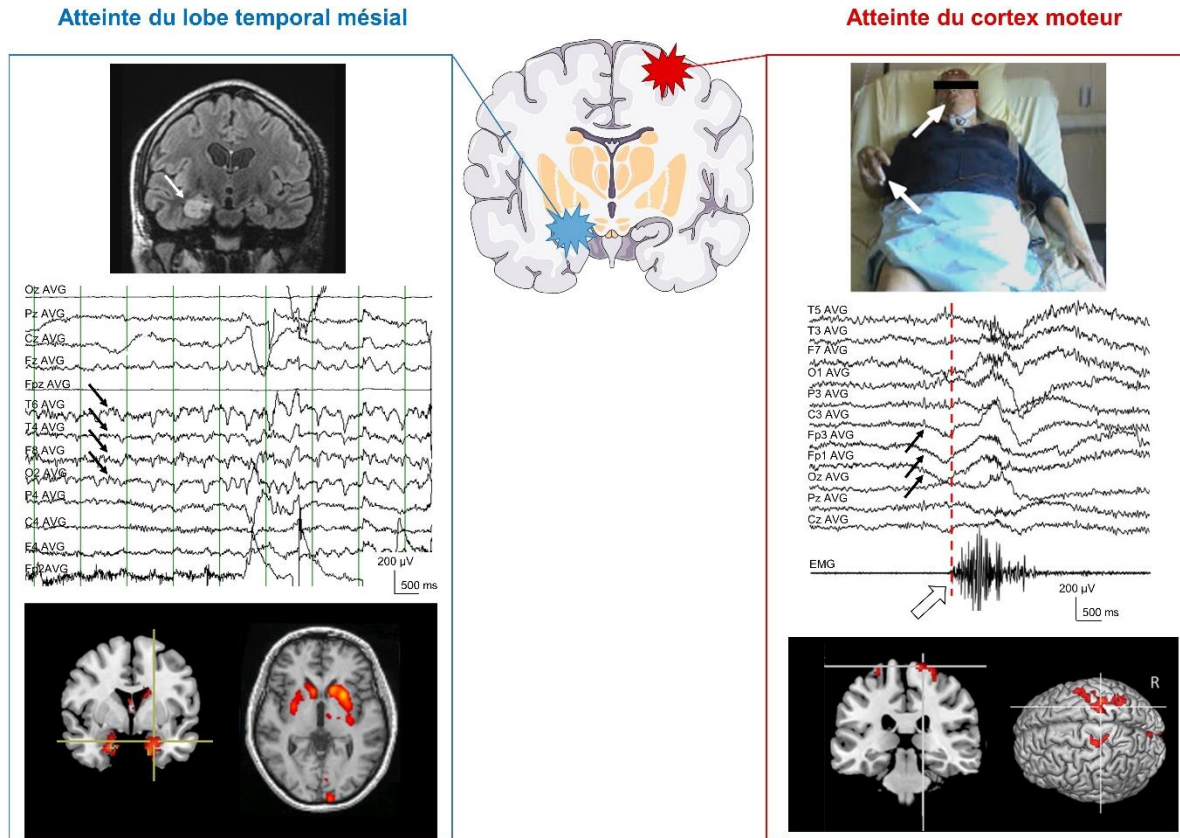


Figure 10. Deux cibles principales de l'EAI à anticorps anti-LGI1 : le lobe temporal interne et le cortex moteur. **A gauche**, atteinte du lobe temporal interne. L'hyper-signal hippocampique et l'œdème sont illustrées sur l'IRM cérébrale (en haut à gauche, image FLAIR coronale). Un exemple de crise focales du lobe temporal est présenté sur l'EEG (au milieu à gauche ; les flèches indiquent les électrodes EEG impliquées dans la crise), ainsi que l'hypermétabolisme hippocampique sur la TEP au 18F-FDG (en bas à gauche ; vue coronale, superposée à l'IRM cérébrale). **À droite**, atteinte du cortex moteur. Un exemple typique de TDS, avec contraction tonique de l'hémiface et du bras droits, est illustré sur la photographie en haut à droite. L'EEG concomitant montre une onde lente fronto-centrale (au milieu à droite, flèches noires) avant la contraction musculaire controlatérale (flèche blanche, EMG du bras droit). La TEP au 18F-FDG (en bas à droite) montre un hypermétabolisme localisé sur le cortex moteur primaire. Les EEG sont représentés avec une référence moyenne, et les valeurs négatives sont orientées vers le bas.

Les crises toniques-dystoniques

Durée	Évènements moteurs brefs d'environ 1 s.
Localisation (unilatérale)	<ul style="list-style-type: none"> - Membre supérieur : systématiquement - Hémiface : inconstant, « FBDS » si la face est atteinte - Membre inférieur : possible association - Tronc : implication moins fréquente
Latéralisation	<ul style="list-style-type: none"> - Unilatérale au début de la maladie. - Plus tard, implication possible des deux côtés, en général de manière indépendante - Des TDS "à bascule" peuvent également survenir : il s'agit de TDS affectant un côté, puis l'autre après quelques secondes
Mouvements anormaux associés	<ul style="list-style-type: none"> - Composante tonique, qui ressemble à des spasmes épileptiques - Composante dystonique, observable sur les doigts et la main, parfois associée à des automatismes brefs
Conséquences	<ul style="list-style-type: none"> - Chutes lorsque les TDS affectent les membres inférieurs - Vocalisations si les TDS touchent la tête
Conscience	Rarement associées à une perte de conscience, mais des crises « classiques » des lobes frontaux ou temporaux peuvent apparaître dans les secondes suivant une TDS
Facteurs déclenchant	Parfois déclenchées par la surprise (par exemple une sonnerie de téléphone), un mouvement, ou des émotions fortes (positives ou négatives)
États de vigilance	Se produisent pendant l'éveil et le sommeil
Évolution	Augmentation progressive (en quelques semaines) de la fréquence : de 1 TDS par semaine à 1 TDS toutes les 2-3 min.

Tableau 3. Principales caractéristiques des TDS dans les EAI à anticorps anti-LGI1. FBDS : crise dystonique brachio-faciale; TDS : crise tonique-dystonique.

Les caractéristiques cliniques des TDS sont décrites dans le Tableau 3. Nous préférons le terme crise tonique-dystonique (TDS) à celui de crise dystonique faciobrachiale (FBDS), car l'implication de la face peut être variable ou absente. Lors d'enregistrements vidéo-EEG, les TDS sont précédées d'une onde lente spécifique et très reproductible (Navarro et al. 2016; Wennberg et al. 2018; Liu et al. 2020). Cette onde, qui peut facilement passer inaperçue, dure environ 500 ms et est visible au niveau d'électrodes fronto-centrales controlatérales à la TDS. L'analyse EEG utilisant une référence moyenne et un enregistrement simultané de l'activité EMG des muscles affectés peut aider à mieux identifier cette onde lente (Fig. 10, à droite). Sur les enregistrements EMG, la composante tonique des TDS est caractérisée par une forme de « losange » d'une durée d'environ 1 seconde.

Plusieurs observations suggèrent que les TDS sont générées dans le cortex, et plus spécifiquement par le cortex moteur :

- Des enregistrements polymyographiques ont révélé deux profils EMG différents associés aux TDS (Fig. 11A-D) (Navarro et al. 2016). Chez 2/5 patients, l'activité EMG était continue, correspondant à un spasme purement tonique. Chez 3/5 patients, l'activité EMG était composée de brèves salves rythmiques de 10 à 20 Hz, correspondant à un spasme tonique avec des myoclonies superposées. L'organisation temporelle et spatiale des secousses (Fig. 11F) était compatible avec une conduction pyramidale rapide le long de la voie corticospinale, comme pour les myoclonies corticales. Ces caractéristiques sont en faveur d'une origine corticale de ces contractions pendant la TDS.
- Les patients présentaient également des myoclonies intercritiques. Le moyennage rétrograde de l'EEG, basé sur ces myoclonies intercritiques, a révélé un potentiel cortical transitoire sur l'électrode Cz de l'EEG, précédant les secousses du muscle tibial antérieur de 35 ms (Fig. 11E). Ces données suggèrent une atteinte corticale chez ces patients, responsables de contractions anormales (Navarro et al. 2016).
- La forte association entre l'onde lente et les activités EMG paroxystiques suggèrent un lien de causalité entre l'événement cortical et les symptômes moteurs de la crise, ce qui soutient l'hypothèse d'une origine corticale des TDS (Navarro et al. 2016; Wennberg et al. 2018; Liu et al. 2020).
- Enfin, la tomographie par émission de positons (TEP) au 18F-fluoro-désoxy-glucose (18F-FDG) a montré une forte augmentation du métabolisme dans le cortex moteur primaire controlatéral (Fig. 10, en bas à droite) (Navarro et al. 2016).

Un hypermétabolisme striatal bilatéral est aussi détecté dans les EAI à anticorps anti-LGI1. Alors que l'activation du cortex moteur pourrait générer la phase tonique des TDS, l'implication du striatum pourrait provoquer la posture dystonique (Brüggemann 2021).

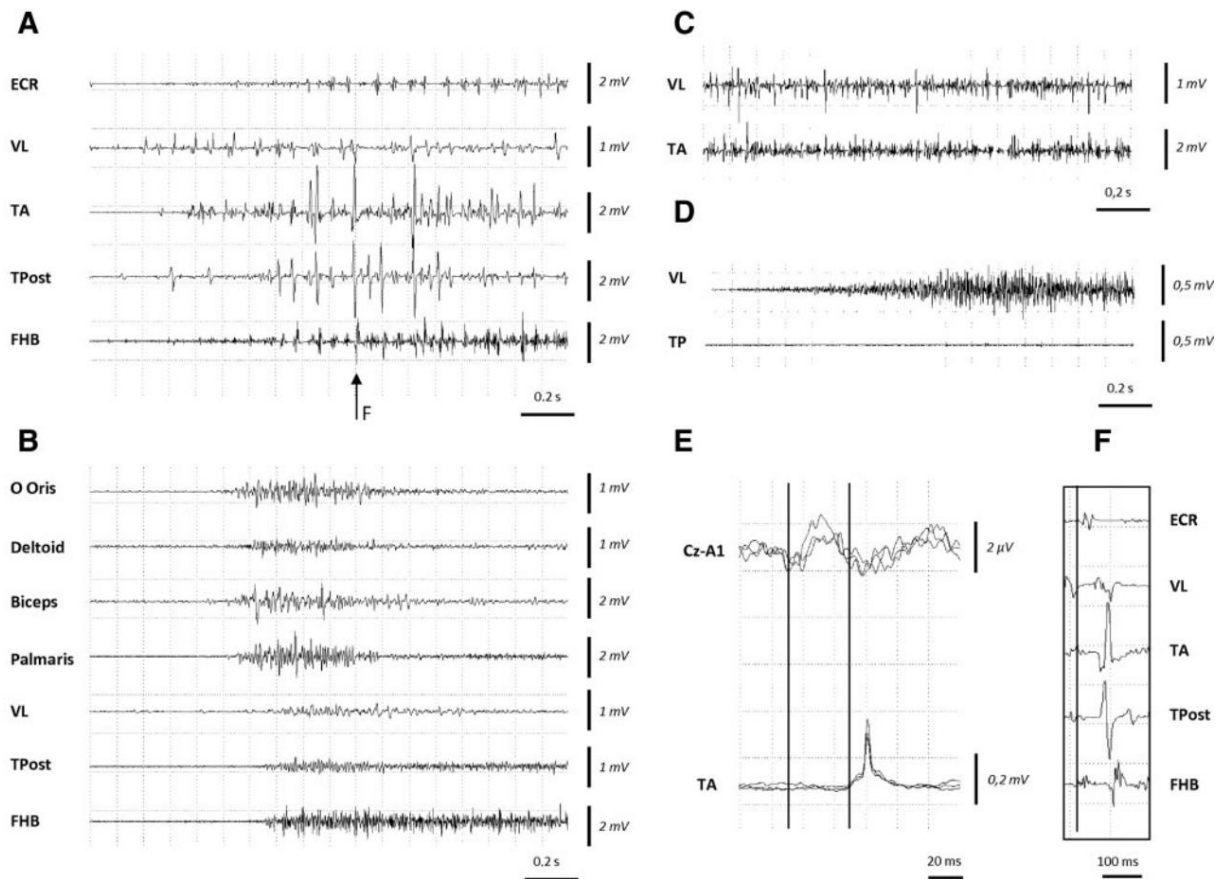


Figure 11. Exemples d'activité EMG pendant les TDS, dans l'EAI à anticorps anti-LGI1. Figure adaptée de (Navarro et al. 2016). Deux types d'activités EMG peuvent être associées aux TDS. (**A**, **C**, **E** et **F**) Exemple du premier type d'activité EMG, retrouvé chez 3/5 patients. De brèves bouffées d'EMG d'une durée de 20 à 25 ms et d'une fréquence de 10 Hz reflètent un spasme tonique avec myoclonies superposées. (**B** et **D**) Exemple du deuxième type d'activité EMG, retrouvé chez 2/5 patients. L'activité EMG continue correspond à un spasme purement tonique. (**E**) L'origine corticale des secousses est suggérée par un potentiel cortical transitoire sur l'électrode Cz de l'EEG, qui précède le signal du muscle tibial antérieur de 35 ms. Cette onde est mise en évidence par moyennage rétrograde (**F**) Organisation temporo-spatiale du spasme tonique avec myoclonies superposées, avec une activité plus précoce des membres supérieurs comparée aux membres inférieurs, ce qui est compatible avec une conduction pyramidale rapide le long de la voie corticospinale comme pour la myoclonie corticale. ECR = extenseur radial du carpe ; VL = vaste latéral ; TA = tibial antérieur ; Tpost = tibial postérieur ; FHB = court fléchisseur de l'hallux

L'encéphalite limbique

L'encéphalite limbique (Fig. 10, à gauche) est caractérisée par des crises du lobe temporal interne et des troubles cognitifs d'apparition subaiguë, généralement en moins de 3 mois. Les patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 présentent initialement des crises focales du lobe temporal interne sans perte de conscience, avec des symptômes principalement végétatifs (sensation épigastrique ascendante, sensation de chaud et de froid, piloérection), ainsi qu'une peur ou une anxiété soudaine, qui peuvent être diagnostiqués à tort comme des symptômes psychiatriques. La durée des crises focales sans perte de contact chez les patients atteints d'encéphalite limbique est généralement de quelques secondes et leur fréquence peut atteindre 30 à 40 par jour. Par la suite, des crises focales avec troubles de la conscience et automatismes, des crises focales évoluant vers des crises bilatérales toniques-cloniques, ou un état de mal épileptique, peuvent survenir. Les troubles cognitifs associés à l'encéphalite limbique affectent principalement la mémoire verbale et visuo-spatiale épisodique, en raison de l'implication de l'hippocampe. En cas d'atteinte bilatérale des structures temporales internes, les patients présentent une confusion et une désorientation, avec un score moyen au *Mini-Mental State Examination* (MMSE, « mini-examen d'état mental ») de 20 à 23,5 points (Navarro et al. 2016; Celicanin et al. 2017; Hang et al. 2020; Qiao et al. 2021a).

Un hypométabolisme, généralement bilatéral, des lobes frontaux et temporaux est typique chez les patients atteints de troubles cognitifs. Un œdème hippocampique, quasiment systématique en cas d'atteinte limbique, est très marqué sur les IRM réalisées au début de l'EAI. Il s'agit d'hypersignaux T2 et FLAIR associés à une augmentation du volume (Fig. 10, à gauche). De plus, la TEP au 18F-FDG met alors souvent en évidence un hypermétabolisme hippocampique. Plus tardivement, et en l'absence de prise en charge suffisamment précoce, une sclérose de l'hippocampe se développe, visible par un hypersignal T2/FLAIR associé à une atrophie et une perte des structures internes. Des symptômes dysmnésiques (déjà-vu, déjà-vécu) peuvent survenir chez des patients souffrant d'épilepsie causée par une sclérose hippocampique séquellaire tardive, sans encéphalite dysimmune active.

Autres symptômes

Environ deux tiers des patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 présentent une hyponatrémie (39-69 %) (Irani et al. 2010; Lai et al. 2010; Navarro et al. 2016; van Sonderen et al. 2016a; Gadoth et al. 2017; Li et al. 2021; Lin et al. 2021; Qiao et al. 2021a). Elle résulte

d'un syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique, qui pourrait provenir d'une atteinte hypothalamique. L'hyponatrémie a été associée de manière significative à la présence d'une atteinte temporale interne sévère, avec des troubles cognitifs majeurs (Navarro et al. 2016).

Le système nerveux périphérique peut également être impliqué, bien que ce soit plus rare. Une neuropathie périphérique et une hyperexcitabilité des nerfs périphériques ont été rapportées chez 5 à 10% des patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 (Gadoth et al. 2017; Ramanathan et al. 2021b). Les douleurs neuropathiques sont généralement « dépendantes de la longueur », c'est-à-dire que les terminaisons nerveuses les plus éloignées sont celles où les symptômes se développent en premier ou s'aggravent. Elles répondent favorablement à l'immunothérapie (Ramanathan et al. 2021b), suggérant qu'il s'agit bien d'un symptôme lié à l'auto-immunité.

2.8.3 Histoire de la maladie

Les atteintes cérébrales des EAI à anticorps anti LGI1 commencent soit par le cortex moteur, soit par les structures temporales internes. Quand la maladie s'aggrave, les deux régions sont touchées (Fig. 12). Certains patients présentent d'abord des TDS unilatérales, qui peuvent par la suite impliquer les deux côtés, en général de manière indépendante. Des TDS "à bascule" peuvent également survenir : il s'agit de TDS affectant un côté, puis l'autre après de quelques secondes. De même, le lobe temporal interne peut être affecté unilatéralement dans un premier temps, avant que l'encéphalite n'affecte les structures corticales bilatérales, aboutissant à de graves troubles cognitifs.

La maladie suit généralement une évolution temporelle monophasique, avec de rares rechutes à long terme. Elles surviennent chez 25 à 41 % des patients, généralement au cours de la première année après la guérison (van Sonderen et al. 2016b; Chen et al. 2021b; Smith et al. 2021).

Les séquelles de l'encéphalite sont généralement liées à un diagnostic tardif associé à une atteinte du lobe temporal. Par exemple, un œdème hippocampique précoce peut évoluer vers une sclérose hippocampique et induire une épilepsie séquellaire du lobe temporal interne. Les crises d'épilepsie persistent chez environ 20 % des patients après traitement et guérison de

l'encéphalite. L'administration de corticoïdes précoce pendant la phase aiguë de l'encéphalite peut protéger contre cette évolution (Lin et al. 2021; Smith et al. 2021).

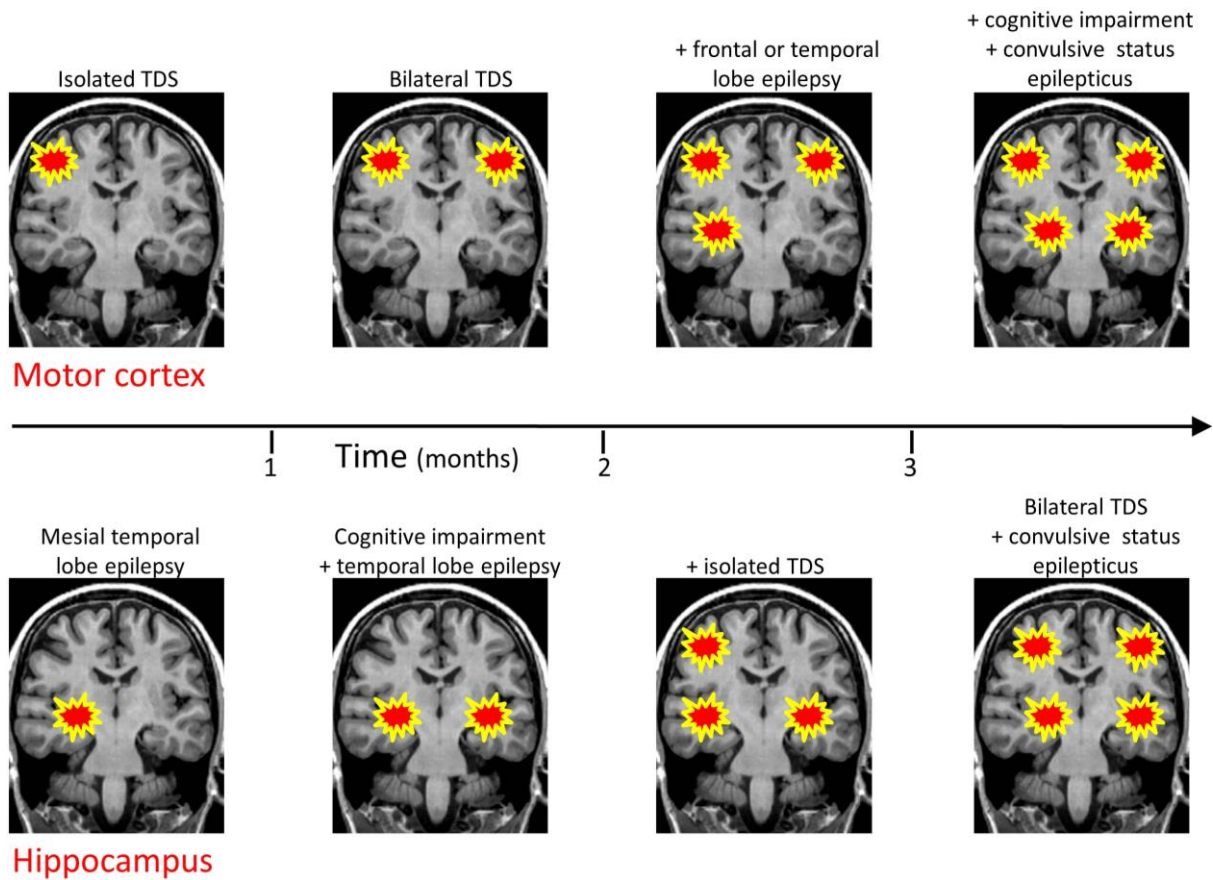


Figure 12. Histoire naturelle des EAI à anticorps anti-LGI1 (Navarro et al. 2016). Les symptômes cliniques varient selon les régions corticales concernées. Au début de la maladie, le cortex moteur, ou le lobe temporal interne, sont affectés de manière unilatérale. La ligne du haut montre une progression typique des symptômes lorsque le cortex moteur est atteint en premier. Lorsque l'hippocampe est la cible initiale, la progression s'effectue comme indiqué sur la ligne du bas. Sans immunothérapie, les symptômes deviennent bilatéraux et se propagent pour impliquer l'autre cible corticale. Le temps est schématisé.

2.8.4 Résultats biologiques

Les anticorps ciblant LGI1 sont principalement des IgG4 (Ariño et al. 2016; Thompson et al. 2018; Bien et al. 2020). Ils peuvent être détectés à la fois dans le LCR et dans le sang, mais peuvent parfois être détectés uniquement dans le sang, notamment en cas de TDS isolées. Les IgG4 ne sont pas des anticorps pro-inflammatoires ; ils médient plutôt des interactions protéine-protéine inhibitrices avec leurs cibles (Konecny 2018). Le LCR est normal chez environ deux tiers des patients, alors qu'il est majoritairement anormal, avec une pléiocytose et une augmentation de la protéinorachie, dans la plupart des autres EAI (Blinder et Lewerenz 2019).

Afin d'exercer leurs effets pathogènes sur leurs antigènes, les auto-anticorps doivent accéder au SNC. L'entrée d'auto-anticorps dans le SNC peut se produire *via* la diffusion d'IgG, ou *via* le passage des cellules B, de la périphérie vers le SNC, à travers la barrière hémato-encéphalique. Une synthèse d'IgG par des lymphocytes B a été démontrée dans le SNC (Kornau et al. 2020). Mais, la plupart du temps, la recherche en routine de synthèse intrathécale d'IgG est négative. Ce mécanisme pourrait coexister avec la diffusion périphérique des IgG vers le SNC, suggérée par des anticorps environ 100 fois plus concentrés dans le sérum que dans le LCR (Koneczny 2018). Le rôle de l'inflammation dans les EAI à anticorps anti-LGI1 reste à préciser. En effet, il peut n'y avoir aucune inflammation directe, même si l'on observe un œdème hippocampique (Fig. 10, à gauche) résultant probablement d'une inflammation due à des processus excitotoxiques possiblement causés par les crises (González-Burgos et al. 2009).

2.8.5 Traitements

Les TDS et les crises limbiques sont mal contrôlées par les antiépileptiques classiques (Irani et al. 2013; Feyissa et al. 2018; Thompson et al. 2018; de Bruijn et al. 2019). Les traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs agissant sur les lymphocytes B et les immunoglobulines sont plus efficaces. Le traitement de première intention correspond souvent à des doses élevées de corticostéroïdes, par exemple 1 g de méthylprednisolone intraveineuse pendant plusieurs jours, associées à des immunoglobulines polyclonales intraveineuses. Récemment, une étude randomisée prospective a validé l'efficacité des immunoglobulines polyclonales intraveineuses par rapport au placebo (Dubey et al. 2020). L'échange plasmatique peut aussi être réalisé, en cas d'urgence. D'autres médicaments ont également été utilisés, comme le rituximab ou le cyclophosphamide. Aucune étude prospective randomisée n'a été conduite pour conclure à la supériorité d'un traitement par rapport à un autre et les modalités d'utilisation des traitements (dosages, fréquences d'administration) reposent sur des avis d'experts et non sur des recommandations officielles

CHAPITRE 3

LGII : UNE PROTÉINE IMPLIQUÉE DANS LE DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL ET LE FONCTIONNEMENT DES NEURONES

LGII fait partie de la famille des protéines LGI. Cette famille se compose de glycoprotéines sécrétées, contenant un domaine répété riche en leucine (*leucine-rich repeat*, LRR) et un domaine *epitempin* (EPTP), qui influencent plusieurs aspects du développement et de la physiologie du système nerveux (Pakozdy et al. 2015). Une perte de fonction de LGII est impliquée dans des épilepsies autosomiques dominantes du lobe temporal latéral (*autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy*, ADLTE, cf. paragraphe 3.3.1), et dans des encéphalites auto-immune, comme nous l'avons vu précédemment (cf. paragraphe 2.8). LGII a été initialement décrite comme un possible suppresseur de tumeur, car elle a été localisée à un point de rupture de translocation chromosomique, dans une lignée cellulaire de gliome (Chernova et al. 1998). De plus, LGII est sous-exprimée dans les cellules de glioblastome (Chernova et al. 1998; Krex et al. 2002; Besleaga et al. 2003) et réduit la prolifération et la migration des cellules tumorales (Kunapuli et al. 2003, 2004; Gabellini et al. 2006). Cependant, le lien entre LGII et cancer reste controversé, car LGII n'est que faiblement exprimée dans les cellules gliales (Piepoli et al. 2006), et il n'y a pas d'association avec des tumeurs pour les épilepsies génétiques causées par la mutation de *LGII* (Gu et al. 2005) ni pour les EAI associées à des anticorps anti-LGII (Gadoth et al. 2017).

3.1 Structure et expression de LGI1, et partenaires moléculaires

3.1.1 Structures du gène et de la protéine LGI1

Le gène humain *LGI1*, situé dans la région chromosomique 10q24, mesure 39,6 kb et se compose de huit exons et sept introns. Il code un transcrit de 2,2 kb. Le gène *LGI1* de souris partage 91 % de sa séquence nucléotidique avec son orthologue humain, ce qui entraîne une identité de séquence d'acides aminés de 97 % (Chernova et al. 1998; Somerville et al. 2000). *LGI1* est une protéine de 557 acides aminés, avec un poids moléculaire de 64 kDa (Chernova et al. 1998). Elle se compose d'un domaine N-terminal LRR et un domaine C-terminal EPTP (Fig. 13). *LGI1* n'a pas de domaine transmembranaire, et le clivage du peptide signal à l'extrémité N-terminale produit une protéine mature de 60kDa. *LGI1* est une glycoprotéine sécrétée (Senechal et al. 2005; Fukata et al. 2006; Sirerol-Piquer et al. 2006; Chabrol et al. 2007; de Bellescize et al. 2009). Avant sa sécrétion, *LGI1* est N-glycosylée sur les résidus N192, N127 et N422 dans le réticulum endoplasmique (Sirerol-Piquer et al. 2006; Head et al. 2007).

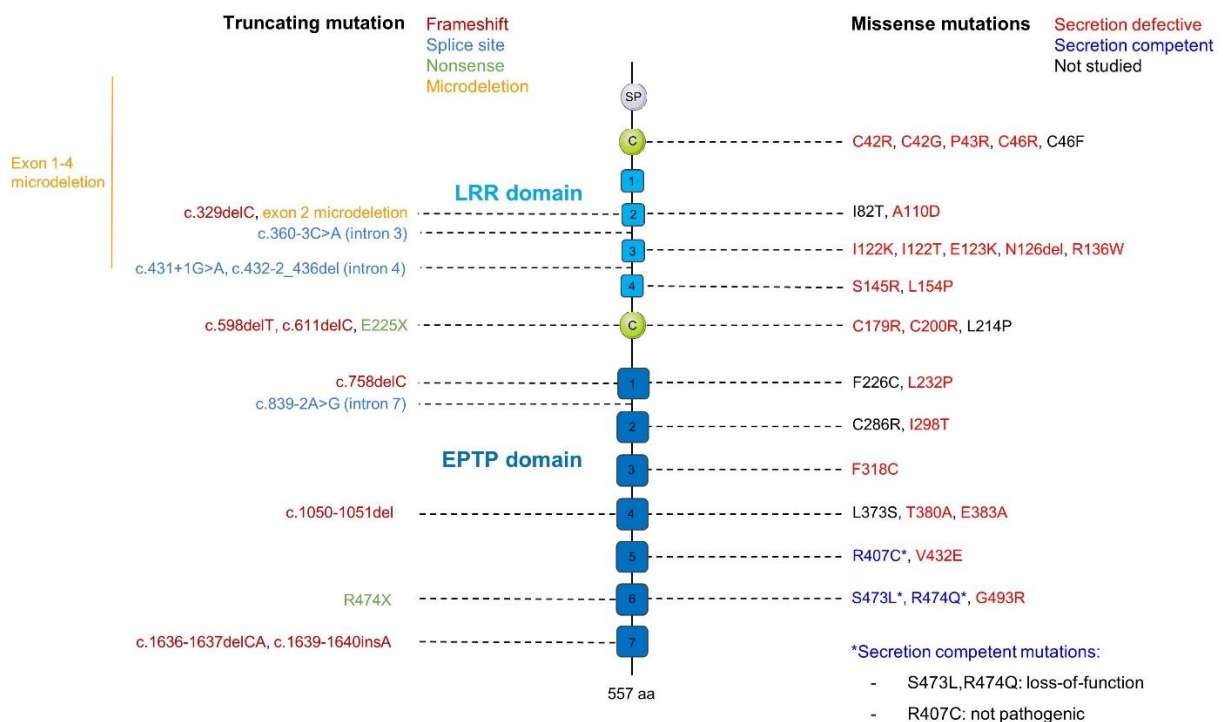


Figure 13. Organisation des domaines de LGI1 et localisation des mutations associées à l'ADLTE. Les mutations sont réparties le long de toute la séquence du gène, sans préférence de région. La liste des mutations a été établie à partir de Boillot et Baulac, 2016 (Boillot et Baulac 2016) et Yamagata et Fukai, 2020 (Yamagata et Fukai 2020). SP : peptide signal (clivé dans la protéine mature) ; C : cluster de cystéines.

Le domaine LRR de LGI1 est composé de quatre motifs riches en leucine, chacun de 24 acides aminés, et possède un cluster de cystéines de chaque côté. Il est codé par les exons 1 à 6 (Somerville et al. 2000; Gu et al. 2002; Yamagata et al. 2018). Le domaine EPTP est codé par les exons 7 et 8. Il contient une hélice bêta à sept pales, chaque pale étant composée de feuillets β antiparallèles à quatre brins d'environ 45 acides aminés (Scheel 2002; Staub et al. 2002; Leonardi et al. 2011; Yamagata et al. 2018). Les domaines LRR et EPTP sont connus pour participer à des interactions protéine-protéine (Kobe et Kajava 2001; Staub et al. 2002).

3.1.2 Expression de LGI1

Dans les tissus humains et de souris, les transcrits *LGII* sont fortement exprimés dans le cerveau, exprimés de manière intermédiaire dans la moelle épinière et faiblement exprimés dans les nerfs périphériques. Ils ne sont pas détectés dans le cœur, le foie, les poumons, le placenta, le rein ou le pancréas (Fig. 14A) (Chernova et al. 1998; Gu et al. 2002; Morante-Redolat 2002; Furlan et al. 2006). Dans le cerveau de souris, l'expression de *LGII* est plus élevée dans les neurones que dans les cellules gliales (Morante-Redolat 2002; Head et al. 2007; Xie et al. 2018). *LGII* est exprimé à la fois par les neurones excitateurs, et par les neurones inhibiteurs. En effet, une technique de double hybridation *in situ* a montré que dans l'hippocampe de souris, l'ARNm *LGII* était coexprimé avec vGluT1 (*vesicular glutamate transporter 1*), spécifique des neurones excitateurs, et avec *GAD67* (*glutamate decarboxylase 67kD*), un marqueur des cellules inhibitrices (Ohkawa et al. 2013).

Chez les souris adultes, les niveaux d'ARNm *LGII* sont les plus élevés dans l'hippocampe et le néocortex. Dans l'hippocampe, *LGII* est fortement exprimée dans les cellules pyramidales de la région CA3 et les cellules granulaires du gyrus denté, et plus faiblement dans la région CA1 (Kalachikov et al. 2002; Senechal et al. 2005; Herranz-Pérez et al. 2010; Smedfors et al. 2018). L'application de LCR et d'IgG de sérum de patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 sur des coupes de cerveau de souris montre un fort marquage dans le neuropile hippocampique (Fig. 14B) (Irani et al. 2010; Ohkawa et al. 2013; Dalmau 2016). Dans des tranches d'hippocampe de souris *LGII*^{-/-}, la réexpression virale de LGI1 a permis une expression à la fois dans les axones et dans les dendrites, de manière spatialement restreinte, suggérant une sécrétion paracrine (Lovero et al. 2015). A l'échelle cellulaire, LGI1 est enrichie au niveau des synapses (Boillot et al. 2016; Fukata et al. 2021) et du segment initial de l'axone des neurones hippocampiques (Seagar et al. 2017; Hivert et al. 2019) (Fig. 14C).

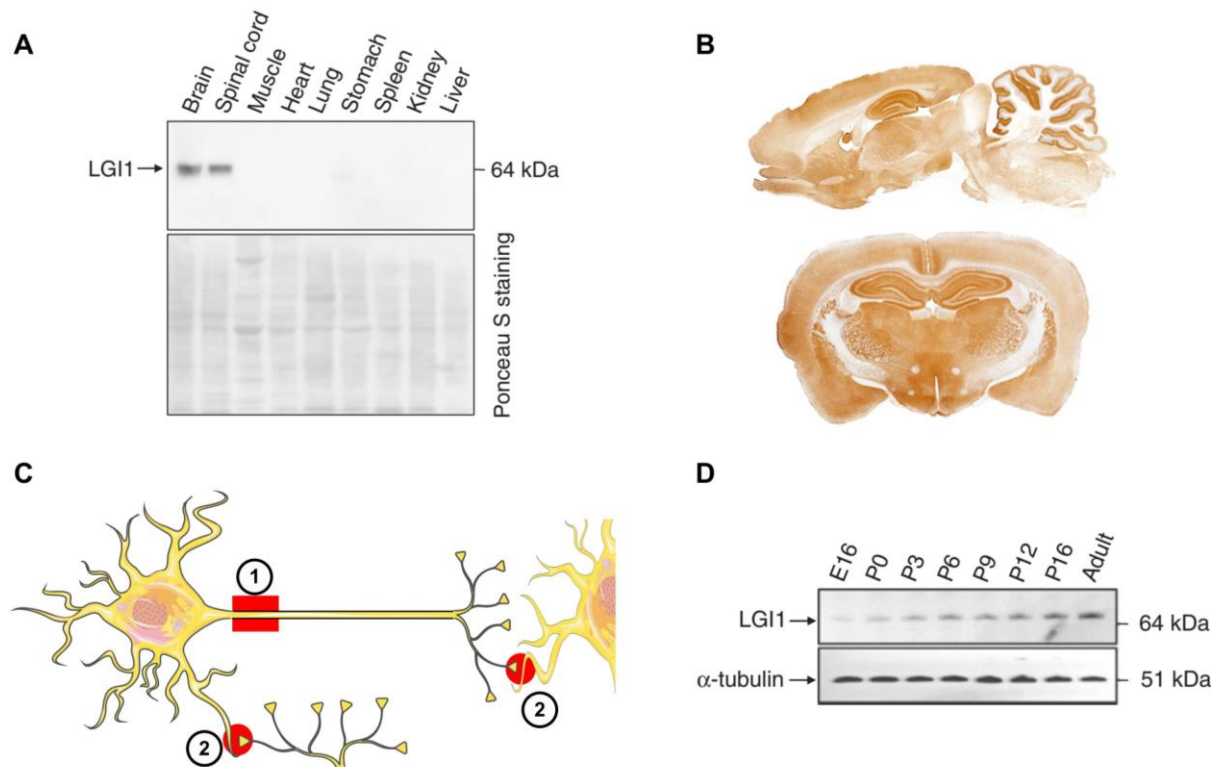


Figure 14. Profil d'expression de la protéine LGI1. (A) La protéine LGI1 est exprimée quasiment exclusivement dans le système nerveux central. (B) Coupes sagittales et coronales de rat, marquées avec des anticorps anti-LGI1 issus de patients, montrant une expression ubiquitaire de la protéine LGI1, et un fort marquage dans le neuropile de l'hippocampe. (C) A l'échelle neuronale, LGI1 est enrichi au niveau des synapses et du segment initial de l'axone. (D) La protéine LGI1 apparaît d'abord à la fin du développement embryonnaire (E15) et son expression augmente jusqu'à l'âge adulte. Les images sont extraites de (Chabrol et al. 2010) (A, D), (Dalmau 2016) (B) et Servier Medical Art (C).

L'ARNm *LGII* est exprimé dans différentes régions néocorticales, avec une variabilité entre les couches : les couches corticales V-VI ont des niveaux d'expression plus élevés que les couches I-IV. Chez les souris adultes, les transcrits *LGII* sont détectés dans l'amygdale, le cortex piriforme, le cortex entorhinal et le cervelet. Dans le cervelet, les anticorps anti-LGI1 de patients induisent un marquage au niveau des synapses des cellules en paniers et sur le soma des cellules de Purkinje. Les transcrits *LGII* sont absents, ou faiblement exprimés, dans le bulbe olfactif, le diencephale et le tronc cérébral (Kalachikov et al. 2002; Fukata et al. 2006; Furlan et al. 2006; Herranz-Pérez et al. 2010; Irani et al. 2010; Smedfors et al. 2018).

Il a été montré, à l'aide d'analyses Western Blot de lysats de cerveaux de souris, que l'expression de LGI1 augmentait au cours du développement (Fig. 14D). La protéine LGI1 apparaît d'abord à la fin du développement embryonnaire (E15) et son expression augmente jusqu'à l'âge adulte (Fukata et al. 2006; Ribeiro et al. 2008; Chabrol et al. 2010; Thomas et al.

2010; Kusuzawa et al. 2012; Xie et al. 2018). Au cours de l'embryogenèse, l'expression de LGI1 n'est pas limitée aux neurones différenciés mais est plutôt diffuse (Silva et al. 2011; Kusuzawa et al. 2012). L'expression diffuse de LGI1 semble être régulée de manière spatiale et temporelle (Silva et al. 2011), ce qui soutient l'idée que LGI1 joue un rôle important dans le développement normal du cerveau (cf. paragraphe 3.2.1).

3.1.3 Partenaires moléculaires de LGI1

Un réseau de protéines associées à LGI1

Les partenaires protéiques de LGI1 ont été identifiés par purification d'affinité chez des souris knock-in (KI) exprimant une protéine LGI1 marquée par un épitope. Les protéines partenaires du complexe précipité, liées à LGI1, ont été identifiées par spectrométrie de masse et Western Blot (Fukata et al. 2010). Les protéines les plus abondantes étaient ADAM22 (*A Disintegrin And Metalloproteinase 22*) et ADAM23. D'autres protéines, moins abondantes, incluaient ADAM11, des protéines post-synaptiques de la famille des MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinase Proteins* : PSD95, PSD93 et SAP97), les canaux Kv1, des protéines d'échafaudage pré-synaptiques (CASK et Lin7) et la protéine 14-3-3, un partenaire d'ADAM22 (Gödde et al. 2006; Fukata et al. 2010). Plusieurs des protéines identifiées partagent certains attributs fonctionnels avec LGI1. En effet, comme nous le décrirons, l'inactivation génétique de LGI1 entraîne chez l'animal des crises d'épilepsie généralisées dans les premiers jours après la naissance (Chabrol et al. 2010; Fukata et al. 2010; Yu et al. 2010). Des crises similaires ont été observées chez des animaux après inactivation des gènes *ADAM11* (Kole et al. 2015), *ADAM22* (Sagane et al. 2005), *ADAM23* (Owuor et al. 2009) et *KCNA1* et *KCNA2* (qui codent pour des sous-unités du canal Kv1 (Smart et al. 1998; Brew et al. 2007)).

Les récepteurs membranaires de LGI1 : ADAM11, ADAM22, ADAM23 et le récepteur Nogo 1.

- *Les protéines ADAM*

Plusieurs membres de la famille des protéines ADAM participent au complexe protéique multimoléculaire associé à LGI1 (Fukata et al. 2010). Le domaine extracellulaire des protéines ADAM contient un domaine métalloprotéinase, un domaine disintegrin, un domaine riche en

cystéine et un domaine EGF (*epidermal growth factor*). Trois protéines ADAM (ADAM22, ADAM23 et ADAM11) peuvent se lier à LGI1, et sont exprimées exclusivement dans le SNC (Edwards et al. 2008). Le domaine métalloprotéinase de ces trois protéines est catalytiquement inactif, en raison de l'absence d'un motif de liaison au zinc causé par l'absence d'acides aminés critiques à ce site (Sagane et al. 1999; Edwards et al. 2008; Liu et al. 2009).

Récemment, une immunoprécipitation basée sur la protéine ADAM22 marquée par un épitope a révélé un complexe protéique très similaire à celui purifié par LGI1 (Fukata et al. 2021). En effet, le complexe protéique obtenu comprenait des membres de la famille LGI (LGI1 à LGI4), des protéines ADAM (ADAM11, ADAM22 et ADAM23), des protéines MAGUKs et des protéines d'échafaudage pré- et post-synaptiques, des canaux Kv1 pré-synaptiques et la protéine 14-3-3 partenaire d'ADAM22. Ces fortes similitudes entre les complexes protéiques purifiés avec LGI1 ou ADAM22 suggèrent qu'ils font partie de la même voie.

PSD95, une protéine de la famille des MAGUKs, est un composant majeur du complexe protéique multimoléculaire associé à LGI1 et à ADAM22. PSD95 sert d'ancrage post-synaptique pour les protéines des synapses excitatrices, et participe à la synaptogenèse et à la plasticité synaptique (El-Husseini et al. 2000). Le complexe protéique retrouvé par immunoprécipitation basée sur PSD95 contient LGI1 et ADAM22, mais pas ADAM11 ni ADAM23 (Fukata et al. 2006). Cette différence pourrait être expliquée par le fait qu'une des isoformes d'ADAM22 contient un motif de liaison PDZ C-terminal intracellulaire qui interagit avec le troisième domaine PDZ de PSD95. Ce motif de liaison PDZ est absent d'ADAM11 et d'ADAM23 (Owuor et al. 2009). La liaison à PSD95 suggère qu'ADAM22 et LGI1 sont localisés du côté post-synaptique de la fente synaptique. De plus, le transport axonal d'ADAM23 est en grande partie antérograde, tandis qu'ADAM22 est principalement transporté dans un sens rétrograde, ce qui fournit un support supplémentaire pour une localisation post-synaptique d'ADAM22 et suggère qu'ADAM23 pourrait être pré-synaptique (Hivert et al. 2019). Cependant, cette localisation pré- ou post-synaptique préférentielle n'a pour le moment jamais été confirmée. De plus, ADAM22 est également enrichi dans le compartiment axonal, pré-synaptique, au niveau du segment initial de l'axone (Hivert et al. 2019).

Les protéines ADAM ne sont pas seulement des récepteurs membranaires nécessaires pour ancrer LGI1 à la membrane cellulaire. Elles agissent aussi comme des protéines chaperonnes de LGI1, et participent à ses processus de maturation et de N-glycosylation (Hivert et al. 2019). De plus, ADAM22 et ADAM23 colocalisent avec LGI1 dans les vésicules de

transport axonal (Hivert et al. 2019), suggérant des interactions interdépendantes pour leur transport et leur distribution subcellulaire. L'expression membranaire de LGI1 est fortement diminuée chez les souris *ADAM22^{-/-}* et *ADAM23^{-/-}* (Yokoi et al. 2015), tout comme l'expression d'*ADAM22* et d'*ADAM23* chez les animaux *LGI1^{-/-}* (Fukata et al. 2010; Yokoi et al. 2015), fournissant une preuve supplémentaire des interactions entre les protéines de la famille ADAM et LGI1.

- *Le récepteur Nogo 1 (NgR1)*

NgR1, est codée par le gène *RTN4R*. Il s'agit d'une protéine de 473 acides aminés, qui contient un peptide signal, huit domaines LRR, un domaine riche en cystéine du côté C-terminal des domaines LRR, une région unique et un site d'ancrage membranaire de glycosylphosphatidylinositol (Fournier et al. 2001). NgR1 se lie directement à LGI1 (Thomas et al. 2010, 2018). Il co-immunoprécipite avec ADAM22 à partir de lysat de cerveau de rat, suggérant l'existence d'interactions fonctionnelles (Thomas et al. 2010). Cependant, il n'est pas retrouvé dans le complexe protéique multimoléculaire obtenu après purification de LGI1, ni dans ceux purifiés par ADAM22, Kv1, ou PSD95 (Fukata et al. 2006, 2010, 2021; Schulte et al. 2006). L'absence de NgR1 dans ces complexes protéiques est difficile à expliquer. Il serait possible que la liaison de NgR1 à LGI1 soit plus faible que celle aux récepteurs ADAM et aux protéines associées.

Le complexe NgR1-ADAM22 facilite la liaison de LGI1 à ADAM22 (Thomas et al. 2010), mais LGI1 se lie aussi de manière indépendante à NgR1 dans des cellules HEK293T transfectées (Thomas et al. 2010). LGI1 agit comme un inhibiteur compétitif de NgR1, en antagonisant les effets de l'inhibition de croissance médiée par les ligands Nogo66, MAG (*myelin-associated glycoprotein*) et OMPG (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*) (Thomas et al. 2010).

Assemblages trans-synaptiques de LGI1

Les études d'immunoprécipitation suggèrent que LGI1 interagit avec des protéines pré- et post-synaptiques. En effet, LGI1 est co-immunoprécipitée avec des anticorps anti-Kv1.1 pré-synaptiques (Schulte et al. 2006), et avec des anticorps anti-PSD95 post-synaptiques (Fukata et al. 2006). De plus, des protéines pré- et post-synaptiques sont présentes dans le complexe multimoléculaire purifié par LGI1 (Fukata et al. 2010). ADAM22 et ADAM23 co-

immunoprécipitent dans des lysats de cerveaux de souris sauvage, mais pas dans ceux issus de souris *LGI1*^{-/-} (Fukata et al. 2010), ce qui suggère que la protéine *LGI1* forme un pont trans-synaptique entre les protéines *ADAM23* et *ADAM22* (Fukata et al. 2010).

Des techniques de super-résolution ont récemment fourni plus de détails sur les interactions entre *LGI1* et *ADAM22*, en utilisant un modèle animal KI, exprimant *ADAM22* marqué par un épitope (Yamagata et al. 2018). Des complexes *ADAM22-LGI1* 1:1 (dimères), 2:2 (tétramères) et 3:3 (hexamères) ont été observés par cryo-microscopie électronique en solution, et représentaient respectivement 65%, 30% et 5% du nombre total de complexes. La cristallisation de l'hétéro-tétramère 2:2 *ADAM22-LGI1-LGI1-ADAM22* (Fig. 15A) (Yamagata et al. 2018) a montré que *LGI1* se lie au domaine de type métalloprotéinase d'*ADAM22* via son domaine EPTP. Le domaine *LGI1-EPTP* seul est suffisant pour médier la liaison avec *ADAM22*, par des interactions entre les acides aminés Trp398, Tyr408 et Tyr409 d'*ADAM22* et une poche hydrophobe dans l'hélice bêta du domaine EPTP de *LGI1*. Le complexe *LGI1-ADAM22* se dimérise par une liaison entre les domaines LRR de deux molécules *LGI1*, formant ainsi des hétérotétramères dimères de dimères 2:2 (Yamagata et al. 2018).

Cette dimérisation est cohérente avec un rôle trans-synaptique du complexe *ADAM22-LGI1* (Fig. 15B). La longueur de l'hétérotétramère 2:2 est estimée à 19 nm (Yamagata et al. 2018), ce qui est proche de la taille de la fente synaptique (Savtchenko et Rusakov 2007). Différents complexes *LGI1-ADAM* pourraient être possibles puisque *LGI1* peut se lier de manière similaire à *ADAM22*, *ADAM23* et *ADAM11* (Leonardi et al. 2011; Yamagata et al. 2018). Cependant, il n'y a pas pour le moment de preuves expérimentales montrant l'existence du complexe trans-synaptique *LGI1-ADAM22 in vivo*, ou montrant l'existence d'autres hétérotétramères composés de *LGI1* et d'une ou plusieurs autres protéines *ADAM*. *ADAM23* étant supposée localisée préférentiellement du côté pré-synaptique, à l'inverse d'*ADAM22* supposée post-synaptique, un hétérotétramère *ADAM23-LGI1-LGI1-ADAM22* pourrait associer ces protéines de manière trans-synaptique (Fig. 15B).

En plus du complexe trans-synaptique, *LGI1* est également enrichie au niveau du segment initial de l'axone, où il colocalise avec *ADAM22* et *Kv1* (Seagar et al. 2017; Hivert et al. 2019). Les complexes *LGI1-ADAM* de ce site pourraient impliquer des assemblages 1:1 ou 3:3 (Fig. 15 C et D).

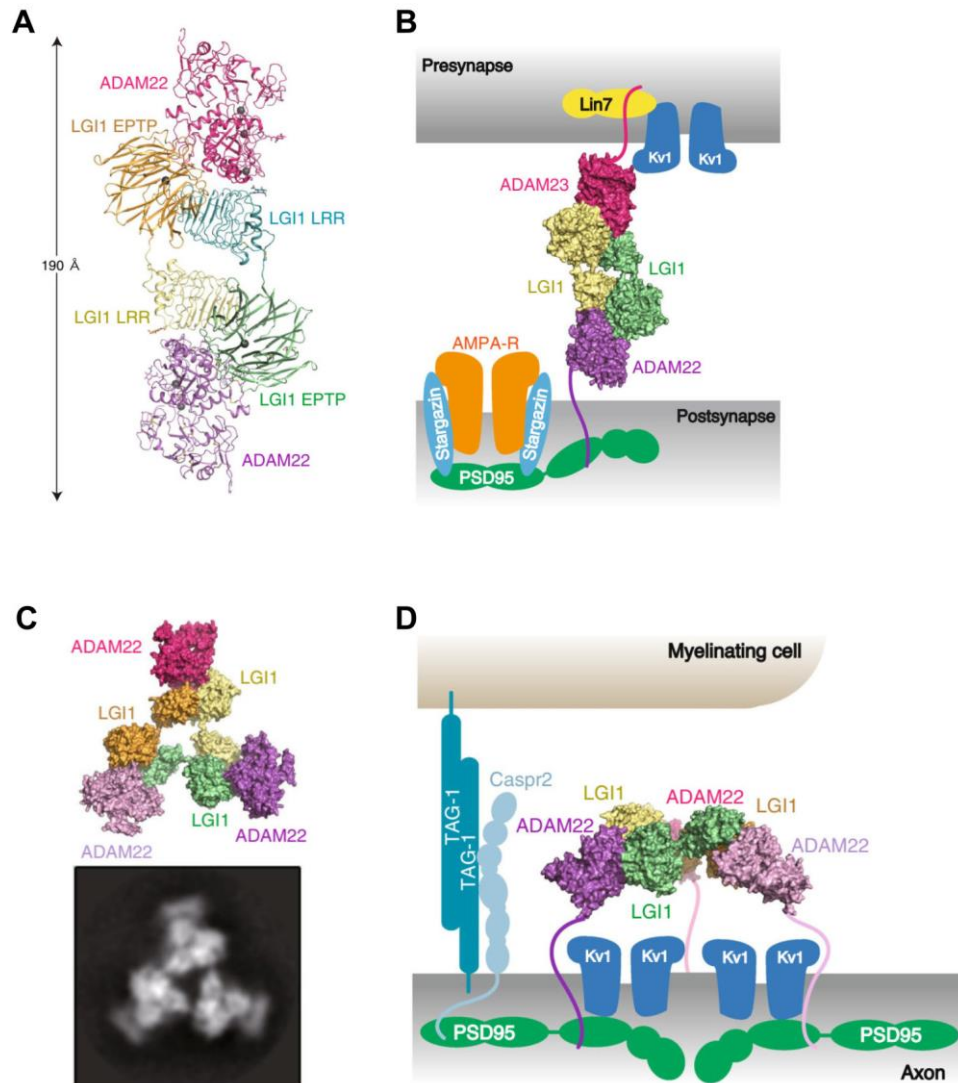


Figure 15. Assemblages du complexe LGI1-ADAM22. Figure adaptée de (Yamagata et Fukai 2020). (A) Structure cristallisée de l'hétérotétramère ADAM22-LGI1-LGI1-ADAM22. (B) Modèle de la liaison trans-synaptique, qui pourrait être médiée par un hétérotétramère ADAM23-LGI1-LGI1-ADAM22. Les interactions indirectes avec Kv1 et avec les AMPA-R sont discutées dans la partie 3.2.2. (C) Modélisation de l'assemblage 3:3 de LGI1-ADAM22 (en haut), basée sur son observation par cryomicroscopie électronique (en bas). (D) Modèle de la liaison du complexe LGI1-ADAM22 3:3 au segment initial de l'axone.

3.2 Fonctions de LGI1

3.2.1 Rôles de LGI1 au cours du développement

LGI1 est nécessaire pour un développement cérébral normal

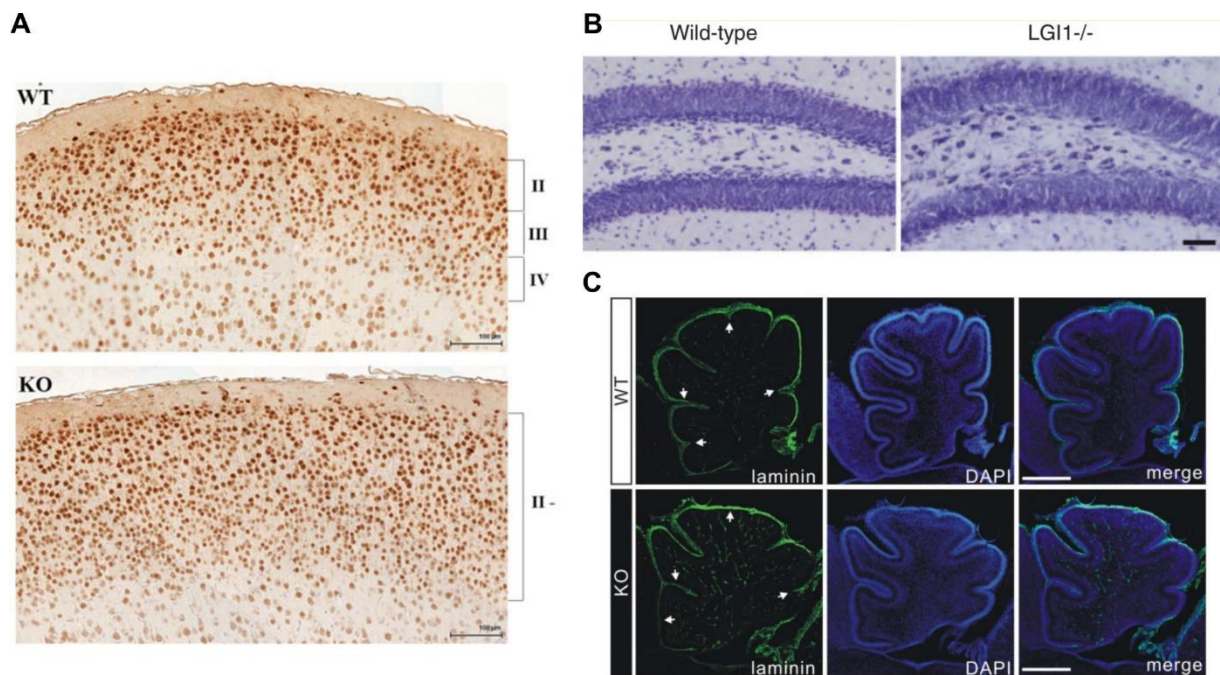


Figure 16. Anomalies morphologiques cérébrales chez les souris *LGI1*^{-/-}. (A) Exemple d'anomalies d'organisation corticale observée chez une souris *LGI1*^{-/-} (KO). Le marquage NeuN du cortex somatosensoriel montre une densité neuronale anormale et une désorganisation des couches corticales. Barre horizontale : 100µm. (B) Exemple de la dispersion des cellules granulaires du gyrus denté, avec une coloration Nissl. Barre horizontale : 160µm. (C) Exemple de foliation anormale du cervelet chez une souris *LGI1*^{-/-} le jour de sa naissance. La coupe est marquée au DAPI et à la laminine-1. Alors que le déficit de foliation est évident chez la souris *LGI1*^{-/-} (flèches blanches), le marquage à la laminine-1 est normal et continu le long de la surface cérébelleuse. Barre horizontale : 200µm. Les images sont extraites de (Silva et al. 2015) (A), (Chabrol et al. 2010) (B), et (Xie et al. 2015) (C).

LGI1 est exprimée tardivement au cours du développement chez la souris, et son expression augmente pour atteindre un pic au cours des deux premières semaines postnatales (Fig. 16A). Le rôle de LGI1 dans le développement cérébral a été suggéré à la suite d'études retrouvant des anomalies structurelles chez des animaux pour lesquels l'expression de LGI1 a été supprimée. Le cortex des souris *LGI1*^{-/-} âgées de 7 à 20 jours montre une désorganisation diffuse des couches neuronales corticales (Fig. 16A) (Silva et al. 2015). Un tel aspect, compatible avec une dysplasie corticale, est également induit par l'inactivation conditionnelle de LGI1 dans les

cellules exprimant la nestine, mais pas dans les cellules GFAP, les cellules CAMK2a ou les cellules parvalbumine (Silva et al. 2019). Cela suggère que les malformations corticales résulteraient d'une perte de la fonction LGI1 dans les précurseurs neuronaux, qui expriment la nestine, au cours du développement. Chez une autre lignée de souris $LGI1^{-/-}$, aucune malformation néocorticale n'a été observée, mais une perte neuronale a été détectée dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, et l'épaisseur de la couche de cellules granulaires était augmentée, associée une dispersion neuronale (Fig. 16B) (Chabrol et al. 2010). Des atteintes du cervelet ont également été décrites chez des souris $LGI1^{-/-}$ âgées de 2 à 4 jours, sous forme de défauts de foliation cérébelleuse, ainsi que d'une réduction de l'épaisseur de la couche externe de cellules granulaires (Fig. 16C) (Xie et al. 2015).

LGI1 favorise la croissance des neurites, la formation et la maturation des synapses

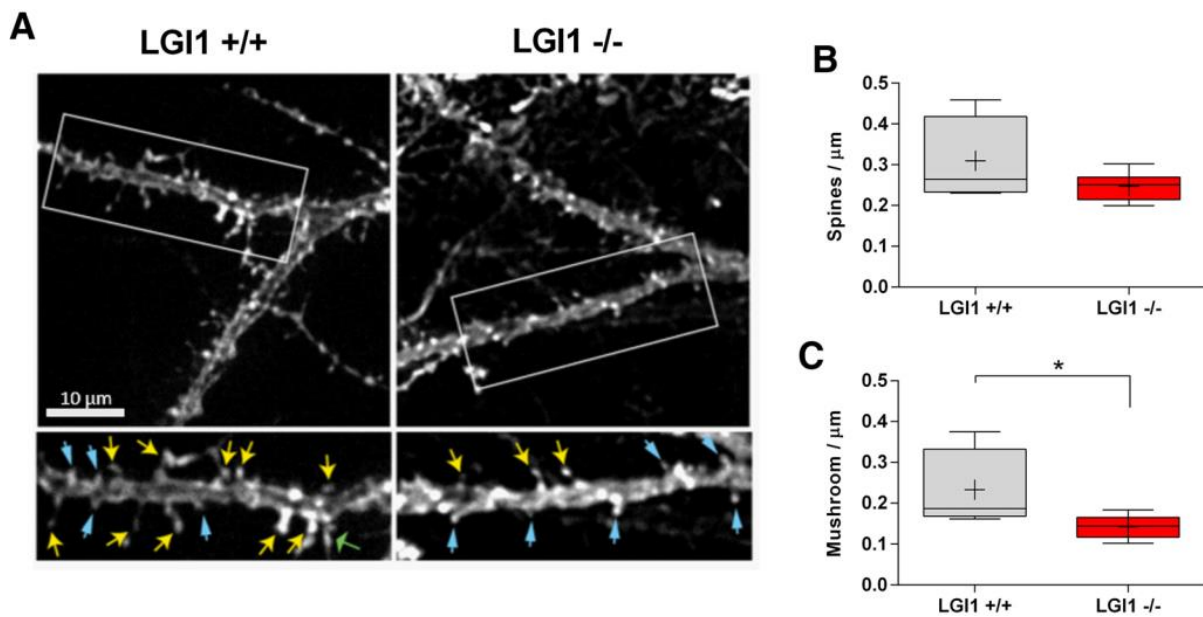


Figure 17. La densité des épines dendritiques est altérée chez les souris $LGI1^{-/-}$ (Thomas et al. 2018). (A) Exemples d'images d'épines dendritiques marquées au DiI, de neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe de souris âgées de 10 jours, $LGI1^{+/+}$ (à gauche) et $LGI1^{-/-}$ (à droite). Les flèches indiquent les épines « champignon » (jaune), les épines trapues (bleu) et les épines fines (vert). (B) La quantification de la densité d'épines par μm de dendrite ne montre pas de différence significative entre les souris $LGI1^{-/-}$ et les contrôles. (C) La proportion d'épines « champignon » est significativement inférieure dans les tranches de souris $LGI1^{-/-}$ par rapport aux contrôles.

LGI1 participe au contrôle du nombre de synapses et de leur activité. Chez les souris $LGI1^{-/-}$, les neurones corticaux et hippocampiques ont moins de synapses, et la signalisation synaptique est réduite (Fig. 17) (Silva et al. 2015; Thomas et al. 2018). À l'inverse, l'application de LGI1

sur des neurones hippocampiques en culture pendant 6 jours augmente le nombre de synapses (Thomas et al. 2018). De plus, LGI1 stimule la croissance dendritique et axonale des neurones en culture (Owuor et al. 2009; Thomas et al. 2010).

Ces effets sur la formation et la maturation synaptique, et sur la croissance des neurites, pourraient être causés par l'interaction entre LGI1 et le récepteur Nogo 1 (NgR1, cf. paragraphe 3.1.3) (Thomas et al. 2018). La liaison des ligands agonistes dérivés de la myéline au récepteur NgR1 entraîne une activation de la signalisation RhoA. L'activation de cette GTPase permet de limiter le nombre de synapses au cours du développement (Wills et al. 2012), et est cruciale pour la morphogénèse normale des neurones (Luo 2000). Les neurones hippocampiques des souris NgR1^{-/-} ont plus de synapses que les souris contrôles (Thomas et al. 2018). Des travaux sur des souris LGI1^{-/-} suggèrent que LGI1 inhibe l'activation de RhoA *via* NgR1 (Thomas et al. 2018). Ainsi, l'équilibre NgR1-LGI1 régulerait l'activité de RhoA au cours du développement, et affecterait ainsi la formation et la fonction synaptiques, et la croissance des neurites.

LGI1 pourrait également affecter la maturation neuronale par des interactions avec les protéines de la famille ADAM. En effet, il a été montré que les interactions LGI1-ADAM22 et LGI1-ADAM23 influencent le développement neuronal (Owuor et al. 2009). De plus, NgR1 et ADAM22 interagissent directement (Thomas et al. 2010). Toutefois, nous ne savons pas si LGI1 se lie de façon indépendante à ADAM et NgR1, ou si ADAM et NgR1 fonctionnent comme co-récepteurs de LGI1, ces deux possibilités n'étant pas exclusives.

Ces résultats sont à nuancer, car deux équipes, utilisant des souches de souris LGI1^{-/-} distinctes de celles décrites dans le paragraphe ci-dessus, ont montré par microscopie électronique une absence d'altération de la croissance dendritique et de la synaptogénèse (Yokoi et al. 2015; Boillot et al. 2016). Les raisons de ces divergences sont inconnues et des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre les différences entre les différentes souches de souris LGI1^{-/-}.

LGI1 participe à la régulation de la myélinisation neuronale

Des observations par microscopie électronique ont montré que la myélinisation était réduite dans le SNC et le SNP de souris LGI1^{-/-}, suggérant que LGI1 faciliterait la myélinisation (Silva et al. 2010). De plus, des données récentes ont montré que LGI1 contrôle la différenciation de cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Xie et al. 2018). Chez les animaux LGI1^{-/-}, l'expression

de TSC1 (*tuberous sclerosis complex 1*) est réduite, ce qui augmente l'activité du complexe mTOR1 (*mechanistic target of rapamycin 1*) dans les oligodendrocytes. Étant donné que l'activité du complexe mTOR1 est connue pour diminuer la myélinisation du SNC (Lebrun-Julien et al. 2014), une suractivation chez les souris LGI1^{-/-} pourrait être responsable de la réduction de la myélinisation (Xie et al. 2018).

3.2.2 Rôles de LGI1 dans le contrôle de canaux ioniques neuronaux

LGI1 régule le courant K⁺ voltage-dépendant pré-synaptique via les canaux Kv1

Les canaux Kv1 sont une famille de canaux K⁺, qui sont exprimés sous forme de tétramères protéiques de 4 sous-unités alpha, chacune composée de 6 domaines transmembranaires. Huit sous-unités alpha ont été décrites jusqu'à présent (Kv1.1 - Kv1.8). Elles peuvent s'assembler en homotétramères ou hétérotétramères. Différentes combinaisons de sous-unités sont associées à des différences dans la biophysique, la pharmacologie et la dynamique des courants K⁺ ainsi que dans les sites d'insertion membranaire et de la mobilité des canaux (Ovsepian et al. 2016). Les sous-unités alpha peuvent être associées à des sous-unités bêta intracellulaires accessoires, qui modifient les propriétés des courants de ces canaux (Dodson et Forsythe 2004). Les canaux Kv1 sont exprimés de manière ubiquitaire et présentent une grande diversité d'expression, de topographie et d'association de sous-unités (Trimmer 2015; Ovsepian et al. 2016). A l'échelle neuronale, les niveaux d'expression sont les plus élevés dans les axones et les terminaisons synaptiques, mais les canaux sont aussi présents au niveau du soma et des dendrites. En particulier, les canaux Kv1 sont enrichis dans les segments initiaux des axones, où ils colocalisent avec LGI1 (Fig. 15D) (Seagar et al. 2017; Hivert et al. 2019).

Les courants K⁺ médiés par les canaux Kv1 s'activent à des potentiels membranaires proches du seuil de décharge des potentiels d'action (Guan et al. 2006), ce qui empêche l'hyperexcitabilité en limitant et en retardant la décharge neuronale (Guan et al. 2007; Cudmore et al. 2010). Les canaux Kv1 contrôlent la forme, la synchronisation et la fréquence des potentiels d'action, ainsi que la libération de neurotransmetteurs aux terminaisons axonales (Yellen 2002; Cudmore et al. 2010; Ovsepian et al. 2013; Guan et al. 2018). Les sous-unités Kv1.1 favorisent une activation rapide des courants Kv1 en réponse à une dépolarisation, qui s'inactive lentement (Ovsepian et al. 2016). Son activité est bloquée par l'inhibiteur spécifique

dendrotoxine-K (Wang et al. 1999; Harvey et Robertson 2004), retrouvée dans le venin du mamba noir (*dendroaspis polylepis*), qui est aujourd'hui synthétisée artificiellement.

LGI1 affecte l'expression et les propriétés fonctionnelles de Kv1. La co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-LGI1 précipite les canaux Kv1, et réciproquement la protéine LGI1 a été isolée par co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-Kv1.1 (Schulte et al. 2006; Fukata et al. 2010). Cependant, LGI1 ne se lie pas directement à Kv1, mais les interactions sont médiées indirectement *via* des interactions entre des protéines de la famille ADAM et MAGUK (Fukata et al. 2021). LGI1 n'interagit pas de la même manière avec les différentes sous-unités de Kv1. Chez les souris LGI1^{-/-}, l'expression de Kv1.1 et Kv1.2, était réduite de plus de 50% (Seagar et al. 2017; Zhou et al. 2018). Ce n'était pas le cas des sous unités Kv1.4 et Kv1.6, dont les niveaux d'expression n'étaient pas significativement différents des souris contrôles (Seagar et al. 2017; Zhou et al. 2018).

Les interactions fonctionnelles entre LGI1 et Kv1.1 ont été décrites pour la première fois dans un système d'expression hétérologue (Schulte et al. 2006). LGI1 potentialisait les courants K⁺ en bloquant l'inactivation rapide des canaux Kv1.1, médiée par la sous-unité bêta Kvβ1. De même, LGI1, associée à ADAM22, potentialisait les courants K⁺ dans les cellules HEK293 transfectées avec Kv1.1/Kv1.4 (Lancaster et al. 2019). De plus, dans les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe de souris LGI1^{-/-}, l'expression axonale et le courant des canaux Kv1.1 étaient fortement diminués, ce qui augmentait l'excitabilité neuronale (Fig. 18 A et B) (Seagar et al. 2017). La dendrotoxine-K (DTX), antagoniste spécifique de Kv1.1, augmente l'excitabilité neuronale et la libération de transmetteurs dans les neurones de souris sauvages, mais pas dans les neurones de souris LGI1^{-/-} (Fig. 18 C et D). De plus, la quantité de courant inhibée par la DTX est plus faible chez les souris LGI1^{-/-} que chez les souris contrôles (Fig. 18E) (Seagar et al. 2017). Ces résultats confirment que LGI1 interagit avec Kv1.1, et que l'inhibition de Kv1.1 chez les souris LGI1^{-/-} est similaire à celle produite par la DTX.

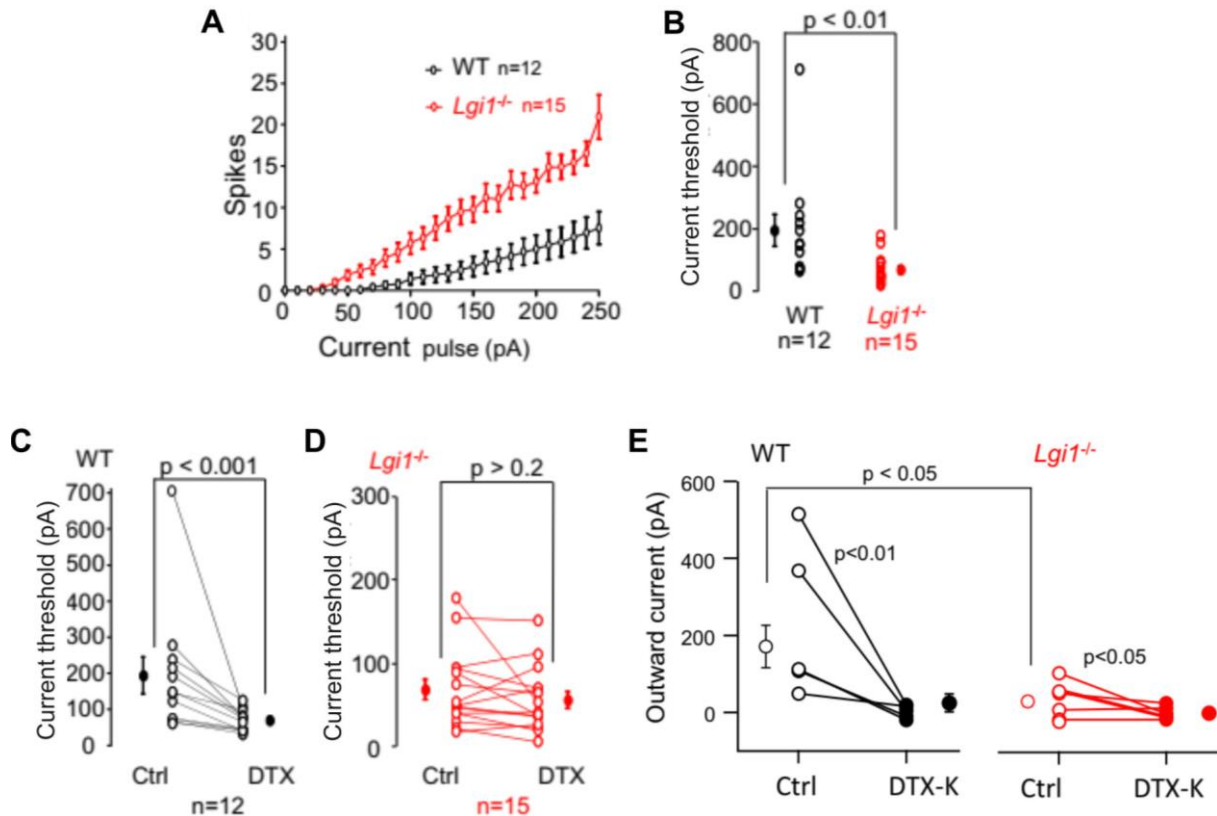


Figure 18. L'inactivation de LGI1, et la toxine DTX, partagent une action commune sur Kv1.1. Figure adaptée de (Seagar et al. 2017). (A, B) L'excitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe est augmentée. (A) Représentation du nombre de potentiels d'actions évoqués, en fonction du courant injecté, pour un neurone représentatif des souris sauvages (WT) et $LGI1^{-/-}$. (B) Courant seuil calculé pour chaque groupe de neurone, montrant une diminution significative chez les neurones des souris $LGI1^{-/-}$. (C, D) La DTX augmente l'excitabilité neuronale des souris WT (C), mais pas des souris $LGI1^{-/-}$ (D). (E) Comparaison des courants potassiques évoqués à -30mV avec et sans DTX, chez des souris WT et $LGI1^{-/-}$. La quantité de courant inhibée par la DTX est plus faible chez les souris $LGI1^{-/-}$ que chez les souris contrôles.

LGI1 régule les récepteurs AMPA post-synaptiques

Les récepteurs AMPA (AMPA-R) sont des canaux ioniques activés par le glutamate, qui participent à la transmission synaptique rapide et excitatrice dans le cerveau. Ce sont des hétérotétramères formés par divers assemblages des sous-unités GluR1 à GluR4. La libération de glutamate par le bouton pré-synaptique conduit à l'activation des AMPA-R, et se traduit par un flux de cations, principalement du Na^+ , à travers un pore membranaire, déclenchant un courant exciteur post-synaptique (*excitatory post-synaptic current*, EPSC) (Henley et al. 2021).

Le complexe protéique multimoléculaire identifié par immunoprécipitation de LGI1 ne contient pas d'AMPA-R, mais il contient PSD95 et SAP97 (Fukata et al. 2010), qui interagissent tous deux avec les AMPA-R. PSD95 est une protéine d'échafaudage, qui stabilise les AMPA-R au niveau de la membrane post-synaptique (El-Husseini et al. 2000). Il se lie, par ses deux premiers domaines PDZ, à la protéine stargazine, qui à son tour se lie aux AMPA-R (Schnell et al. 2002). SAP97 est une autre protéine d'ancrage de la famille des MAGUK, qui se lie directement, par son second domaine PDZ, à un motif de liaison au PDZ, sur l'extrémité C-terminale de la sous-unité GluR1 (von Ossowski et al. 2006). Une isoforme d'ADAM22 possède également un motif de liaison au PDZ cytoplasmique C-terminal, qui se lie au troisième motif PDZ de PSD95 (Fig. 19A) (Fukata et al. 2006).

La surexpression de PSD95 augmente le nombre d'AMPA-R exprimés au niveau des sites post-synaptiques et augmente ainsi l'amplitude des événements synaptiques (El-Husseini et al. 2000; Schnell et al. 2002). Cet effet est aboli chez les souris LGI1^{-/-} et chez les souris KI exprimant une version mutée d'ADAM22 sans son site de liaison au PDZ de PSD95 (Lovero et al. 2015; Fukata et al. 2021). Ces données suggèrent que LGI1 et ADAM22 sont nécessaires pour l'ancrage membranaire des AMPA-R médié par PSD95. La stabilisation post-synaptique des AMPA-R est donc indirectement liée à LGI1, *via* les complexes ADAM22-PSD95-stargazine, ou ADAM22-PSD95-SAP97 (Fig. 19A).

LGI1 participe à la régulation des courants synaptiques médiés par les AMPA-R. L'application de la protéine LGI1 sur des tranches d'hippocampe de rat augmente l'amplitude des EPSC (Fukata et al. 2006). A l'inverse, les courants AMPA-R sont diminués dans les tranches de souris LGI1^{-/-}, et de souris exprimant une protéine ADAM22 mutée (Fukata et al. 2010, 2021; Lovero et al. 2015). De plus, les courants AMPA-R sont restaurés par des injections de lentivirus exprimant LGI1 dans une culture de tranches d'hippocampe de souris LGI1^{-/-} (Lovero et al. 2015). Ainsi, il semble que LGI1 augmente les événements post-synaptiques, probablement en recrutant des AMPA-R sur les sites post-synaptiques. La diminution des AMPA-R chez les souris LGI1^{-/-} n'est pas une conséquence des crises chez ces animaux, l'altération des AMPA-R a été décrite chez des souris âgées de 8 jours, avant l'apparition de crises spontanées (cf. paragraphe 3.3.1 ci-dessous) (Lovero et al. 2015).

Il est à noter que les résultats ci-dessus ne sont actuellement pas consensuels dans la littérature, notamment à cause de résultats contradictoires décrits chez deux autres souches de souris LGI1^{-/-}. En effet, certaines études n'ont rapporté aucune différence dans l'expression des

AMPA-R ou dans les propriétés des EPSC chez les souris $LGI1^{-/-}$ par rapport aux souris témoins (Yu et al. 2010; Boillot et al. 2016). Cependant, différentes approches, incluant des souris $LGI1^{-/-}$, des souris ADAM22 KI exprimant un ADAM22 non fonctionnel, ainsi que des modèles de surexpression de PSD95 chez les souris $LGI1^{-/-}$ et ADAM22-KI, convergent sur le rôle de LGI1 dans la régulation des AMPA-R, et ces résultats sont en accord avec les données des études d'interaction protéique décrites ci-dessus.

3.3 Maladies associées à LGI1

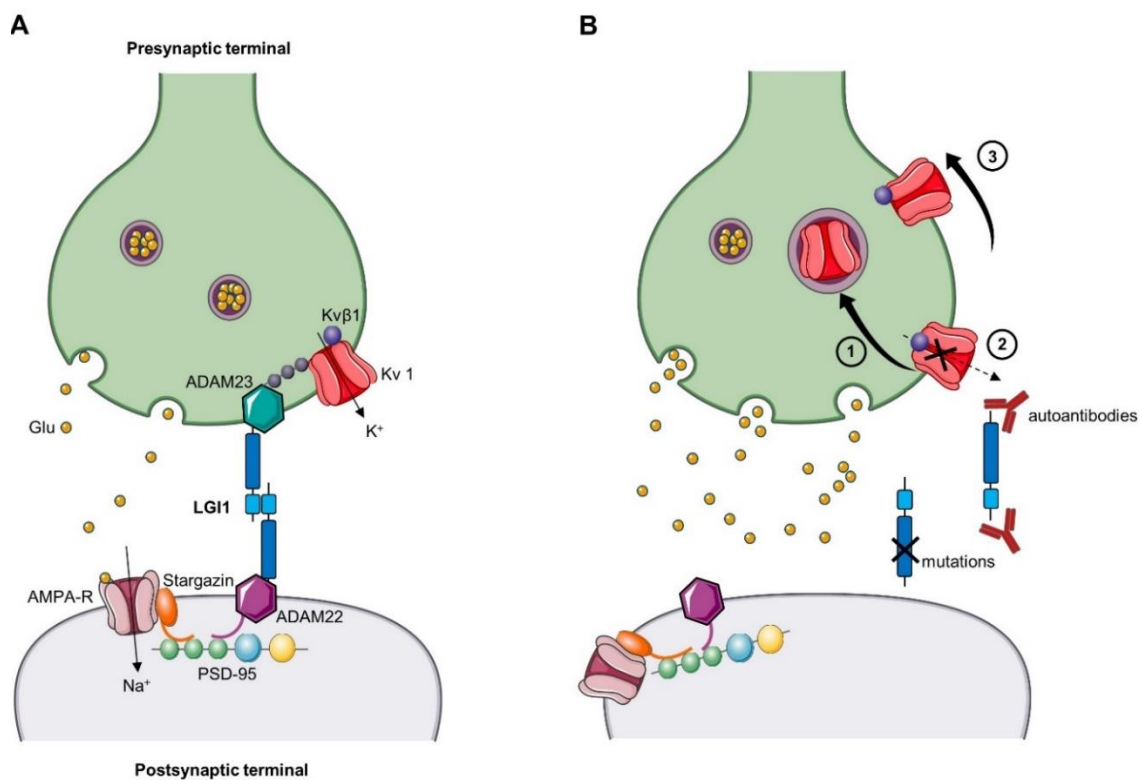


Figure 19. Organisation synaptique de LGI1, et perturbations causées par des mutations et des auto-anticorps. (A) Organisation de LGI1 dans un complexe trans-synaptique, avec ses partenaires protéiques, et interactions fonctionnelles indirectes avec les canaux Kv1 pré-synaptiques et les AMPA-R post-synaptiques. (B) Perturbations pathologiques de LGI1, soit par des mutations entraînant une perte de fonction, soit par des auto-anticorps. Il a été montré que les altérations de LGI1 perturbent à la fois l'expression et la fonction des canaux Kv1 et des AMPA-R. Cela pourrait être expliqué par (1) l'internalisation des canaux Kv1 et de leur complexe protéique (Ramberger et al. 2020), (2) une diminution du courant Kv1, par une inactivation rapide médiée par Kvβ1 (Schulte et al. 2006; Lancaster et al. 2019), (3) la suppression des canaux Kv1 et des AMPA-R de la synapse, ou une diminution de leur expression (Seagar et al. 2017; Petit-Pedrol et al. 2018; Zhou et al. 2018; Ramberger et al. 2020). La perte des courants Kv1 augmente la libération des neurotransmetteurs, ce qui augmente les niveaux de glutamate synaptique (Boillot et al. 2016; Seagar et al. 2017). Il s'agirait du mécanisme le plus prometteur reliant la perturbation de LGI1 aux crises. Cette figure a été créée à l'aide de la banque d'images Servier Medical Art.

3.3.1 Maladies génétiques associées à LGI1

Épilepsie du lobe temporal latéral autosomique dominante

En 1995, Ottman et ses collègues ont rapporté une épilepsie focale familiale à transmission autosomique dominante liée au chromosome 10q (Ottman et al. 1995). Les caractéristiques auditives prédominantes étaient évocatrices d'une apparition dans le lobe temporal latéral. Des mutations de *LGII* ont été identifiées quelques années plus tard dans plusieurs familles atteintes d'épilepsie autosomique dominante du lobe temporal latéral (*autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy, ADLTE*) (Gu et al. 2002; Kalachikov et al. 2002; Morante-Redolat 2002). Bien que des mutations hétérozygotes du gène codant pour la protéine reeline aient également été rapportées dans les familles ADLTE (Dazzo et al. 2015), les mutations de *LGII* restent prédominantes et sont identifiées dans environ la moitié des cas (Kalachikov et al. 2002; Morante-Redolat 2002; Michelucci et al. 2003). La pénétrance est d'environ 70 % (Gu et al. 2002; Kalachikov et al. 2002; Morante-Redolat 2002; Michelucci et al. 2003, 2013; Bisulli et al. 2014).

Les premiers symptômes de l'ADLTE surviennent à l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Les crises focales sans perte de contact, anciennement appelées « auras », avec des caractéristiques auditives, sont les manifestations les plus suggestives. Des symptômes auditifs critiques sont rapportés chez 62 % des patients et les crises seraient déclenchées par des sons soudains, comme la sonnerie d'un téléphone, pour environ 20 % des patients (Michelucci et al. 2013). Les premiers symptômes critiques comprennent des sons simples tels que des bourdonnements, des sonneries, ou des hallucinations plus complexes telles que des voix ou de la musique. Les patients peuvent, plus rarement, présenter d'autres types de crises focales sans perte de conscience : hallucinations visuelles ou olfactives, troubles dysmnésiques (déjà-vu) ou vertiges. 20 % des patients décrivent une aphasia réceptive critique (Michelucci et al. 2013), anciennement appelée aphasia de Wernicke. Des crises focales évoluant vers des crises bilatérales toniques-cloniques touchent environ les deux tiers des patients (Michelucci et al. 2013). Les IRM cérébrales sont souvent normales, tandis que les enregistrements EEG peuvent révéler une activité épileptique temporale.

L'ADLTE est généralement bien contrôlée par les médicaments antiépileptiques. Cependant, le traitement antiépileptique doit être maintenu à vie car les rechutes sont fréquentes lors de l'arrêt des médicaments.

Mutations de LGI1 : une physiopathologie par perte de fonction

Au moins 45 mutations différentes de LGI1 ont été identifiées chez les patients atteints d'ADLTE. La liste de mutation a été publiée en 2016 et actualisée en 2020 (Boillot et Baulac 2016; Yamagata et Fukai 2020), et aucune nouvelle mutation de LGI1 n'a été rapportée depuis. Sur les 45 mutations, il y a 30 faux-sens (67%), 7 décalages du cadre de lecture (16%), 4 impliquant des sites donneurs ou accepteurs d'épissage (9 %), 2 non-sens (4,5 %) et 2 microdélétions (4,5 %). Les mutations sont réparties de manière homogène dans toute la séquence de *LGI1*, sans préférence pour une région spécifique (Fig. 13).

Trois lignées de souris *LGI1*^{-/-} ont été générées pour modéliser les effets physiopathologiques d'une perte de fonction génétique LGI1 (Chabrol et al. 2010; Fukata et al. 2010; Yu et al. 2010). Elles présentent toutes des phénotypes cliniques similaires, même si nous avons décrit dans les chapitres précédents des différences entre les souches concernant les anomalies de développement cérébrales, et les anomalies des AMPA-R. Des crises d'épilepsie généralisées spontanées apparaissent au cours de la deuxième semaine postnatale à une fréquence d'environ une par heure. Il est à noter que les crises commencent sur l'EEG plus tôt dans l'hippocampe que dans le cortex (Chabrol et al. 2010). Le gain de poids est fortement réduit à partir du moment où les crises apparaissent, et les souris *LGI1*^{-/-} meurent prématurément au cours de la troisième semaine postnatale (Chabrol et al. 2010; Fukata et al. 2010; Yu et al. 2010). Aucune crise d'épilepsie spontanée n'a été observée chez les souris hétérozygotes *LGI1*^{+/-}. Leur survie et leur fertilité sont normales (Chabrol et al. 2010; Fukata et al. 2010; Yu et al. 2010). Cependant, à un mois, elles sont plus sensibles que les souris *LGI1*^{+/+} à l'induction de crises par injection de pentylènetétrazole (PTZ) (Fukata et al. 2010), et par stimulation sonore (Chabrol et al. 2010).

La fonction de la plupart des mutations de *LGI1* associées à l'ADLTE a été étudiée. Les mutations de décalage du cadre de lecture, de site d'épissage, les non-sens et les délétions induisent probablement une perte de fonction, car les séquences protéiques résultantes sont fortement modifiées. La plupart des mutations faux-sens testées (21/24) entraînent des défauts de sécrétion de LGI1, tandis que 3/24 n'empêchent pas sa sécrétion (Yamagata et Fukai 2020). La perte de sécrétion peut résulter d'une conformation anormale de la protéine, qui aboutirait à une dégradation prématurée par des mécanismes de contrôle qualité. Cette hypothèse a été testée pour la mutation E383A, avec un modèle de souris transgénique *LGI1*^{-/-} qui ré-exprime la protéine mutée (Yokoi et al. 2015), ainsi que pour la mutation L385R, dans un modèle de rat

transgénique (Baulac et al. 2012). Dans les deux cas, les animaux ont présenté des crises généralisées et sont décédés prématurément entre la deuxième et la quatrième semaine de vie. Les deux protéines mutées étaient instables et dégradées prématurément. L'acide 4-phénylbutyrique, un correcteur chimique qui agit pour stabiliser les protéines mal repliées, a permis d'améliorer la sécrétion de la protéine LGI1-E383A, et a réduit la susceptibilité aux crises chez les souris, confirmant les altérations conformationnelles de la protéine LGI1-E383A (Yokoi et al. 2015).

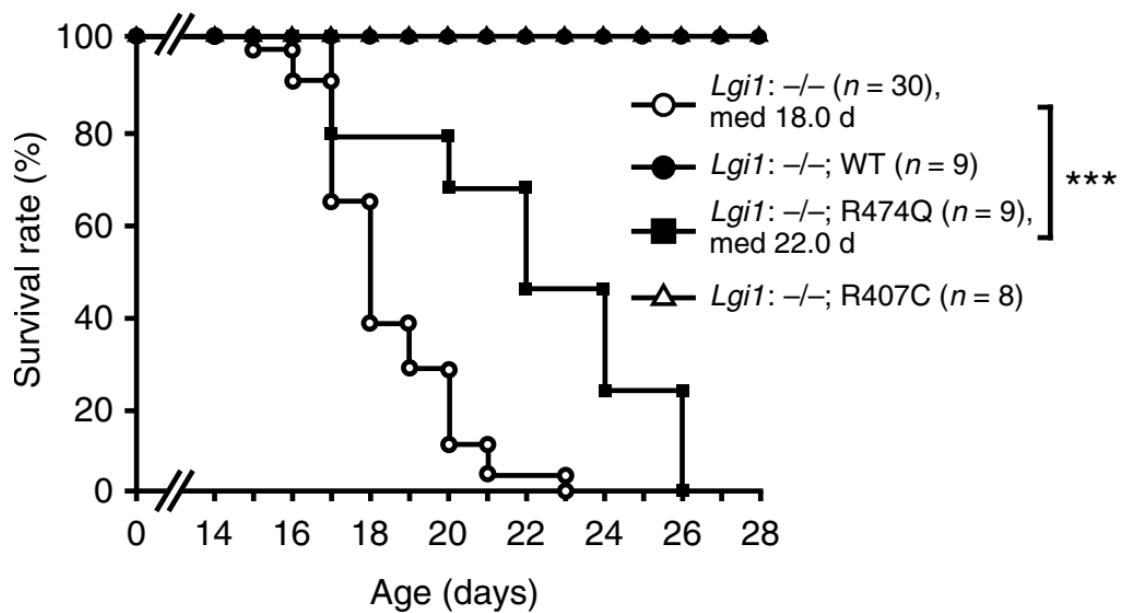


Figure 20. Rôle pathogène des mutations faux-sens de LGI1 n'altérant pas sa sécrétion (Yamagata et al. 2018). Représentation Kaplan-Meier de la survie des souris *LGI1*^{-/-}, exprimant les transgènes indiqués sur les figures. L'expression de *LGI1*-R474Q induit un phénotype similaire aux souris *LGI1*^{-/-} ne ré-exprimant pas de transgène, et est donc supposée être pathogène. Ce n'est pas le cas de la protéine *LGI1*-R407C, qui, lorsqu'elle est exprimée chez les souris *LGI1*^{-/-}, sauve le phénotype de la même manière qu'une expression de *LGI1* non mutée. La mutation sécrétion-compétente S473L induit également un phénotype létal similaire aux souris *LGI1*^{-/-}, tout comme la mutation E383A qui empêche la sécrétion de *LGI1* (Yokoi et al. 2015).

Les trois mutations *LGI1* qui n'empêchent pas la sécrétion de la protéine ont également été étudiées fonctionnellement. La mutation S473L empêche la liaison de *LGI1* à ADAM22 mais pas à ADAM23 (Yokoi et al. 2015; Yamagata et al. 2018). La mutation R474Q n'a pas modifié la liaison *LGI1*-ADAM22 ni *LGI1*-ADAM23, mais a supprimé la dimérisation de *LGI1* (Yamagata et al. 2018). La mutation R407C quant à elle n'a pas affecté la liaison *LGI1*-ADAM ni la dimérisation *LGI1*-*LGI1*. Les crises létales n'apparaissent pas chez les souris *LGI1*^{-/-} qui surexpriment à nouveau la protéine *LGI1* non mutée (Fukata et al. 2010). De la même manière l'expression de *LGI1*-R407C chez les souris *LGI1*^{-/-} permet de sauver le phénotype, mais ce

n'est pas le cas pour les protéines LGII-S473L et LGII-R474Q (Fig. 20) (Yokoi et al. 2015; Yamagata et al. 2018). Ces données suggèrent que la mutation R407C n'est en fait pas pathogène. Les mutations S473L et R474Q quant à elles, sans impact majeur sur la conformation empêchant la sécrétion de LGII, induisent quand même une perte de fonction, en raison de leur présence sur des sites indispensables à la liaison à d'autres protéines. Si la mutation R407C n'est pas pathogène, sa détection dans une famille ADLTE (Striano et al. 2011) pourrait-elle être un faux positif ? Une mutation d'un gène différent, tel que le gène codant pour la protéine reeline (Dazzo et al. 2015), pourrait peut-être être impliquée dans cette famille.

En résumé, la plupart des mutations de *LGII* induisent une perte de fonction indépendante du type de mutation et de sa localisation dans le gène, conduisant à une épilepsie génétique. De même, aucune corrélation génotype-phénotype n'a été vue chez les patients. Aucune différence n'a été trouvée dans les symptômes des patients selon les différents types de mutations, ou les différentes régions mutées du gène, et aucune corrélation n'a été établie entre les différentes mutations et leur pénétrance respective (Rosanoff et Ottman 2008; Nobile et al. 2009; Boillot et Baulac 2016). De plus, le phénotype comportemental des souris hétérozygotes LGII^{+/-} surexprimant LGII-S473L ou LGII-R474Q est similaire à celui des souris LGII^{+/-}, indiquant l'absence d'effets dominants négatifs des protéines LGII mutées (Yokoi et al. 2015).

3.3.2 Maladies auto-immunes associées à LGII

Rôle pathogène direct des auto-anticorps anti-LGII

Lorsqu'un anticorps est identifié dans une maladie auto-immune, il est important de déterminer s'il joue un rôle actif dans la physiopathologie ou s'il s'agit simplement d'un biomarqueur. Pour les EAI à anticorps anti-LGII, l'absence de réaction inflammatoire majeure dans le LCR, et le sous-type IgG4 de la majorité des auto-anticorps chez les patients (cf. paragraphe 2.8.4) sont des arguments en faveur d'une réaction dysimmune humorale plutôt que cellulaire. Les réponses favorables à l'immunothérapie pour les patients suggèrent également que ce sont les anticorps qui médient l'EAI, et non les lymphocytes T cytotoxiques qui induiraient des lésions tissulaires irréversibles.

Les auto-anticorps anti-LGI1 agissent selon un mécanisme inhibiteur

Les effets des anticorps anti-LGI1 humains ont été étudiés dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Les anticorps anti-LGI1 sont polyclonaux et reconnaissent à la fois des épitopes des domaines LRR et EPTP de LGI1 (Ohkawa et al. 2013; Kornau et al. 2020; Ramberger et al. 2020). Au sein du même patient, des sous-groupes d'anticorps ont montré des effets physiopathologiques distincts, selon le domaine ciblé de LGI1 (Kornau et al. 2020; Ramberger et al. 2020). La liaison au domaine EPTP altère les interactions entre LGI1 et ADAM22/ADAM23. Cette perturbation est similaire à celle induite par la mutation S473L permettant la sécrétion de LGI1 (cf. paragraphe 3.3.1). En revanche, la liaison des anticorps au domaine LRR induit l'internalisation de LGI1 et de ses récepteurs membranaires (Ramberger et al. 2020). Ce mécanisme est inhabituel pour une maladie auto-immune médiée par des IgG4 (cf. paragraphe 2.5.2).

Les injections d'anticorps dans l'hippocampe ou les ventricules cérébraux de souris réduisent de manière réversible l'expression de Kv1.1 et des AMPA-R après 7 ou 14 jours (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020), reproduisant ainsi certains effets qui ont été observés chez les souris LGI1^{-/-} (cf. paragraphe 3.3.1). Il est à noter que la diminution de Kv1.1 et d'AMPA-R est progressive au cours de l'injection de 14 jours et n'atteint pas un plateau, ce qui suggère qu'elle pourrait être encore plus importante en cas de contact plus long avec les auto-anticorps (Fig. 21). L'expression des AMPA-R est également diminuée après une incubation de 3 jours avec des anticorps anti-LGI1 dans le milieu de culture de neurones hippocampiques de rat (Ohkawa et al. 2013). Les anticorps anti-LGI1 augmentent l'excitabilité neuronale, quel que soit le domaine ciblé de LGI1, *in vitro* (Kornau et al. 2020) et *in vivo* (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020). La perfusion *in vivo* d'anticorps chez la souris réduit la potentialisation synaptique de long terme (*long term potentiation*, LTP) (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020) et induit des déficits de mémoire réversibles (Petit-Pedrol et al. 2018). Dans les modèles d'injection d'anticorps anti-LGI1 *in vivo*, les souris injectées ne présentaient pas de crises, bien que l'expression de Kv1 et des AMPA-R étaient diminuée et que l'excitabilité neuronale était augmentée (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020).

En résumé, les auto-anticorps LGI1 modifient la fonction neuronale et synaptique et augmentent l'excitabilité neuronale. La perte de la fonction LGI1 est un point commun physiopathologique entre EAI et ADLTE (Fig. 19B), et aboutit dans les deux cas à des crises, même si de nombreux symptômes cliniques diffèrent fortement.

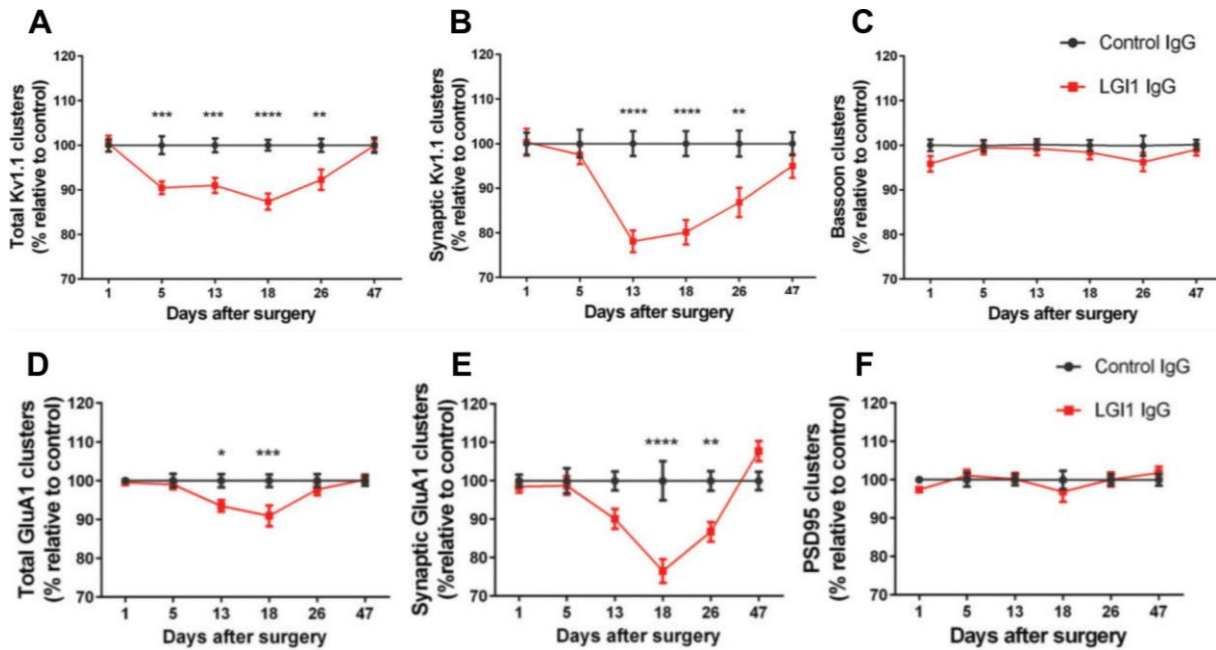


Figure 21. Les IgG purifiées de patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 diminuent de manière réversible les clusters de Kv1.1 et d'AMPA-R, sur la surface cellulaire totale, et à la synapse, lors d'injections chroniques dans l'hippocampe. Figure adaptée de (Petit-Pedrol et al. 2018). Quantification de la densité totale (A) et synaptique (B) de Kv1.1, et des clusters de Bassoon (C). Quantification de la densité totale (D) et synaptique (E) de la sous-unité GluA1 des AMPA-R, et des clusters de PSD95 (F). Bassoon et PSD95 ont été utilisées pour identifier respectivement les terminaisons pré- et post-synaptiques, et ont servi de contrôle pour vérifier le nombre comparable de synapses entre les conditions. La diminution de Kv1.1 et d'AMPA-R est progressive au cours de l'injection de 14 jours et ne semble pas atteindre de plateau, ce qui suggère qu'elle pourrait être encore plus importante en cas de contact plus long avec les auto-anticorps.

CHAPITRE 4

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Mon travail de thèse a porté sur le rôle des auto-anticorps anti-LGI1 dans le déclenchement de crises d'épilepsies, qui sont le principal symptôme rencontré chez les patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1. Les crises toniques-dystoniques (TDS) étant pathognomoniques de ces EAI, contrairement aux crises limbiques, nous avons émis l'hypothèse qu'elles étaient médiées par un mécanisme dépendant spécifiquement de LGI1, distinct des autres EAI. Plusieurs études ont montré un rôle pathogène direct des anticorps anti-LGI1, *via* une altération de l'expression et de la fonction des canaux Kv1 et des AMPA-R (Ohkawa et al. 2013; Petit-Pedrol et al. 2018; Kornau et al. 2020; Ramberger et al. 2020). Toutefois, le lien entre ces perturbations et les crises d'épilepsie n'a jamais été démontré. L'inhibition de Kv1 nous semble être une piste privilégiée. En effet, elle est connue *in vitro* pour augmenter l'excitabilité neuronale et l'activité des réseaux, ce qui n'est pas le cas d'une inhibition des AMPA-R, qui, de plus, ont été associés à des résultats discordants dans les études chez la souris LGI1^{-/-}.

L'objectif de ma thèse a été de déterminer si les auto-anticorps anti-LGI1 étaient responsables des crises d'épilepsie chez les patients, et par quels mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Pour cela, mon travail a été séparé en plusieurs objectifs :

1. Premièrement, j'ai étudié le rôle des auto-anticorps anti-LGI1 dans la genèse des crises, *via* des injections aiguës et chroniques *in vivo* chez le rongeur, de LCR ou d'IgG purifiées de sérum de patients. Ces injections n'ont pas permis d'induire d'anomalies épileptiques.

2. Compte tenu de l'absence de crise induite par des injections d'anticorps, ce qui a été confirmée depuis par 2 autres équipes de recherche (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020), je me suis tourné vers une autre stratégie pour inhiber les canaux Kv1 sans recourir à des auto-anticorps. *Via* des injections *in vivo* de dendrotoxine-K (DTX), un inhibiteur spécifique de Kv1.1, dans le cortex moteur primaire de rat adulte, j'ai cherché à reproduire de manière indirecte les perturbations observées *in vitro* par les auto-anticorps anti-LGI1. Cette méthode a permis de reproduire chez le rat les TDS pathognomoniques des EAI à anticorps anti-LGI1. La validation du modèle est passée par la comparaison des TDS induites chez le rat, à celles d'une cohorte de 12 patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1.

3. En utilisant le nouveau modèle de TDS induites par injection de DTX, j'ai pu explorer les mécanismes neuronaux sous-tendant ces crises caractéristiques. Ma stratégie a consisté à réaliser des enregistrements neuronaux extracellulaires et intracellulaires *in vivo* chez le rat après injection de DTX.

Les travaux sur les anticorps sont détaillés dans la partie 1 des résultats. La description du nouveau modèle animal, la comparaison avec la cohorte de patients, ainsi que la description des activités neuronales par des enregistrements multi-échelle *in vivo*, ont fait l'objet d'une publication, qui est en cours de révision par le journal *Brain* au moment de la rédaction de ce manuscrit. Ces travaux sont présentés dans la partie 2 des résultats.

II. RÉSULTATS

CHAPITRE 5

L'INJECTION D'ANTICORPS ANTI-LGI1 DANS LE CORTEX M1 OU L'HIPPOCAMPE DE RONGEUR NE PERMET PAS LE DÉCLENCHEMENT DE CRISES

5.1 Introduction

Au moment où j'ai commencé ma thèse en 2017, aucune étude sur l'injection d'anticorps anti-LGI1 *in vivo* n'avait été publiée, mais le rôle pathogène des anticorps anti-LGI1 avait été démontré *in vitro* (Ohkawa et al. 2013). Depuis, des modèles d'injection *in vivo* (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020) et d'incubation *in vitro* (Kornau et al. 2020), ont permis de démontrer que les anticorps anti-LGI1 perturbent l'expression et le fonctionnement des canaux Kv1 et des AMPA-R, conduisant à une augmentation de l'excitabilité neuronale et une altération de la transmission synaptique. Néanmoins, aucune de ces études n'a montré que les auto-anticorps anti-LGI1 étaient responsables du déclenchement de crises d'épilepsies, et en particulier, les injections d'anticorps *in vivo*, après 7 ou 14 jours, n'ont pas déclenché de crises chez la souris (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020).

Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le retentissement fonctionnel de l'injection intracérébrale *in vivo*, chez le rat et la souris, d'anticorps anti-LGI1 issus de patients présentant une encéphalite à anticorps anti-LGI1. Cette étude a été justifiée par la grande homologie entre les protéines LGI1 du rat et de l'humain, qui ont 97% de leurs acides aminés en commun (540 sur 557). Nous avons utilisé des anticorps provenant à la fois de LCR

et de sérum de patients, que nous avons injectés dans l'hippocampe ou dans le cortex moteur primaire, qui sont les deux cibles principales de la maladie (Navarro et al. 2016). Étant donné que la cinétique d'action des auto-anticorps n'était pas connue, nous avons mis en place des protocoles pour étudier son impact chronique ou aigu. Pour éviter des effets dépendant d'une espèce, nous avons travaillé à la fois chez le rat et la souris.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Animaux

Les expériences ont été réalisées chez 59 rats Sprague Dawley, et 29 souris C57B6/6J, tous âgés de 8 à 16 semaines (Charles River Laboratories, France). Les expérimentations détaillées ci-dessous ont respecté les directives de l'Union Européenne (directive 2010/63/UE) et ont été approuvées par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche français, et le comité d'éthique de l'Institut du Cerveau (APAFIS numéro 8302-2017113017466765). Le nombre d'animaux utilisés pour chaque groupe d'expériences est détaillé dans les Tableaux 5 et 6.

5.2.2 Patients

Le LCR et le sérum de patients ont été obtenus dans le Département de Neurologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Les principales caractéristiques de patients inclus sont présentées dans le Tableau 4.

Pour le groupe de patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 (patients LGI1, $n = 3$ patients), nous avons sélectionné des patients présentant des anticorps anti-LGI1 dans le sérum et dans le LCR, et ayant été prélevés avant le début de l'immunothérapie. Les anticorps ont été détectés sur des cellules HEK293 exprimant LGI1.

Pour le groupe contrôle (patients contrôles, $n = 3$ patients), nous avons sélectionné un patient hospitalisé pour des malaises répétés, qui n'étaient pas d'origine épileptique, et probablement d'origine fonctionnelle, et dont la recherche d'auto-anticorps était négative. Les deux autres patients sont deux patients qui ont été inclus dans le groupe LGI1, et qui ont été prélevés 1 an après l'arrêt des symptômes, après une rémission complète. Ces patients ne

présentaient plus de symptômes neurologiques, et la recherche d'anticorps dans le sérum et dans le LCR était négative. Les trois patients contrôles sélectionnés ne présentaient pas de maladie neurodégénérative, de tumeur cérébrale ou de pathologie inflammatoire aiguë, et avaient un LCR normal, c'est-à-dire une cellularité, une protéinorachie, et une glycorachie normales.

Nous avons fait le choix de ne pas rassembler les échantillons des différents patients, et de les utiliser de manière indépendante. Il est intéressant d'étudier chaque patient indépendamment, afin de ne pas passer à côté d'effet dépendant du patient, ou de ne pas sur-interpréter un éventuel effet qui ne serait en fait causé que par un patient.

	LGI1-1	LGI1-2	LGI1-3	Ctrl-1	Ctrl-2	Ctrl-3
Age	21	65	75	20	22	67
Sexe	F	M	M	M	F	M
Critère d'inclusion	Ac anti-LGI1 positifs LCR et sérum	Ac anti-LGI1 positif LCR et sérum	Ac anti-LGI1 positif LCR et sérum	Malaises répétés d'origine non épileptique	Patient LGI1-1 après rémission	Patient LGI-2 après rémission
TDS (nb. par h)	oui (17)	oui (23)	oui (7)	non	non	non
Crises temporales internes	oui	non	non	non	non	non
Hyponatrémie	oui	non	non	non	non	non
LCR (cellularité, protéinorachie, glycorachie)	normal	normal	normal	normal	normal	normal

Tableau 4. Principales caractéristiques des patients inclus. Ac : anticorps; Ctrl : contrôle ; F : féminin; M : masculin; nb. : nombre.

5.2.3 Purification des IgG de sérum de patients

Les IgG totales issus du sérum des 6 patients ont été purifiées avant d'être utilisées. Les IgG ont été isolées à l'aide de colonnes de protéine A (PURE1A-KIT, Sigma-Aldrich). Après l'isolement des IgG, les échantillons ont été dialysés, normalisés à une concentration de 1 mg/ml dans du PBS à l'aide de filtres d'ultrafiltration Amicon 30kD (UFC503096, Sigma-Aldrich), filtrés et conservés à -80 °C jusqu'à utilisation. La présence d'anticorps anti-LGI1 a été vérifiée après purification, par marquage sur des cellules HEK293 exprimant LGI1, révélée par des anti-IgG humains fluorescents (FA1439-1003-1, EuroImmune) (Fig. 22).

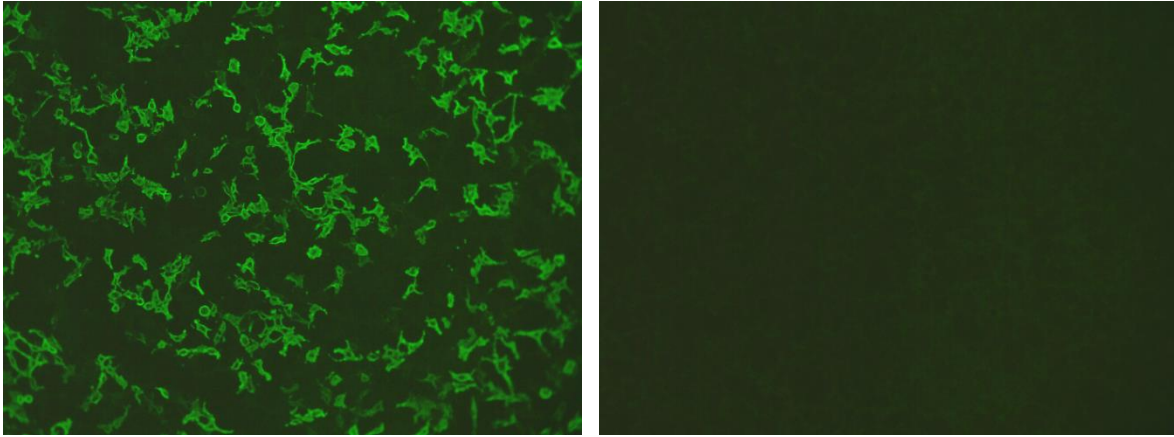


Figure 22. Vérification de la présence d'IgG anti-LGI1 après purification des IgG totales de sérum de patients. Immunomarquage, sur des cellules HEK293 exprimant LGI1 (EuroImmun®), avec des IgG purifiées d'un patient LGI1 (à gauche) et d'un patient contrôle (à droite).

5.2.4 Injections aiguë et enregistrements *in vivo* multi-échelles chez le rat sédaté

Les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (Osalia) à 3.5 % pendant 4 minutes pour l'induction, puis à 2% pour le maintien tout au long de la chirurgie. Des injections répétées de sufentanil ont été réalisées ($3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ toutes les 30 minutes, Piramal) du début à la fin de l'expérience. Les animaux ont été intubés afin de réaliser une ventilation artificielle (air ambiant, $80 \text{ cycles.min}^{-1}$, $2,6 \text{ ml.cycle}^{-1}$), et ont été placés sur un appareil stéréotaxique. Les zones d'incision et de pression ont été régulièrement infiltrées par de la lidocaïne (2 %, Centravet). Le LCR ou les IgG purifiées de patients ont été injectées à l'aide d'une seringue Hamilton® 1701, avec une aiguille de $200 \mu\text{m}$ de diamètre externe, à une vitesse de $0,1 \mu\text{L/min}$. Pour les expériences d'injection dans M1, un volume de $0,5 \mu\text{L}$ a été injecté, et pour les expériences d'injection dans l'hippocampe, un volume de $2 \mu\text{L}$ a été injecté.

Des enregistrements électrocorticographiques (ECoG) ont été réalisés à l'aide de trois électrodes d'argent de faible impédance (environ $60 \text{ k}\Omega$) placées sur la dure-mère au-dessus de M1 droit, M1 gauche, et PtA (cortex pariétal associatif) gauche. Une électrode de référence a été apposée sur le muscle temporal droit. Les signaux ECoG ont été amplifiés avec un amplificateur AC différentiel (modèle 1700 ; A-M Systems), filtrés entre $0,1 \text{ Hz}$ et 1 kHz et digitalisés à 3 kHz (CED 1401 Micro3 ; logiciel Spike2 version 7.20, Cambridge Electronic Design). Des enregistrements de potentiel de champ locaux (*local field potentials*, LFP) ont été effectués à l'aide d'une électrode linéaire multicanaux de 16 électrodes séparées de $250 \mu\text{m}$ (IrOx, $35 \mu\text{m}$ de diamètre, ATLAS Neuroengineering®) insérée dans le cortex moteur (M1) ou

dans l'hippocampe, 200 μm en avant du site d'injection. Les signaux LFP ont été amplifiés et filtrés entre 0,1 Hz et 1kHz, à l'aide d'un amplificateur Digital Lynx (NeuraLynx®), et digitalisés à 3,2 kHz.

Les coordonnées utilisées pour l'injection et le placement des électrodes ont été définies selon les repères stéréotaxiques antéro-postérieurs (AP), médio-latéraux (ML) et dorso-ventraux (DV) suivants, exprimés en millimètres par rapport au bregma (Paxinos et Watson 1986).

Pour les expériences d'injection dans l'hippocampe, nous avons utilisé les coordonnées suivantes :

- Cortex M1 droit et gauche (ECoG) : AP +3 ; ML +/- 2.6
- Cortex PtA gauche (ECoG) : AP -3.6 ; ML 3.5
- Hippocampe gauche (électrode multicanaux intracérébrale) : AP -3.4 ; ML 2.5 ; DV entre 0 et -3.75 (16 électrodes)
- Hippocampe gauche (site d'injection) : AP -3.6 ; ML 2.5 ; DV -3

Pour les expériences d'injection dans le cortex M1, nous avons utilisé les coordonnées suivantes :

- Cortex M1 gauche (électrode multicanaux intracérébrale) : AP +3 ; ML 2.6 ; DV entre 0 et -3.75 (16 électrodes)
- Cortex M1 gauche (site d'injection) : AP +2.8 ; ML 2.6 ; DV -1
- Cortex M1 droit (ECoG) : AP +3 ; ML -2.6
- Cortex PtA gauche (ECoG) : AP -3.6 ; ML 3.5

Une fois la chirurgie terminée, l'isoflurane a été progressivement arrêté, et l'animal a été maintenu dans un état sédaté et analgésié par des injections répétées de sufentanil, associées à des injections intramusculaires répétées de gallamine triethiodide (40 mg/2h, Sigma Aldrich) afin de permettre des enregistrements stables et de longue durée. La sédation au sufentanil n'altère pas l'activité spontanée et l'excitabilité des cellules corticales (Altwegg-Boussac et al. 2014) et n'interfère pas avec l'induction et l'expression des crises focales et généralisées (Langlois et al. 2010; Depaulis et al. 2016). La fréquence cardiaque et l'activité ECoG ont été surveillées en permanence pour évaluer la profondeur de la sédation. La stabilité des paramètres physiologiques, c'est-à-dire la concentration de dioxyde de carbone en fin d'expiration (EtCO₂),

la saturation en oxygène (SpO₂) et la température (37°C), a été vérifiée tout au long des expériences (Altwegg-Boussac et al. 2017). À la fin des expériences, les animaux ont été euthanasiés par l'injection d'une dose létale d'euthasol (0,6 ml.kg⁻¹, TVM). Puis, le cerveau a été récupéré afin de contrôler la position de la seringue d'injection et de l'électrode d'enregistrement intracrânienne, après fixation au paraformaldéhyde 4%, congélation à l'isopentane, coupes de 20 µm au cryostat et coloration au crésyl violet.

5.2.5 Injection chronique et enregistrements EEG-vidéo de longue durée chez l'animal vigile

L'analgésie a consisté en l'injection sous-cutanée de buprénorphine 0,05 mg.kg⁻¹ (Centravet), 40 minutes avant l'anesthésie. Les rats et les souris ont ensuite été anesthésiés par inhalation d'isoflurane à une concentration de 4% pendant 4 minutes pour l'induction, puis 2% pour le maintien, puis ils ont été fixés sur un cadre stéréotaxique. La température des animaux a été maintenue à 37°C à l'aide d'un tapis homéo-thermique pendant toute la durée de la chirurgie. Les électrodes EEG ont été implantées durant le même temps opératoire que la mise en place d'une canule intracrânienne reliée à une minipompe osmotique. Les trois électrodes corticales étaient constituées d'un fil d'acier inoxydable de 200 µm de diamètre, isolé (A-M Systems®). Pour les rats, une petite vis a été soudée au fil d'acier inoxydable (Fine Science Tools, 19010-00). Les 2 électrodes hippocampiques étaient constituées de deux fils de ce même acier inoxydable isolé, torsadés pour obtenir une rigidité suffisante pour l'insertion profonde dans l'hippocampe. Les différentes électrodes ont été soudées à un connecteur femelle de 6 plots. Après mise à nu de la boîte crânienne, les électrodes EEG et la canule permettant l'injection intraventriculaire ont été vissées ou implantées selon les repères stéréotaxiques suivants, en millimètres par rapport au Bregma (Paxinos et Watson 1986) :

- Hippocampe antérieur gauche (canule d'injection chronique) : AP -2 ; ML 1.5 ; DV -3 rat, et AP -1 ; ML -0.4 ; DV -2.3 souris
- Hippocampe postérieur gauche (électrode intracrânienne) : AP -3.4 ; ML 2.5; DV rat et AP -1.8 ; ML -1.8 ; DV -2.3 souris.
- Cortex M1 droit et gauche (EEG) : AP +3 ; ML +/- 2.6 rat, et AP 1.8 ; ML +/- 1.8 souris
- Cervelet (référence) : AP -10 ; ML 0 rat et AP -6.5 ; ML 0 souris

L'ensemble a été fixé par de la colle chirurgicale (Surgibond®), puis a été immobilisé dans du ciment dentaire sur la boîte crânienne de l'animal. Une minipompe osmotique Alzet® Model 1002 a été placée en sous-cutané au niveau du flanc droit de l'animal et reliée, grâce à une tubulure plastique, à la canule d'injection implantée dans l'hippocampe droit, pour permettre une injection chronique continue de 14 jours à un débit de $0,25 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$.

Les animaux ont été placés, pour enregistrement, dans une cage transparente individuelle, non anesthésiés et libres de leurs mouvements, avec un accès libre et illimité à la nourriture et à l'eau. Le connecteur femelle fixé sur le crâne du rat a été branché à un connecteur mâle relié par un câble souple à l'amplificateur EEG. Les EEG ont été amplifiés et digitalisés (Brainbox EEG-1166, Natus) à une fréquence d'échantillonnage de 2048Hz, filtrés entre 0,1 et 300 Hz. La vidéo a été enregistrée simultanément avec une fréquence de 25 images par seconde. Les animaux ont été enregistrés 24 ou 48 heures de suite, en continu, une fois par semaine entre 3 et 30 jours après la chirurgie. À la fin de la période d'enregistrement, les animaux ont été euthanasiés par l'injection d'une dose létale d'euthasol ($0,6 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$, TVM). Puis, le cerveau a été prélevé afin de vérifier la position des électrodes et de la canule d'injection à l'histologie : fixation au paraformaldéhyde 4%, congélation à l'isopentane, coupes de $20 \mu\text{m}$ au cryostat et coloration au crésyl violet.

La diffusion des IgG dans l'hippocampe a été vérifiée chez un groupe de 3 souris et de 3 rats, euthanasiés 7 jours après la chirurgie. Les cerveaux ont été prélevés, conservés, et coupés selon la même technique que celle détaillée dans le paragraphe précédent. Un marquage a été fait avec des anticorps anti-IgG humaines couplés à la peroxidase, suivi d'une révélation enzymatique.

5.2.6 Analyse des signaux électrophysiologiques

L'analyse a été faite de la même manière pour les enregistrements issus des expériences aiguës et chroniques, pour les animaux contrôles et LGI1. Une lecture visuelle de l'ensemble des tracés, sur des fenêtres de 20 s, a été réalisée afin de rechercher des crises ou des décharges épileptiformes, de survenue et de résolution brutale, se différenciant nettement du rythme de fond, ainsi que des changements brusques et anormaux du rythme de fond. Les tracés de chaque animal ont été lus de manière indépendante.

Pour les enregistrements chroniques sur animaux vigiles, des myoclonies, associées ou non à des événements sur l'EEG, ont également été recherchées. Pour les injections aiguës sur rats sédatisés, une période de 30 minutes a été enregistrée avant l'injection. Elle servait de base normale, sur laquelle étaient comparés les enregistrements après l'injection.

5.3 Résultats

5.3.1 Injections aiguës de LCR et d'IgG purifiées de sérum

Pour étudier l'effet des anticorps anti-LGI1 sur l'activité cérébrale, nous avons procédé à des injections aiguës dans l'hippocampe et le cortex M1 de rat sédatisé, et nous avons enregistré l'activité cérébrale avant et après l'injection. Le dispositif expérimental est schématisé dans la figure 23.

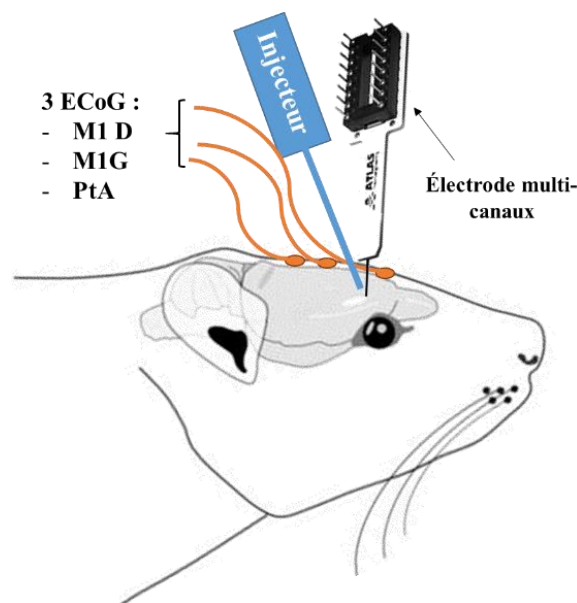


Figure 23. Schéma du dispositif expérimental d'injection aiguë et d'enregistrement électrophysiologique simultané sur le rat sédatisé.

L'injection de fluororuby dans l'hippocampe ($n = 2$) et dans M1 ($n = 2$) a permis de valider la localisation de l'injection dans les sites d'intérêt (Fig. 24).

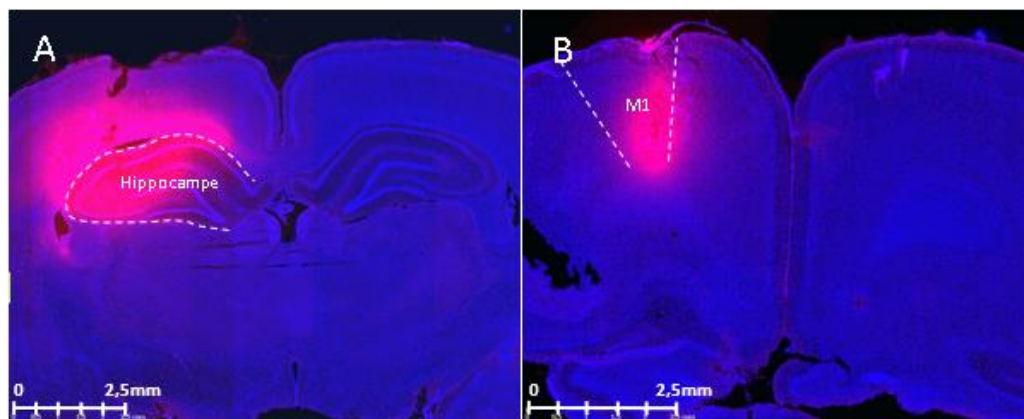


Figure 24. Contrôle de la position de l'injecteur. (A) Injection intrahippocampique de 2 μ L de fluororuby, aux mêmes coordonnées que l'injection d'anticorps. (B) Injection dans le cortex M1 de fluororuby, aux mêmes coordonnées que l'injection d'anticorps. Le marquage bleu est un marquage des noyaux des cellules au DAPI.

L'objectif était d'observer si l'injection d'auto-anticorps anti-LGI1 permettait de déclencher des activités épileptiformes, visibles à l'ECoG ou bien sur les électrodes intracrâniennes placées 200 μ m devant le site d'injection. La liste des expériences réalisées est résumée dans le Tableau 5.

	LCR LGI1	LCR contrôle	IgG purifiées LGI1	IgG purifiées contrôles
Cortex M1	LGI1-1 : $n = 3$	Ctrl-1 : $n = 2$	LGI1-1 : $n = 2$	Ctrl-1 : $n = 1$
	LGI1-2 : $n = 2$	Ctrl-2 : $n = 1$	LGI1-2 : $n = 2$	Ctrl-2 : $n = 1$
	LGI1-3 : $n = 3$	Ctrl-3 : $n = 2$	LGI1-3 : $n = 2$	Ctrl-3 : $n = 1$
Hippocampe	LGI1-1 : $n = 2$	Ctrl-1 : $n = 2$	LGI1-1 : $n = 2$	Ctrl-1 : $n = 1$
	LGI1-2 : $n = 2$	Ctrl-2 : $n = 1$	LGI1-2 : $n = 2$	Ctrl-2 : $n = 1$
	LGI1-3 : $n = 2$	Ctrl-3 : $n = 2$	LGI1-3 : $n = 2$	Ctrl-3 : $n = 1$

Tableau 5. Liste des expériences réalisées dans chaque condition d'injection aiguë de LCR ou d'IgG totales purifiées.

L'activité des différentes structures cérébrales d'intérêt a été enregistrée 30 minutes avant l'injection, comme référence de l'activité cérébrale normale. La durée d'enregistrement après injection variait entre 5 et 11 heures, avec une moyenne de 7,2 heures. La recherche d'activité épileptiformes ou de crise, par lecture visuelle sur des fenêtres de 20 s, s'est révélée négative pour la totalité des expériences, indépendamment du site d'injection dans M1 (Fig. 25) ou dans l'hippocampe. Ces résultats étaient similaires pour les rats injectés avec du LCR ou des IgG purifiées de sérum, de patient LGI1 ou contrôle.

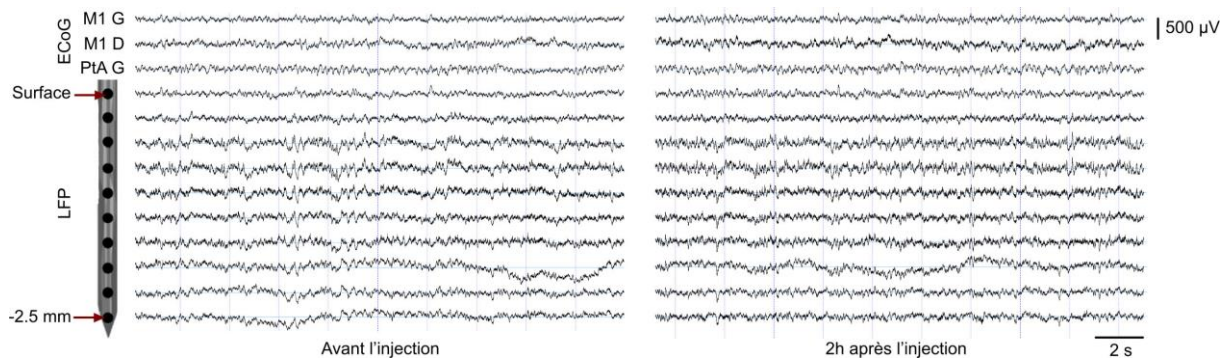


Figure 25. Activités EEG et potentiels de champ locaux enregistrées lors d'une expérience d'injection aiguë d'IgG purifiées de patients LGI1 dans M1. Trois électrocorticogrammes (ECoG) ont été placés sur le cortex moteur primaire gauche (M1 G, site d'injection) et droit (M1 D), et le cortex pariétal associatif gauche (PtA G). Une électrode multi-canaux a été insérée dans le cortex M1 G, 200 μm en avant du site d'injection. Cette électrode enregistrerait les potentiels de champs locaux (LFP) des différentes couches corticales. Nous n'avons observé aucune activité épileptiforme ni de crise d'épilepsie, après injection de LCR et d'IgG purifiées, de patients LGI1 ou de patients contrôles.

5.3.2 Injections chroniques de LCR et d'IgG purifiées de sérum

Suite à l'absence d'événements épileptiformes causés par les injections aiguës décrites ci-dessus, nous nous sommes intéressés aux effets induits par les anticorps sur une période plus longue. Pour cela, nous avons utilisé des pompes osmotiques permettant la libération en continu pendant deux semaines de la solution contenant les anticorps (LCR ou PBS contenant les IgG purifiées).

La détection d'IgG humaines par immunohistochimie, 7 jours après le début de l'injection d'IgG purifiées de sérum ($n = 3$ rats et $n = 3$ souris) a permis de valider la diffusion des anticorps humains dans l'hippocampe (Fig. 26). Les 3 rats ont été injectés avec les anticorps purifiés du sérum des patients LGI1-1, LGI1-2 et Ctrl-1, de même que les 3 souris.



Figure 26. Contrôle de la diffusion des IgG humaines après 7 jours d'infusion continue dans l'hippocampe. Coupe de cerveau de souris injectée avec les anticorps du patient LGI1-1. La révélation a été faite par incubation avec des anti-IgG humaines couplées à la peroxydase, suivie d'une coloration DAB.

La liste des expériences réalisées est résumée dans le Tableau 6. L'injection chronique durait 14 jours, et nous avons continué le suivi EEG des animaux encore 14 jours après la fin de l'injection. Les animaux ont été enregistrés 24 h à J3 après l'injection, puis 48 h une fois par semaine à J7-8, J14-15, J21-22, J28-29, correspondant à un total d'environ 200 h d'enregistrements par animal.

	LCR LGI1	LCR contrôle	IgG purifiées LGI1	IgG purifiées contrôles
Souris	LGI1-1 : $n = 2$	Ctrl-1 : $n = 2$	LGI1-1 : $n = 3$	Ctrl-1 : $n = 2$
	LGI1-2 : $n = 2$	Ctrl-2 : $n = 2$	LGI1-2 : $n = 3$	Ctrl-2 : $n = 1$
	LGI1-3 : $n = 2$	Ctrl-3 : $n = 2$	LGI1-3 : $n = 2$	Ctrl-3 : $n = 1$
Rat	LGI1-1 : $n = 2$	Ctrl-1 : $n = 2$		
	LGI1-2 : $n = 2$	Ctrl-2 : $n = 2$		
	LGI1-3 : $n = 2$	Ctrl-3 : $n = 2$		

Tableau 6. Liste des expériences réalisées dans chaque condition d'injection chronique dans l'hippocampe, de LCR ou d'IgG totales purifiées, chez le rat et la souris. A noter que les rats n'ont pas reçu d'injections d'IgG purifiées.

Aucun animal n'est mort spontanément au cours de l'injection de 2 semaines. Nous n'avons pas observé de différence de comportement entre les différents groupes animaux lors de leur manipulation : absence d'agressivité, d'apathie et d'hyperactivité motrice. Les tracés EEG des animaux contrôles et LGI1 étaient caractérisés par des activités physiologiques normales lors de l'éveil (activité thêta exploratoire) et du sommeil (activités lentes delta et amples lors du sommeil lent ; activités thêta généralisées lors du sommeil paradoxal). Nous avons observé des secousses brusques et courtes du tronc de l'animal qualifiées comme des myoclonies, survenant chez tous les animaux pendant les périodes de sommeil paradoxal. (Fig. 27).

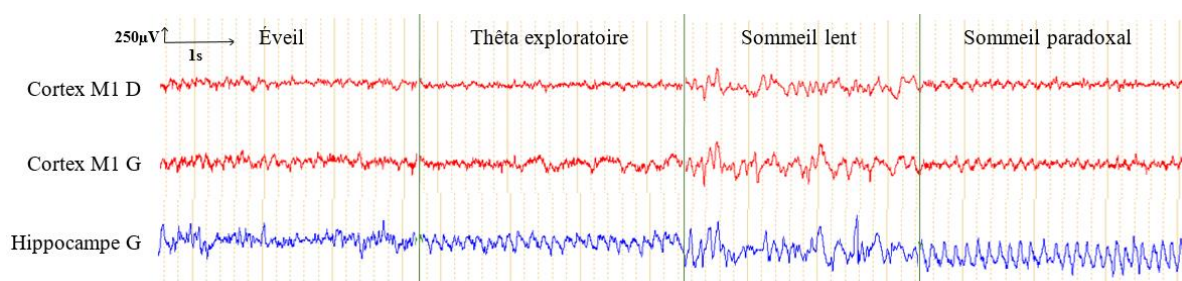


Figure 27. Activités physiologiques enregistrées à l'EEG chez l'animal vigile. Nous n'avons observé aucune activité épileptiforme ni de crise d'épilepsie, quel que soit le groupe de rats ou de souris.

Sur toute la durée des enregistrements, aucune anomalie paroxystique épileptique, comme des pointes, polypointes, ou pointes-ondes, n'a pu être visualisée sur l'EEG des animaux, quel que soit leur groupe, après une lecture exhaustive de tous les tracés. De même, nous n'avons observé aucune crise d'épilepsie.

Dans l'ensemble, ces résultats ont montré que les injections chroniques, comme les injections aiguës, de LCR ou d'IgG totales purifiées, n'ont pas permis d'induire de différences sur l'EEG entre les groupes LGI1 et les groupes contrôles, chez le rat ou la souris.

CHAPITRE 6

L'INHIBITION DE Kv1.1 DANS LE CORTEX MOTEUR DE RAT REPRODUIT LES CRISES TONIQUES-DYSTONIQUES DES EAI À ANTICORPS ANTI-LGI1

6.1 Contexte scientifique

Depuis le début de ma thèse, deux équipes ont tenté de développer des modèles animaux d'EAI à anticorps anti-LGI1 *in vivo*, notamment par le transfert passif dans le cerveau murin d'IgG totales ou d'anticorps anti-LGI1 purifiés de patients. Malgré une diminution de l'expression de Kv1.1, ces techniques n'ont pas permis l'émergence de crises d'épilepsie (Petit-Pedrol et al. 2018; Kornau et al. 2020). Ajouté à cela, l'incapacité à induire des crises lors de nos injections d'auto-anticorps anti-LGI1 *in vivo* nous a conduits à définir une stratégie alternative pour modéliser l'inhibition de LGI1 sans recourir à l'utilisation d'auto-anticorps.

Les crises toniques-dystoniques (TDS) étant pathognomoniques des EAI à anticorps anti-LGI1, contrairement aux crises limbiques, nous avons émis l'hypothèse qu'elles étaient médiées par un mécanisme dépendant spécifiquement de LGI1, distinct des autres EAI. Nous avons donc cherché à reproduire l'EAI à anticorps anti-LGI1, en cherchant non à bloquer directement la protéine LGI1, mais plutôt ses partenaires fonctionnels les plus importants. Les canaux Kv1, en pré-synaptique, et les AMPA-R, en post-synaptique, sont les protéines dont un dysfonctionnement nous semblait le plus à même d'induire des perturbations neuronales à l'origine des crises. Notre choix a porté sur les canaux Kv1 qui nous semblaient jouer un rôle

prépondérant dans la physiopathologie de cette EAI, contrairement aux AMPA-R, où des résultats discordants ont été retrouvés dans les études chez la souris $LGII^{-/-}$ (cf. paragraphe 3.2.2). Les canaux Kv1 sont spécifiquement altérés chez les souris $LGII^{-/-}$ (Seagar et al. 2017; Zhou et al. 2018), et après une infusion passive d'IgG anti-LGII humaines (Petit-Pedrol et al. 2018; Ramberger et al. 2020).

Nous avons développé un nouveau modèle pharmacologique de rongeur *in vivo* pour tester l'hypothèse selon laquelle le blocage des canaux Kv1 *via* la sous-unité Kv1.1, dans le cortex moteur primaire (M1), par perfusion locale de dendrotoxine-K (DTX), serait suffisant pour reproduire les TDS caractéristiques des EAI à anticorps anti-LGII. Nous avons ciblé le cortex M1, car c'est la région supposément initiatrice des TDS chez les patients (Navarro et al. 2016).

6.2 Démarche expérimentale

Nous avons comparé les crises induites chez le rat adulte par l'injection de DTX dans M1, avec les TDS enregistrées dans une cohorte de patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGII. Les patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGII, admis dans le service d'épilepsie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Paris, France) entre 2010 et 2019 avec au moins un épisode de TDS enregistré sur l'EEG, ont été inclus rétrospectivement ($n = 12$ patients). Des enregistrements EEG, EMG et vidéos ont été effectués sur un groupe d'animaux éveillés, se déplaçant librement, après une injection intracérébrale unilatérale de 200 ng de DTX, diluée dans 0.5 μ L de PBS, dans la couche V de M1 ($n = 9$ rats).

Nous avons ensuite étudié les modifications d'activités du réseau neuronal dans M1, et des propriétés intrinsèques des neurones, pendant les crises et entre les crises. Pour cela, nous avons utilisé des rats sédatisés et curarisés, selon une procédure développée au laboratoire pour explorer les mécanismes ictogéniques avec une résolution intracellulaire (Altwegg-Boussac et al. 2014; Depaulis et al. 2016). Des enregistrements électrocorticographiques (ECoG) et extracellulaires ou intracellulaires de neurones de la couche V du cortex M1 ont été réalisées, après une injection de PBS (groupe contrôle, $n = 5$ rats) ou de DTX (groupe DTX, $n = 20$ rats) dans M1.

Enfin, nous avons testé l'efficacité de la rétigabine pour bloquer les crises, par des injections intrapéritonéales des rétigabine ($n = 5$ rats) ou de diméthylsulfoxyde (véhicule, $n = 5$ rats), 3h après le début des crises induites par la DTX. Des enregistrements vidéo et EEG ont été réalisés pour quantifier la survenue de crises avant et après le traitement.

L'analyse des EEG de patients et de rats, et des enregistrements extracellulaires, a été réalisée avec une combinaison de Fieldtrip (Oostenveld et al. 2011) et de scripts personnalisés dans MATLAB. La détection et le tri des potentiels d'actions extracellulaires, selon leur origine neuronale supposée, a été réalisée à l'aide du logiciel SpyKING-CIRCUS (Yger et al. 2018). Les signaux intracellulaires ont été analysés avec le logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design). Les statistiques ont été faites avec MATLAB.

6.3 Principaux résultats

La comparaison des caractéristiques électrocliniques des TDS induites par la DTX, avec celles enregistrées dans une cohorte de 12 patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1, a révélé de fortes similitudes entre les crises chez l'humain et chez les rongeurs. Cela concernait notamment la fréquence élevée des crises et leur régularité, ainsi que la sémiologie motrice tonique-dystonique. De plus, les TDS de patients, et celles des rats, étaient précédées systématiquement par une onde lente de grande amplitude sur l'EEG en regard du cortex M1. Ainsi, l'inhibition de Kv1.1 dans le cortex moteur des rats a permis de reproduire les TDS humaines. En raison de son association systématique avec les contractions toniques-dystoniques, nous avons appelé l'onde EEG qui précède les contractions « onde tonique-dystonique » (« *tonic-dystonic wave* », TDW).

En combinant des enregistrements extracellulaires et intracellulaires multi-sites de neurones pyramidaux du cortex M1, après injection de DTX, chez des rats sédatisés, nous avons démontré que la TDW était associée à une dépolarisation neuronale supraliminaire et à une décharge de potentiels d'actions, massives et synchronisées. Les neurones corticaux qui initient la TDW étaient plus actifs et hyperexcitables, et, pendant les périodes intercritiques, leur activité augmentait progressivement. En se basant sur l'observation d'une séquence de changements dans l'excitabilité neuronale et l'activité synaptique induites par l'inhibition de Kv1.1, nous avons décrit un scénario prédictif de la génération neuronale des crises.

Nous avons ensuite montré que les TDS induites par la DTX chez les rats pouvaient être bloquées par la rétigabine, un médicament antiépileptique potentialisant les canaux K^+ dépendant du voltage.

Ces résultats mettent en évidence le rôle central de la perturbation de Kv1.1 dans l'émergence des TDS et suggèrent que la potentialisation de courant K^+ neuronal pourrait être une stratégie efficace pour améliorer le traitement des crises dans la prise en charge précoce de l'EAI à anticorps anti-LGI1. Ce nouveau modèle animal *in vivo* pourrait également servir à des recherches futures pour mieux caractériser les mécanismes de l'ictogénèse dans cette encéphalite auto-immune fréquente. Ce travail a fait l'objet d'un article, en cours de révision par le journal *Brain* au moment de l'écriture de ce manuscrit.

Kv1.1 inhibition in rat motor cortex recapitulates tonic-dystonic seizures in anti-LGI1 encephalitis

Paul Baudin¹, Stephen Whitmarsh¹, Louis Cousyn^{1,2}, Delphine Roussel¹, Sarah Lecas¹, Katia Lehongre¹, Stéphane Charpier¹, Séverine Mahon^{1,†}, Vincent Navarro^{1,2,3,†}

†These authors contributed equally to this work.

Abstract

Autoimmune encephalitis associated with auto-antibodies directed against the leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1) protein is responsible for pathognomonic tonic-dystonic seizures. Although several neuronal dysfunctions have been previously associated with anti-LGI1 antibodies, their relation to seizures remains inconclusive. We developed a new *in vivo* experimental model to test the hypothesis that a focal inhibition of Kv1.1 channels in the primary motor cortex (M1) by dendrotoxin-K (DTX) could recapitulate human tonic-dystonic seizures. Comparing electro-clinical features of DTX-induced tonic-dystonic seizures, with those recorded from a cohort of 12 anti-LGI1 autoimmune encephalitis patients, revealed striking similarities between human and rodent seizures. This included similar frequency of seizures recurrence and motor semiology, as well as a systematic precession by a large-amplitude slow wave on the EEG in M1. By combining multi-site extracellular and intracellular recordings of M1 pyramidal neurons in sedated DTX rats, we demonstrated that blocking Kv1.1 channels induced a sequence of changes in neuronal excitability and synaptic activity, which led to the triggering of a massive suprathreshold membrane depolarization subtending the paroxysmal EEG activity. A pharmacological investigation showed that the DTX-induced tonic-dystonic seizures in rodents could be stopped by retigabine, a voltage-dependent K⁺ channel opener. Overall, these results highlight the central role of Kv1.1 disruption in the emergence of tonic-dystonic seizures and suggest that neuronal K⁺ current potentiation could be an efficient strategy to improve the initial treatment of seizures in anti-LGI1 autoimmune encephalitis. This new *in vivo* animal model could also serve future investigations for further delineation of the ictogenesis mechanisms in this frequent autoimmune encephalitis.

Author affiliations:

1 Sorbonne Université, Paris Brain Institute – Institut du Cerveau, ICM, INSERM, CNRS, APHP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

2 AP-HP, Epilepsy Unit, Pitié-Salpêtrière Hospital, DMU Neurosciences, Paris, France

3 AP-HP, Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Correspondence to: Vincent Navarro, MD, PhD

47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France

vincent.navarro@aphp.fr

Running title: Role of Kv1.1 in tonic-dystonic seizures

Keywords: LGI1; Kv1.1; tonic-dystonic seizures; epilepsy; autoimmune encephalitis

Abbreviations: AED = antiepileptic drug; AMPAR = AMPA receptor; AP = action potential; DMSO = dimethylsulfoxide; DTX = dendrotoxin-K; ECoG = electrocorticogram; $F-I$ = frequency-current; G_m = synaptic conductance; I_{th} = current threshold; L = left; LFP = local field potential; M1 = primary motor cortex; MUA = multiunit activity; R = right; R_m = membrane resistance; SD = standard deviation; SU = single unit; TDS = tonic-dystonic seizure; TDW = tonic-dystonic wave; τ_m = membrane time constant; $V-I$ = voltage-current; V_m = membrane potential

Introduction

Autoimmune encephalitis is a group of recently described autoimmune syndromes that are responsible for an increasing number of unexplained pharmaco-resistant epilepsies.^{1–3} The second most frequent autoimmune encephalitis, caused by the production of antibodies directed against the leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1) protein, is associated with limbic encephalitis and tonic-dystonic motor seizures (TDS), also known as faciobrachial dystonic seizures (FBDS). The evolution of the disease, generally within months, is characterized by a progressive bilateral involvement of limbic and motor brain structures⁴ and a gradual increase in seizures frequency, possibly leading to life-threatening status epilepticus. An absence or delay in diagnosis and treatment can thus have devastating consequences and lead to irreversible lesions, such as hippocampal atrophy.^{5–8} While limbic encephalitis is a common syndrome in different autoimmune encephalitis, TDS are pathognomonic of anti-LGI1 autoimmune encephalitis.^{4,9} TDS consist in a brief tonic contraction of the upper limb, which ends in a dystonic posture, sometimes associated with ipsilateral hemi-face and lower limb contraction. We recently demonstrated that TDS originate from the motor cortex⁴ and that the muscular contraction is preceded by a striking focal contralateral fronto-central slow wave on the EEG.^{4,10,11} Although patients respond well to immunotherapy, TDS usually persist for several weeks after starting treatment and cannot be controlled with current anti-epileptic drugs (AEDs).^{12–15}

LGI1 is a 60 kDa-secreted glycoprotein, ubiquitously expressed in the central nervous system. It takes part in a trans-synaptic complex, including Kv1.1 voltage-dependent potassium channels and glutamatergic AMPA receptors (AMPA).^{16–18} LGI1 is also enriched at the axon initial segment, where it co-localizes with Kv1.1 channels as well.^{19,20} Anti-LGI1 antibodies have been shown to prevent fixation of LGI1 to its pre- and postsynaptic partners or to induce the internalization of the LGI1-associated protein complex,²¹ resulting in alterations of the expression and functioning of Kv1.1 channels and AMPAR.^{21–24} However, the pathophysiological mechanisms linking these dysfunctions to the emergence of TDS remain unclear. Several groups have attempted to develop *in vivo* animal models of anti-LGI1 encephalitis, especially through the passive transfer into the murine brain of total immunoglobulins or purified anti-LGI1 antibodies from patients. However, despite a decrease in Kv1.1 expression, none of these previous studies reported the occurrence of epileptic seizures.^{21,23}

Here, we developed a new *in vivo* pharmacological rodent model to test the hypothesis that blocking Kv1.1 channels in the primary motor cortex (M1), through local infusion of dendrotoxin-K (DTX), would be sufficient to produce the characteristic TDS.

Remarkably, the rodent model could reliably generate seizures whose properties, including frequency of occurrence, motor semiology and robust association with a large-amplitude slow EEG wave in M1, were greatly similar to the TDS recorded in a cohort of 12 patients with anti-LGI1 autoimmune encephalitis. By performing multi-site extracellular and intracellular recordings in our model, we also demonstrated that the paroxysmal EEG activity was subtended in deep-layer M1 pyramidal neurons by a massive membrane depolarization and synchronous high-frequency action potentials (APs) discharge. Analysis of synaptic activity and firing dynamics during interictal periods indicated a progressive increase in the level of activity within the cortical network, responsible for the emergence of motor seizures. Finally, we showed that the DTX-induced seizures could be suppressed by antiepileptic drug potentiating K⁺ channels.

Materials and methods

Study design

The overall goal of the study was to test the hypothesis that a blockade of Kv1.1 channels is responsible for the development of the pathognomonic TDS associated with anti-LGI1 encephalitis. This was tested by comparing the seizures induced in adult rats by the infusion in M1 of a specific Kv1.1 blocker (dendrotoxin-K, DTX),²⁵ with TDS recorded in a cohort of patient with anti-LGI1 encephalitis.

Animal care and manipulation were carried out in accordance with the European Committee Council Directive (2010/63/EU) and approved by the French Ministry for Research and the local Ethical Committee (APAFIS no. 8302-2017113017466765). EEG and EMG recordings were first conducted on a set of freely-moving animals unilaterally injected with DTX. ECoG and extracellular or intracellular recordings of M1 neurons were then performed in sedated animals, experiencing a vehicle injection in M1 (control group) or receiving a single dose of DTX (DTX group). The number of neurons and animals used in each experimental group are indicated in the text and figure legends. Variability between animals was similar for each group, and all data

points were thus included as raw data and used for statistical analysis. We did not perform *a priori* power analysis. The quantification of digitized data was performed identically in each group of animals using objective measurements.

Anti-LGI1 encephalitis patients, admitted in the Epilepsy Unit of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) between 2010 and 2019 with at least one episode of TDS recorded on the EEG, were retrospectively included ($n = 12$). The main clinical and biological data, therapeutics, and outcomes of patients are provided in table S1. Investigations were conducted in accordance with the French legislation and authorized by CNIL committee (No. 2211991). All patients were informed about the use of their anonymized data, and provided verbal consent.

Human studies

EEG was recorded with 21 scalp electrodes positioned according to the 10-20 system. Total duration of EEG recordings ranged from 0.5 to 10 hours per patient. EMG from muscles of the upper limb was simultaneously recorded in 9 out of 12 patients, the position of the electrodes being adapted to the location of the most visible contraction. Patient behavior was simultaneously recorded with video. Data from several recording systems (Medatec[®], Belgium; Micromed[®], Italy, Nicolet[®], USA) were reviewed in an average reference montage. EEG and EMG signals were acquired at 256 Hz or 512 Hz, and high-pass filtered at 0.1 Hz.

Multi-scale electrophysiological recordings in the rodent model

Experiments were performed on male Sprague Dawley rats, aged of 2–4 months and weighting 200–450 g ($n = 45$).

For experiments in freely-moving animals, rats ($n = 19$) were anesthetized with 2–4% isoflurane (Osalia) and placed in a stereotaxic frame. DTX (200 ng, 0.5 μ l; Alomone Labs) was loaded into a 10 μ l Hamilton syringe injector and slowly (0.1 μ l.min⁻¹) injected perpendicularly to the brain surface at 1 mm depth into the left M1 (AP, +2 mm; ML, 2.6 mm).²⁶ EEG activity was monitored through two stainless-steel screws (0.86 mm diameter) implanted into the right and left M1 and a reference electrode placed over the cerebellum. Intramuscular bipolar stainless-steel EMG electrodes were placed in the front paw extensors. After DTX injection, rats were placed in freely moving conditions and connected to a computer-assisted video-EEG system (Deltamed LTM, Natus[®]). EEG and EMG signals were acquired at 4096 Hz and high-pass filtered at 0.1

Hz. In a subset of animals, after a baseline recording period of 3 h, rats were treated with intraperitoneal injection of 2 ml.kg⁻¹ of retigabine (5 mg.kg⁻¹ diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) 50%; Alomone Labs; $n = 5$) or DMSO 50% (2 ml.kg⁻¹; $n = 5$). At the end of experiments, animals were euthanized by an overdose of euthasol (0.6 ml.kg⁻¹; TVM) and brains were cut into coronal sections for histological processing. Brain sections were then stained with cresyl violet to localize electrode tips.

In sedated animals ($n = 5$ control and 20 DTX rats), the monitoring of ECoG in M1 was combined with LFP and MUA recordings, or with intracellular recordings of subjacent pyramidal neurons. Rats were initially anesthetized with 2–4% isoflurane and underwent tracheotomy for artificial ventilation (room air, 80 breaths.min⁻¹, 2.6 ml.cycle⁻¹) under neuromuscular blockade (gallamine triethiodide, 40 mg/2h i.m.; Sigma-Aldrich®). They were placed in a stereotaxic frame and a small craniotomy was made above M1 to allow DTX injection and multiscale recordings. Isoflurane anesthesia was discontinued after the surgical procedures. Analgesia and sedation were then maintained by local infiltration of lidocaine 2% (Centravet) to incision and pressure points and repeated injection of sufentanil (3 µg.kg⁻¹ every 30 min, i.p.; Piramal). Sedation with sufentanil does not alter the spontaneous activity and excitability of cortical cells²⁷ and does not interfere with the induction-expression of focal and generalized seizures.^{28,29} Heart rate and ECoG activity were continuously monitored to assess the depth of sedation. The stability of physiological parameters, *i.e.* end-tidal carbon dioxide concentration (EtCO₂), oxygen saturation (SpO₂) and core temperature (37°C), was ensured throughout the experiments.³⁰ DTX injection (40 ng, 0.5 µl) in sedated animals was performed as described above for freely-moving animals and control rats were similarly injected with 0.5 µl of phosphate-buffered saline (PBS, VWR chemicals). More information on recording techniques and labeling of neurons are available in the Supplementary Materials. Methods on signals analysis are described in the Supplementary Materials.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with MATLAB. Differences between groups were assessed using the Wilcoxon signed-rank test, the Mann-Whitney rank-sum test or one-way ANOVA when appropriate. Correlations were evaluated by means of Pearson's rho values and their level of significance. The sequential rejective Benjamini-Hochberg test procedure was used to correct for multiple comparisons.³¹

Results are represented as mean \pm SD and $P < 0.05$ was considered a significant effect.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

Results

Inhibition of Kv1.1 channels in the rodent motor cortex recapitulates the human TDS

We first sought to determine whether an acute inhibition of Kv1.1 channels in the rodent M1, through focal injection of DTX, was able to reproduce the human TDS and the coincident large-amplitude slow EEG wave. Validation of the pharmacological model was based on a comparative assessment of the consequences of Kv1.1 blockade with the TDS-related electroclinical correlates recorded by simultaneous EEG, EMG and video monitoring in a cohort of 12 anti-LGI1 encephalitis patients (Supplementary Table 1). Patients exhibited the previously described postural changes,^{9,4,10,11} consisting of a brief (~1 s) distal tonic contraction of the upper limb, ending in a dystonic posture of the fingers, which was sometimes associated with a contraction of the ipsilateral hemi-face (Fig. 1A, right) (Supplementary Movie 1). The number of TDS per patient was highly variable (30.4 ± 35 seizures, range: 3–114, $n = 12$ patients), and their frequency ranged from 5 to 31 seizures per hour (Fig. 1A, right). As previously reported,^{4,10,11} clinical TDS was systematically preceded by a slow EEG wave, which was exclusively detected from the fronto-central electrodes (Fig. 1A, left and Supplementary Fig. 1). Due to its systematic association with the tonic-dystonic contraction, we called this EEG wave a ‘tonic-dystonic wave’ (TDW). This abnormal EEG waveform, arising from apparently normal background cortical activity, was unilateral and contralateral to the tonic-dystonic contraction. TDWs were temporally correlated with a robust increase in EMG activity recorded from the muscles of the upper limb (Fig. 1A and C, left records). Within each patient, TDWs recurred with some temporal regularity, as indicated by the CV2 values of inter-TDW intervals (0.7 ± 0.3 , range: 0.2–1.3, $n = 365$ TDWs from 12 patients) (Fig. 1A, right). Cortical TDWs, the

burst of EMG activity and TDS were robustly associated in each patient, suggesting a causal link between the cortical event and the motor symptoms of the seizure.

We attempted to reproduce these clinical and EEG features in freely-moving rodents by blocking the activity of Kv1.1 channels in M1 via a focal injection of DTX in the layer 5, which contains the soma of corticospinal neurons. Monitoring EEG activity from ipsilateral and contralateral M1 and EMG signals from the front paw extensors (Fig. 1B and C) after DTX injection revealed electroclinical symptoms strikingly similar to those recorded in patients. In all tested rats, large-amplitude slow negative EEG waves emerged from a normal background EEG pattern with a frequency ranging from 13.6 to 45.8 per hour ($27.9 \pm 8.6 \text{ h}^{-1}$, $n = 1832$ waves from 9 DTX rats) (Fig. 1B, right). Similarly as in anti-LGI1 autoimmune encephalitis patients, the slow EEG waves in rodents recurred regularly (Inter-wave intervals $\text{CV}2 = 0.3 \pm 0.07$; range: 0.2–0.4, $n = 9$ rats) (Fig. 1B, right) and were systematically accompanied by a burst of EMG activity (Fig. 1B and C, right). Seizures in rodents were highly stereotyped, characterized by a tonic-dystonic contraction of the anterior paw extensors contralateral to the DTX injection site, and an upward-lateral displacement of the head (Fig. 1B, right) (Supplementary Movie 2). Tonic-dystonic episodes were systematically preceded by the slow EEG wave, which can therefore be similarly named TDW by analogy with the human pathology.

Although patients and DTX rats both showed analogous association between TDWs and the increase in EMG activity (Fig. 1C, left), differences were observed as well. The duration at half-amplitude of the human TDW (half-width duration = 512 ± 124 ms, $n = 243$ TDWs from 12 patients) was significantly longer as compared to the TDW in rodents (half-width duration = 320 ± 79 ms, $n = 1\ 354$ TDWs from 9 DTX rats; $P = 0.001$) (Fig. 1C and D, top). This was accompanied by an increased duration of the tonic contraction in patients (Patients, 1.2 ± 0.7 s, $n = 9$ versus DTX rats, 0.4 ± 0.1 s, $n = 5$; $P = 0.001$) (Fig. 1C and D) and an augmented delay between the onset of the TDW and the beginning of the change in EMG activity (Patients, 432 ± 210 ms, $n = 9$ versus DTX rats, 54.0 ± 12.6 ms, $n = 5$; $P = 0.001$) (Fig. 1C).

In DTX rats, TDWs were systematically followed by a transient epoch (0.8–1.5 s) of attenuated EEG activity, preceding a longer period (16.3 ± 8.7 s) of ictal activity (Fig. 1B, left). Ictal activity consisted in negative oscillations at 8–16 Hz, followed by rhythmic (3–8 Hz) spike and poly-spike discharges (Fig. 1B and Supplementary Fig.

2). This ictal pattern could be detected, albeit strongly attenuated, in M1 contralateral to the DTX injection site (Fig. 1B), suggesting partial trans-callosal propagation to the homotypic cortex. This sustained ictal activity always caused rhythmic muscular contractions and tonic-clonic seizures in DTX rats (Fig. 1B, left and Supplementary Movie 3).

Profiles of cortical neurons firing during the DTX-induced TDW

We next investigated changes in cortical neurons activity during TDWs. We recorded electrocorticographic (ECoG) activity in M1, together with multi-site extracellular recordings ($n = 5$ rats) (Fig. 2A, left) or intracellular recordings from layer 5 pyramidal neurons ($n = 10$ rats) (Fig. 3A).

Local field potentials (LFP) and multiunit activities (MUA) were collected at different depths in M1 from sedated DTX rats and spike sorting was used to extract putative single units (SUs) (Fig. 2A and Supplementary Fig. 2A). Shape and half-width of TDWs in sedated animals did not significantly differ from those measured in freely-moving rats (Awake, 320 ± 79 ms, $n = 1354$ TDWs from 9 rats *versus* Sedated, 291 ± 111 ms, $n = 637$ TDWs from 7 rats; $P = 0.8$) (Fig. 2A middle, inset). The firing rate of the majority of SUs (62/65) was modulated by the occurrence of TDWs. Three distinct firing profiles could be identified. The largest group of neurons (46/65) displayed a strong transient increase in firing rate during the TDWs, from 2.8 ± 4.6 Hz in baseline ($n = 4232$ TDWs from 46 SUs) to 8.1 ± 7.2 Hz ($P < 0.001$) during the TDW period ('transient increase' group) (Fig. 2B, left). A maximal firing frequency of 48.1 ± 42 Hz was reached at the peak of the TDW, indicating a tight synchronization of discharge among this group of neurons (Fig. 2B and C, left). This pronounced enhancement in firing activity, which lasted on average 0.65 ± 0.6 s (from 0.02 to 1.7 s, $n = 46$ SUs), rapidly collapsed after the TDW. The firing activity following TDWs was either similar ($n = 21/46$ SUs) or statistically lowered ($n = 25$ SUs; $P < 0.05$) as compared to baseline (Fig. 2B and C, left).

A second group of neurons ($n = 10/65$) was characterized by a marked and prolonged TDW-related increase in firing, which persisted for at least 2 seconds after the end the ECoG wave ('prolonged increase' group) (Fig. 2B, middle). The increase in firing started at the onset of the TDW and reached a maximal value of 35.1 ± 18.2 Hz ($n = 10$ SUs) at the peak negativity of the TDW, suggesting again a synchronized

discharge among cortical neurons (Fig. 2B and 2C, middle). The average firing of this group of SUs during the TDW (12.9 ± 8.8 Hz, $n = 1960$ TDWs) remained above baseline until the appearance of the ECoG ictal oscillations ($P < 0.001$), despite a slow decrease after TDW termination (Fig. 2B and 2C, middle).

A third group of neurons ($n = 9/65$) consisted of SUs whose firing rate was either reduced ($n = 6$) during the TDW or not significantly modified ($n = 3$) ('no change/decrease' group) (Fig. 2B and 2C, right). These cells were thus not involved in the global increase in neuronal activity accompanying the occurrence of TDWs. The firing frequency of the 'decreased' neurons changed from 1.7 ± 1.8 Hz, ($n = 800$ TDWs from 6 SUs) in baseline to 0.31 ± 0.35 Hz during the ECoG wave ($P < 0.05$), corresponding to a decrease of $78 \pm 19\%$ (49–97%) (Fig. 2B and 2C, right).

Intracellular correlates of the TDW

To further explore the cellular mechanisms subtending the TDW, we combined ECoG monitoring with intracellular recordings of M1 neurons near the DTX injection site ($n = 12$ neurons from 10 rats) (Fig. 3A). Cells were located in the M1 layer 5 and displayed the characteristic current-evoked firing profiles of pyramidal neurons, including regular spiking ($n = 9$) and intrinsic bursting ($n = 3$) patterns (Fig. 5B). Laminar location and cellular typology of neurons were further confirmed by subsequent histological reconstruction of neurobiotin-loaded cells ($n = 6$) (Fig. 3A). Before TDW, spontaneous activity of pyramidal neurons was characterized by a small-amplitude and fluctuating background synaptic drive leading to a mean V_m of -71.9 ± 4 mV (from -77.5 to -64.7 mV, $n = 12$ neurons), causing a firing rate of 1.5 ± 3.7 Hz ($n = 10$ out 12 neurons) (Fig. 3B, top).

Consistent with the three categories of SUs identified with extracellular recordings, the majority of intracellularly recorded neurons ($n = 7$ out 12) displayed a transient increase in their firing at the occurrence of the TDW (Fig. 3B, left). This was associated with an abrupt positive shift of the membrane voltage, which reached a mean value of -48.8 ± 7.5 mV (from -60.7 to -38.3 mV, $n = 7$ neurons) at the peak of the TDW (Fig. 3B, left middle). This large membrane depolarization (13.4 to 34.3 mV), triggered by the temporal summation of depolarizing synaptic events (arrows in Fig. 3C, central), elicited a brief (0.04–0.8 s) period of high-frequency APs discharge (83 ± 50 Hz, $n = 7$ neurons), in time with the corresponding TDW (Fig. 3B left, top and 3C).

The membrane depolarization further increased in magnitude after termination of the TDW, resulting in the silencing of cortical neurons likely due to a ‘depolarization block’ process known to prevent APs triggering.³² Another group of neurons did not fire in relation with the TDW (‘silent group’, $n = 4$ neurons) (Fig. 3B right, top). Their intracellular behavior was variable, and included large and sustained depolarization shifts ($n = 1$), lasting depolarizations of smaller amplitude ($n = 2$) and subthreshold membrane oscillations ($n = 1$) (Fig. 3B right, middle). Finally, in one neuron, the TDW was associated with a sustained suprathreshold depolarization that persisted for at least 2 s after the end of the ECoG wave (‘prolonged increase’ group) (Fig. 3B, middle top). The three distinct TDW-related intracellular behaviors were reproducible over successive paroxysms and were not associated with differences in layer location, general cell morphology and intrinsic electrical membrane properties (Supplementary Table 2).

To assess collective changes in the activity of M1 neurons during the TDW, the microelectrode was slowly removed at the end of intracellular recordings to capture the LFP associated with TDWs ($n = 7$ rats). We found that the initial deflection of the ECoG wave coincided with a large negative *DC* shift (-7.8 ± 1.9 mV, $n = 7$) in each group of neurons (Fig. 3B, bottom paired records). This suggested that the large V_m depolarization, which was observed in most of M1 neurons, was caused by a massive transmembrane current responsible for both the voltage negativity within M1 and the corresponding TDW in the ECoG. This hypothesis was confirmed by the measurement of the membrane conductance change during the TDW and attendant *DC* shift (Fig. 3C, left grey traces). Negative current pulses of short duration were repeatedly applied (-0.6 nA, 20 ms, every 100 ms) through the intracellular pipette before and during the TDW (Fig. 3C, left). The current-induced membrane potential drops were considerably reduced during the TDW-associated cell depolarization (baseline, 8.0 ± 3.1 mV *versus* TDW, 1.3 ± 1.0 mV, $n = 7$ neurons; $P = 0.016$), leading to a quasi-cancelling of membrane resistance in three neurons (membrane resistance < 5 M Ω) (Fig. 3C, right).

Cortical neurons initiating the TDW are more active and hyperexcitable

To get insights into the cellular and network mechanisms responsible for the emergence of TDW and TDS in our rat model, we compared the ongoing activity,

integrative properties and excitability of M1 neurons between control rats, receiving a single vehicle injection in M1 ($n = 11$ neurons from 5 rats), and DTX rats ($n = 22$ neurons from 15 rats).

During baseline period, control and DTX cortical neurons showed fast and irregular synaptic fluctuations (Fig. 4A), leading to unimodal V_m distributions (Fig. 4A, right). Although the average membrane polarization was similar in both groups ($P = 0.6$), the magnitude of V_m fluctuations (SD V_m) was significantly attenuated in DTX neurons ($P = 0.007$) (Fig. 4A and B). The spontaneous firing rate was increased in the DTX group ($P = 0.04$) and the AP discharge became more regular ($P = 0.01$) (Fig. 4A and B). This increased spontaneous firing was accompanied by a lowering of the voltage AP threshold ($P = 0.005$) (Fig. 4B).

We then compared the membrane resistance (R_m) and the membrane time constant (τ_m), which respectively control the efficiency of synaptic currents to displace V_m and the capacity of a neuron to summate synaptic potentials in time. Voltage-current (V - I) relations were linear, indicating a lack of membrane rectification in the hyperpolarizing direction in the two groups (Fig. 5A). However, the slope of the V - I relation was steeper in the DTX group, resulting in larger R_m values ($\sim +45\%$) as compared to control condition ($P = 0.02$) (Fig. 5A). As expected, this was associated with an increase in τ_m in DTX neurons ($P = 0.04$) (Fig. 5A).

The high-frequency firing in the majority of M1 neurons during the TDW could result, at least in part, from an exacerbated intrinsic excitability in DTX condition. We thus compared the frequency-current (F - I) relations of cortical pyramidal neurons, *i.e.* their output firing in response to excitatory inputs of increasing intensity, between control ($n = 8$) and DTX ($n = 9$) neurons. Series of depolarizing current pulses were applied to both groups of neurons to compute the threshold current for AP generation and the slope of the F - I curves (neuronal gain) (Fig. 5B). The current threshold was consistently reduced by $\sim 48\%$ in DTX pyramidal cells ($P = 0.04$), while the slope of F - I curves remained unaffected ($P = 0.9$) (Fig. 5B). This indicates an amplification of M1 neurons responsiveness to weak synaptic inputs and a stability of their neuronal gain after DTX injection. The coordinated firing of most M1 neurons during TDW could result from an increase in the temporal reliability of cells discharging in response to suprathreshold excitation. We thus compared the latency and temporal precision of the first AP induced by suprathreshold depolarizing current steps in DTX and control

neurons (Fig. 5C). Accordingly, we observed that the latency of evoked APs and the SD of the first AP latency were indeed substantially reduced in DTX neurons ($P = 0.004$ and $P = 0.02$ respectively) (Fig. 5C).

Progressive changes in cortical neurons activity during inter-ictal periods

The ictogenic mechanisms underlying the high recurrence of TDS at the paroxysm of anti LGI1-encephalitis remain unknown. To investigate this question, we attempted to determine whether the DTX-induced TDW was preceded by time-dependent changes in neuronal and synaptic activities within M1.

We first searched for possible modifications in the firing rate of DTX M1 neurons between successive TDWs in extracellular recordings (Fig. 6A). The majority of neurons ($n = 34/65$ SUs; 52%) showed a progressive increase in their discharge frequency, which culminated at the approach of the TDW (Fig. 6A and B). Indeed, their mean firing rate, which was 1.1 ± 2.1 Hz after termination of a seizure reached 2.3 ± 2.9 Hz just before the next TDW (mean increase of $\sim 103\%$; average rate of increase of 0.3 ± 0.5 Hz.min⁻¹; $P < 0.001$) (Fig. 6B right, red curves). In a second neuronal population ($n = 22$ SUs; 34%), the initial interictal firing frequency (2.5 ± 5.1 Hz, $n = 22$ SUs) was not significantly modified over the interictal periods ($P = 0.15$) (Fig. 6B right, black curves). Finally, 9 SUs exhibited a substantial decrease in their firing rate over the inter-seizure period, from 3.6 ± 3.2 Hz to 1.0 ± 1.0 Hz ($n = 9$ SUs; $P < 0.001$) (Fig. 6B right, blue curves).

The increase in extracellular firing observed in most neurons during inter-ictal epochs could originate from various non-exclusive processes, including a progressive membrane depolarization, an increased amplitude of V_m fluctuations, a change in background synaptic patterns or a lowering of the voltage AP threshold. To test for these different mechanisms, we further analyzed the dynamics of intracellular activities during the inter-TDS period (Fig. 6 C and D). In a majority of neurons ($\sim 67\%$), we observed a slow membrane depolarization (from -73.6 ± 4.6 to -71.8 ± 4.1 mV, rate of V_m change = 0.74 ± 0.48 mV.min⁻¹, $n = 8/12$ neurons) accompanied by a significant increase in the amplitude of V_m fluctuations over time ($n = 5/12$ neurons) (Fig 6D, left and middle, red lines). The four remaining cells exhibited a slight decrease or a lack of change in their V_m and SD V_m values over the course of the interictal period (Fig 6D,

left and middle, blue and black lines). A time-dependent analysis of the frequency content of background synaptic activity also revealed a robust increase in the power of frequencies above 20 Hz, preceding the TDW (Fig. 6C, bottom and 6D, right). Finally, comparing measurements of voltage AP threshold just after (-59.8 ± 3.1 mV, $n = 10$ neurons) or immediately before (-59.2 ± 2.7 mV, $n = 10$ neurons) seizure occurrence indicated an absence of significant change over the interictal period ($P = 0.11$, Wilcoxon signed-rank test).

DTX-induced TDWs are suppressed by antiepileptic drug potentiating K⁺ channels

Our results indicate that alteration of voltage-dependent Kv1.1 channels in M1 reliably reproduces the EEG features and motor symptoms associated with TDS in humans. Based on these findings, we next tested in our freely-moving rodent model whether the potentiation of K⁺ currents by retigabine, a first-in-class voltage-dependent K⁺ channel opener³³ known to be effective on focal epilepsy,³⁴ could compensate for the effects of Kv1.1 disruption.

Video-EEG recordings were obtained from 5 rats injected with DTX in M1 and treated with retigabine after 3h of baseline monitoring, and from two groups of control rats, including untreated DTX rats ($n = 9$) and DTX rats treated with DMSO ($n = 5$) (Fig. 7A). In the retigabine-treated rats, the frequency of TDW-seizure complexes before treatment was 20.1 ± 6.8 per hour (between 9 and 25/hour, $n = 5$ rats). During the first hour following systemic injection of retigabine, we observed a considerable reduction of seizures, with a residual rate of occurrence of 1 or 2 per hour in 2 rats, or a total extinction in 3 rats (Fig. 7B). The number of TDW-seizure complexes then slowly recovered but remained significantly lower compared to before treatment, up to 10 h after retigabine injection (5.8 ± 12 h⁻¹, $n = 5$ rats; $P = 0.03$) (Fig. 7B). The frequency of seizures recurrence remained stable over time for the untreated rats ($n = 9$) and the rats treated with DMSO ($n = 5$) ($P = 0.82$ and $P = 0.30$, respectively, ANOVA) (Fig. 7B).

Discussion

Different strategies have been attempted to establish a causal link between seizures and LGI1 disruption in anti-LGI1 autoimmune encephalitis, such as the development of *in vivo* mouse models of the disease by infusing anti-LGI1 antibodies into the hippocampus and cerebral ventricles for seven to fourteen days. While this experimental procedure decreased the expression of Kv1.1 channels and AMPAR and increased excitability of hippocampal neurons,^{21,23} it did not permit the emergence of seizures. As autoimmune encephalitis evolves for several weeks or months before reaching a severe phenotype, it is likely that the 10-15% decrease in channels expression obtained after two weeks of infusion was not sufficient to trigger seizures.²³ Conversely, in the LGI1 KO mice that exhibited frequent generalized seizures, the density of Kv1.1 was diminished by more than 50% compared to control mice.¹⁹ Thus, the antibody-infusion method, which is crucial to demonstrate the pathogenicity of autoantibodies, does not appear well suited to reproduce the patients' phenotype. Our experimental strategy was thus to focus on the pathophysiological mechanisms downstream to LGI1, by directly targeting Kv1.1 channels that are expressed in both somatodendritic and axonal cell compartments,³⁵ and whose function is impaired by anti-LGI1 antibodies.^{21,23,24}

We demonstrated that the injection of DTX in the motor cortex of adult rodents faithfully recapitulates human TDS. Similar to anti-LGI1 autoimmune encephalitis patients, seizures in rodents were frequent and regular, preceded by a stereotyped EEG wave, which was associated with a characteristic tonic-dystonic contraction of the upper limbs. By performing extracellular and intracellular recordings of M1 neurons in this new rodent model of TDS, we also described cellular and network mechanisms responsible for the triggering and recurrence of TDS.

Kv1.1 channels conduct a critical K⁺ current that activates at membrane potentials close to the AP voltage threshold³⁶ and prevents hyperexcitability by limiting and delaying the neuronal discharge.^{37,38} Accordingly, we found that the intrinsic excitability of M1 pyramidal neurons poisoned with DTX was consistently increased. This was expressed as an increase in membrane resistance and a reduction in both current and voltage thresholds for AP triggering, resulting in a facilitation of their spontaneous and evoked discharge. Similar effects of DTX on neuronal excitability,

attributed to a direct inhibitory action on Kv1.1 channels,^{38–40} have been previously reported in pyramidal neurons^{37–39,41} and in neocortical GABAergic interneurons.^{40,42} Interestingly, we also showed that the hyperexcitability of pyramidal neurons after DTX injection was accompanied by a shorter latency and a lower variability of their current-evoked AP discharge, as well as an increased regularity of their spontaneous firing, as previously observed.^{37,39} Overall, these DTX-induced modifications of membrane properties in individual neurons at the injection site are likely to be responsible for dynamic modifications within the M1 network that will favor paroxysmal synchronized activities.

We therefore propose the following diachronic scenario to explain the cyclic recurrence of seizures. We observed in most DTX pyramidal cells an enhanced membrane polarization immediately after seizures, despite a lack of change in the average interictal V_m values compared to control neurons. This relative neuronal hyperpolarization after seizure termination likely results from the activation of Ca^{2+} -dependent K^+ conductance, caused by intense firing and consecutive increase in intracellular Ca^{2+} concentration during the preceding seizure activity (Fig. 8, period 1), as previously proposed for post-ictal depression in other types of neocortical seizures.⁴³ Neurons then progressively recover a more depolarized membrane potential, instigating a progressive increase in firing rate amplified by the facilitating effect of Kv1.1 channels blockade on intrinsic and synaptically-induced firing (Fig. 8, period 2).³⁵ This increase in firing rate among M1 neurons could result in an amplification of the background synaptic drive through local synaptic interactions that may participate in the progressive membrane depolarization²⁷ and facilitate the coupling between excitatory postsynaptic potentials and Aps.^{35,38} It may thus explain the increased frequency of ongoing synaptic events in M1 neurons observed just before seizures, and the triggering – through a temporal summation facilitated by an increased membrane time constant – of a paroxysmal depolarization in a majority of neurons (Fig. 8, periods 3 and 4). The abnormally large positive shift in membrane potential underlying the TDW closely resembles the monolithic epileptic event called “paroxysmal depolarization shift”,⁴⁴ which is due to the synergistic effects of voltage-gated and synaptic conductances (G_m).⁴⁵ In line with this scenario, we found that the TDW-associated depolarizations were associated with a collapse of membrane resistance values in pyramidal neurons. The synchronization of TDW-related

paroxysmal depolarizations within the motor cortex, attested by the large-amplitude negative *DC* shift simultaneously recorded in the extracellular space, likely elicited a robust and coordinated discharge among M1 cortical neurons, including those of the pyramidal tract initiating the tonic muscular contractions.

The decreased firing observed in a minority of M1 neurons during the TDW could result from a collateral inhibition originating from local interneurons, activated by the pyramidal neurons subtending the paroxysmal depolarization. This process, known to control the spatial extent of excitation among M1 neurons,⁴⁶ could account for the relatively focused motor response to the TDW. Relying on the strong similarity of TDW and TDS between anti-LGI1 encephalitis patients and the rodent model, we can envisage similar ictogenic processes in humans.

There are potential limitations to our study. Our rodent model, which recapitulates human TDS via a specific blockade of Kv1.1 channels, does not directly mimic the autoimmune process and the full spectrum of disturbances mediated by the anti-LGI1 antibodies. In particular, a dysfunction in AMPAR, as observed in LGI1 KO mice and in mice treated with human anti-LGI1 antibodies,^{23,47–49} and its possible consecutive modulation of the excitation/inhibition balance, could also participate to the initiation of seizure activity. Future studies, combining dysfunctions of both Kv1.1 channels and AMPAR, will be needed to appreciate the specific contribution of LGI1's synaptic partners.

We have shown that the AED retigabine was effective in blocking DTX-induced seizures, possibly by compensating some of the neuronal changes triggered by Kv1.1 deficiency. Although the prescription of retigabine is now suspended because of its adverse effects,⁵⁰ our results highlight a new possible therapeutic approach that could, in association with immunotherapy, be used to treat seizures at the early stage of the anti-LGI1 disease, as well as in infantile epileptic spasms which share common findings with anti-LGI1 TDS.⁵¹

Acknowledgements

The authors thank all the technical staff from the Histomics core facility and from the PHENOPARC core facility of the Paris Brain Institute.

Funding

Agence nationale de la recherche, 'Investissements d'avenir' program ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS

Fondation pour la Recherche Médicale, grant FDT202012010523

Fondation Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES, Marie Laure PLV Merchandising)

Author contribution

Conceptualization: PB, SC, SM, VN

Methodology: PB, SW, SC, SM, VN

Investigation: PB, DR, SL

Resources: PB, LC, KL

Formal analysis: PB, SW

Visualization: PB, SW, SC, SM, VN

Funding acquisition: PB, SC, SM, VN

Project administration: SC, SM, VN

Supervision: SC, SM, VN

Writing – original draft: PB, SC, SM, VN

Writing – review & editing: SW, LC, DR, SL, KL

Competing interests

V.N. reports personal fees from UCB, Liva Nova, and Eisai, outside the submitted work. The other authors declare that they have no competing interests.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

1. Goodfellow JA, Mackay GA. Autoimmune encephalitis. *J R Coll Physicians Edinb.* 2019;49(4):287-294. doi:10.4997/JRCPE.2019.407
2. Husari KS, Dubey D. Autoimmune Epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2019;16(3):685-702. doi:10.1007/s13311-019-00750-3
3. Dalmau J, Geis C, Graus F. Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiol Rev.* 2017;97(2):839-887. doi:10.1152/physrev.00010.2016
4. Navarro V, Kas A, Apartis E, et al. Motor cortex and hippocampus are the two main cortical targets in LGI1-antibody encephalitis. *Brain.* 2016;139(4):1079-1093. doi:10.1093/brain/aww012
5. Ghimire P, Khanal UP, Gajurel BP, et al. Anti-LGI1, anti-GABABR, and Anti-CASPR2 encephalitides in Asia: A systematic review. *Brain Behav.* 2020;10(10). doi:10.1002/brb3.1793
6. Griffith SP, Malpas CB, Alpitsis R, O'Brien TJ, Monif M. The neuropsychological spectrum of anti-LGI1 antibody mediated autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol.* 2020;345:577271. doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577271
7. Liu R, Zhang M, Liu L, et al. Neuronal Surface Antibody Syndrome: A Review of the Characteristics of the Disease and Its Association with Autoantibodies. *Neuroimmunomodulation.* 2020;27(1):1-8. doi:10.1159/000507448
8. Ramanathan S, Al-Diwani A, Waters P, Irani SR. The autoantibody-mediated encephalitides: from clinical observations to molecular pathogenesis. *J Neurol.* 2021;268(5):1689-1707. doi:10.1007/s00415-019-09590-9
9. Irani SR, Mitchell AW, Lang B, et al. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol.* 2011;69(5):892-900. doi:10.1002/ana.22307

10. Wennberg R, Steriade C, Chen R, Andrade D. Frontal infraslow activity marks the motor spasms of anti-LGI1 encephalitis. *Clin Neurophysiol.* 2018;129(1):59-68. doi:10.1016/j.clinph.2017.10.014
11. Liu X, Han Y, Yang L, et al. The exploration of the spectrum of motor manifestations of anti-LGI1 encephalitis beyond FBDS. *Seizure.* 2020;76:22-27. doi:10.1016/j.seizure.2019.12.023
12. Irani SR, Stagg CJ, Schott JM, et al. Faciobrachial dystonic seizures: the influence of immunotherapy on seizure control and prevention of cognitive impairment in a broadening phenotype. *Brain.* 2013;136(10):3151-3162. doi:10.1093/brain/awt212
13. Feyissa AM, Lamb C, Pittock SJ, et al. Antiepileptic drug therapy in autoimmune epilepsy associated with antibodies targeting the leucine-rich glioma-inactivated protein 1. *Epilepsia Open.* 2018;3(3):348-356. doi:10.1002/epi4.12226
14. de Bruijn MAAM, van Sonderen A, van Coevorden-Hameete MH, et al. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABA_B R encephalitis. *Neurology.* 2019;92(19):e2185-e2196. doi:10.1212/WNL.00000000000007475
15. Thompson J, Bi M, Murchison AG, et al. The importance of early immunotherapy in patients with faciobrachial dystonic seizures. *Brain.* 2018;141(2):348-356. doi:10.1093/brain/awx323
16. Schulte U, Thumfart J-O, Klöcker N, et al. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron.* 2006;49(5):697-706. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.033
17. Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, et al. Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-03947-w
18. Fukata Y, Chen X, Chiken S, et al. LGI1–ADAM22–MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(3):e2022580118. doi:10.1073/pnas.2022580118

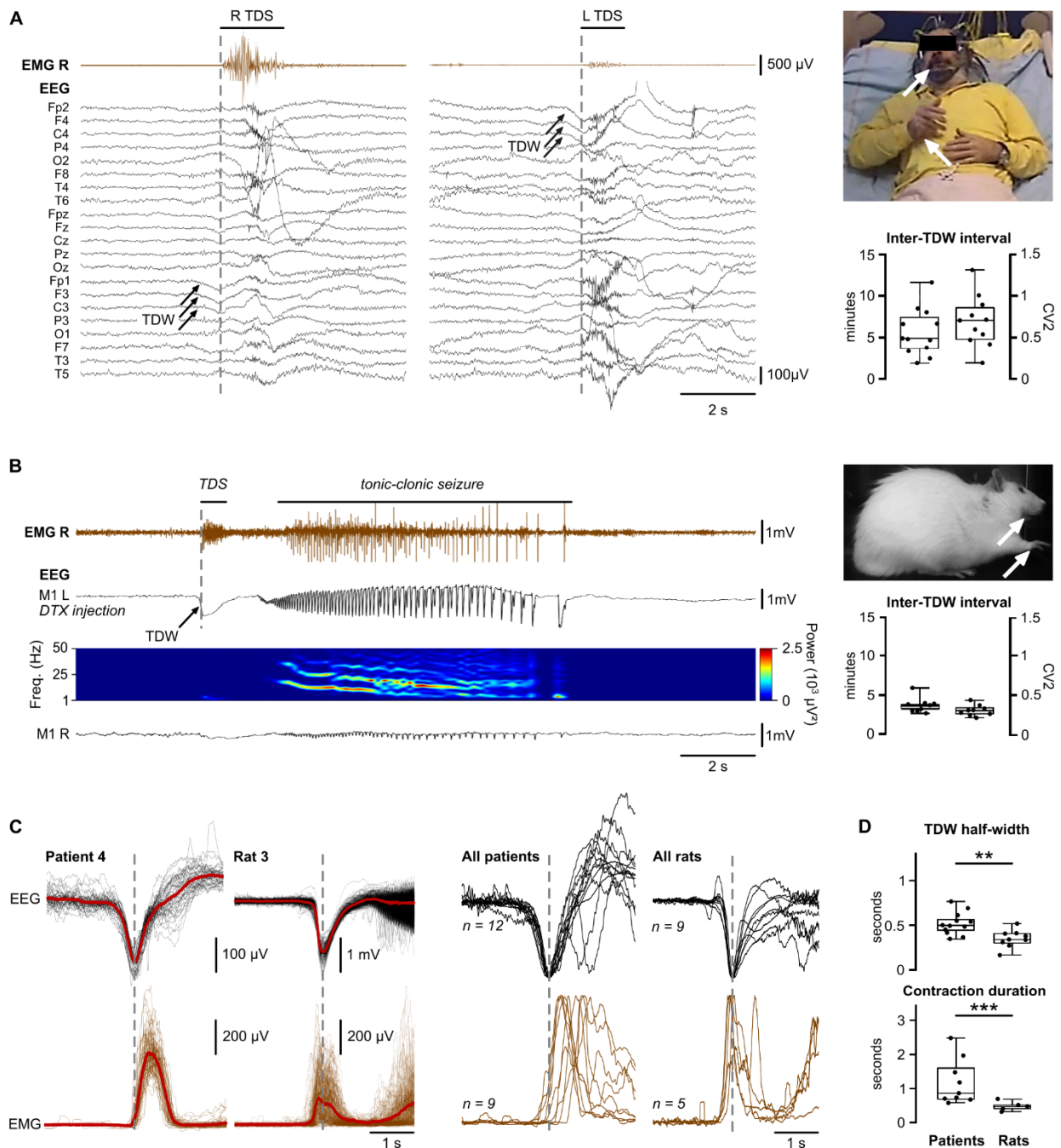
19. Seagar M, Russier M, Caillard O, et al. LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(29):7719-7724. doi:10.1073/pnas.1618656114
20. Hivert B, Marien L, Agbam KN, Faivre-Sarrailh C. ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *J Cell Sci.* 2019;132(2). doi:10.1242/jcs.219774
21. Ramberger M, Berretta A, Tan JMM, et al. Distinctive binding properties of human monoclonal LGI1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain.* 2020;143(6):1731-1745. doi:10.1093/brain/awaa104
22. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, et al. Autoantibodies to Epilepsy-Related LGI1 in Limbic Encephalitis Neutralize LGI1-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *J Neurosci.* 2013;33(46):18161-18174. doi:10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013
23. Petit-Pedrol M, Sell J, Planagumà J, et al. LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain.* Published online October 20, 2018. doi:10.1093/brain/awy253
24. Kornau H, Kreye J, Stumpf A, et al. Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGI1 Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *Ann Neurol.* 2020;87(3):405-418. doi:10.1002/ana.25666
25. Harvey AL, Robertson B. Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. *Curr Med Chem.* 2004;11(23):3065-3072. doi:10.2174/0929867043363820
26. Paxinos G, Watson CR. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Acad Press. Published online 1986.
27. Altwegg-Boussac T, Chavez M, Mahon S, Charpier S. Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J Physiol.* 2014;592(16):3577-3595. doi:10.1113/jphysiol.2013.270561

28. Langlois M, Polack P-O, Bernard H, et al. Involvement of the thalamic parafascicular nucleus in mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2010;30(49):16523-16535. doi:10.1523/JNEUROSCI.1109-10.2010
29. Depaulis A, David O, Charpier S. The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J Neurosci Methods*. 2016;260:159-174. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.05.022
30. Altwegg-Boussac T, Schramm AE, Ballesterro J, et al. Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain J Neurol*. 2017;140(9):2381-2398. doi:10.1093/brain/awx175
31. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 1995;57(1):289-300.
32. Bikson M, Hahn PJ, Fox JE, Jefferys JGR. Depolarization block of neurons during maintenance of electrographic seizures. *J Neurophysiol*. 2003;90(4):2402-2408. doi:10.1152/jn.00467.2003
33. Varghese N, Lauritano A, Tagliatalata M, Tzingounis AV. KCNQ3 is the principal target of retigabine in CA1 and subicular excitatory neurons. *J Neurophysiol*. 2021;125(4):1440-1449. doi:10.1152/jn.00564.2020
34. Gunthorpe MJ, Large CH, Sankar R. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy: Retigabine (Ezogabine) Mechanism of Action. *Epilepsia*. 2012;53(3):412-424. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03365.x
35. Ovsepian SV, LeBerre M, Steuber V, O'Leary VB, Leibold C, Oliver Dolly J. Distinctive role of KV1.1 subunit in the biology and functions of low threshold K⁺ channels with implications for neurological disease. *Pharmacol Ther*. 2016;159:93-101. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.01.005
36. Guan D, Lee JCF, Tkatch T, Surmeier DJ, Armstrong WE, Foehring RC. Expression and biophysical properties of Kv1 channels in supragranular

- neocortical pyramidal neurones. *J Physiol.* 2006;571(Pt 2):371-389. doi:10.1113/jphysiol.2005.097006
37. Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud P, Debanne D. Spike-Time Precision and Network Synchrony Are Controlled by the Homeostatic Regulation of the D-Type Potassium Current. *J Neurosci.* 2010;30(38):12885-12895. doi:10.1523/JNEUROSCI.0740-10.2010
38. Guan D, Lee JCF, Higgs MH, Spain WJ, Foehring RC. Functional roles of Kv1 channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 2007;97(3):1931-1940. doi:10.1152/jn.00933.2006
39. Higgs MH, Spain WJ. Kv1 channels control spike threshold dynamics and spike timing in cortical pyramidal neurones: Kv1 channels control threshold dynamics. *J Physiol.* 2011;589(21):5125-5142. doi:10.1113/jphysiol.2011.216721
40. Li K-X, Lu Y-M, Xu Z-H, et al. Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat Neurosci.* 2012;15(2):267-273. doi:10.1038/nn.3006
41. Bekkers JM, Delaney AJ. Modulation of Excitability by α -Dendrotoxin-Sensitive Potassium Channels in Neocortical Pyramidal Neurons. *J Neurosci.* 2001;21(17):6553-6560. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-17-06553.2001
42. Goldberg EM, Clark BD, Zagha E, Nahmani M, Erisir A, Rudy B. K⁺ Channels at the Axon Initial Segment Dampen Near-Threshold Excitability of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons. *Neuron.* 2008;58(3):387-400. doi:10.1016/j.neuron.2008.03.003
43. Timofeev I, Grenier F, Steriade M. Contribution of Intrinsic Neuronal Factors in the Generation of Cortically Driven Electrographic Seizures. *J Neurophysiol.* 2004;92(2):1133-1143. doi:10.1152/jn.00523.2003
44. Prince DA. The depolarization shift in "epileptic" neurons. *Exp Neurol.* 1968;21(4):467-485. doi:10.1016/0014-4886(68)90066-6

45. Hotka M, Kubista H. The paroxysmal depolarization shift in epilepsy research. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;107:77-81. doi:10.1016/j.biocel.2018.12.006
46. Georgopoulos AP, Stefanis CN. Local shaping of function in the motor cortex: motor contrast, directional tuning. *Brain Res Rev.* 2007;55(2):383-389. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.001
47. Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, et al. Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(8):3799-3804. doi:10.1073/pnas.0914537107
48. Zhou Y-D, Lee S, Jin Z, Wright M, Smith SEP, Anderson MP. Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat Med.* 2009;15(10):1208-1214. doi:10.1038/nm.2019
49. Yu YE, Wen L, Silva J, et al. Lgi1 null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability. *Hum Mol Genet.* 2010;19(9):1702-1711. doi:10.1093/hmg/ddq047
50. Clark S, Antell A, Kaufman K. New antiepileptic medication linked to blue discoloration of the skin and eyes. *Ther Adv Drug Saf.* 2015;6(1):15-19. doi:10.1177/2042098614560736
51. Specchio N, Pietrafusa N, Ferretti A, et al. Treatment of infantile spasms: why do we know so little? *Expert Rev Neurother.* 2020;20(6):551-566. doi:10.1080/14737175.2020.1759423

Figures



was consistently preceded by a contralateral large amplitude negative slow wave (tonic-dystonic wave, TDW) on a few adjacent fronto-central EEG electrodes (arrows). Dashed lines mark the beginning of tonic-dystonic contraction. The summary plot (right) illustrates the periodicity and regularity of occurrence (CV2) of TDWs ($n = 12$ patients). **(B)** EEG records from the left (L) and right (R) motor cortices (M1) (black traces) in a freely-moving rat, and corresponding EMG activity of the front paw extensors (EMG R, brown trace), following the injection of DTX in the left M1. The rodent TDW in M1L was correlated in time with the right-sided tonic-dystonic contraction (dashed line), and shortly (0.8-1.5 s) followed by a tonic-clonic seizure associated with paroxysmal oscillations on the EEG. The temporally-aligned time-frequency map illustrates the evolution of the EEG frequency content. The picture at right illustrates a tonic-dystonic contraction of the right upper limb and ipsilateral hemiface in a DTX rat. Population data of TDW's periodicity and regularity are shown on the bottom right ($n = 9$ rats). **(C-D)** Comparison of TDW and tonic-dystonic contraction between patients and DTX rats. **(C)** Left, Superimposition of single TDWs collected from Patient #4 and from Rat #3 (black traces) and corresponding envelope of rectified EMG activities (brown traces). The peak of TDWs was taken as the time reference for alignment of the records. The red traces correspond to averages. Right, Superimposition of the average TDWs computed for all patient ($n = 12$) and DTX rats ($n = 9$), and corresponding envelopes of EMG activity. EEG and EMG traces have been normalized in amplitude and aligned according to the peak of TDWs. **(D)** Population data comparing the half-duration amplitude (half-width) of TDWs and muscular contraction duration between patients ($n = 12$) and rats ($n = 9$). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (two-tailed Mann-Whitney rank-sum test).

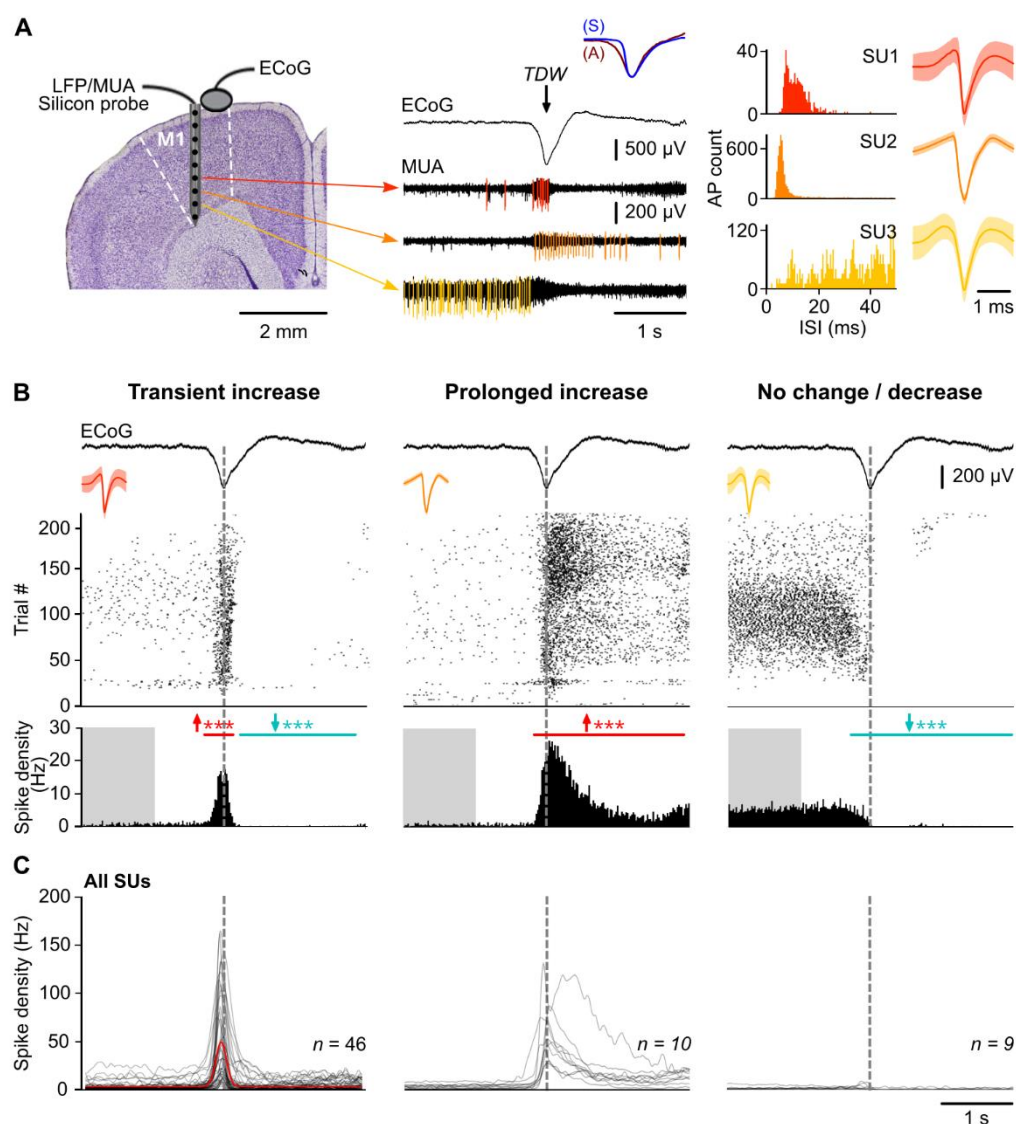


Figure 2 Extracellular firing profiles of M1 neurons during the TDW. (A) Schematic drawing of recordings arrangement and isolation of single-unit (SU) activities. Local field potentials (LFP) were recorded at different depths of a M1 cortical column using a 16-channel silicon probe, in conjunction with an ECoG in a sufentanil-sedated DTX rat (left). LFP recordings were high-pass filtered at 300 Hz to extract multi-unit activity (MUA, black records) and the firing profile of SUs (colored traces) associated with the TDW in the ECoG (middle). Note in the inset the great similarity between the TDWs recorded in awake (A) and sedated (S) animals (amplitude is normalized). The average (\pm SD) spike waveform profiles and distribution of inter-spike-intervals (ISI) of the three SUs extracted from MUA records are shown at right. **(B)** Raster plots of spike activity (top) and corresponding peri-stimulus time histogram (bin = 10 ms; bottom) from three representative SUs (same cells as in **A**) sorted according to their firing change in association with the surface TDW: 1) a ‘Transient increase’ (left), 2) a ‘Prolonged

increase' (middle) or, 3) a lack of change or even a decrease ('No change/decrease', right). Grey dashed lines mark TDW peaks. Significance was assessed with a cluster-based permutation test comparing firing activity during the TDW with baseline firing (grey shaded area). The horizontal red and blue bars respectively indicate significant positive and negative clusters. *** $P < 0.001$. (C) Superimposed average ($n = 53$ – 219 TDWs) spike densities computed for all SUs in each group ('transient increase', $n = 46$; 'prolonged increase', $n = 10$; 'no change/decrease', $n = 9$).

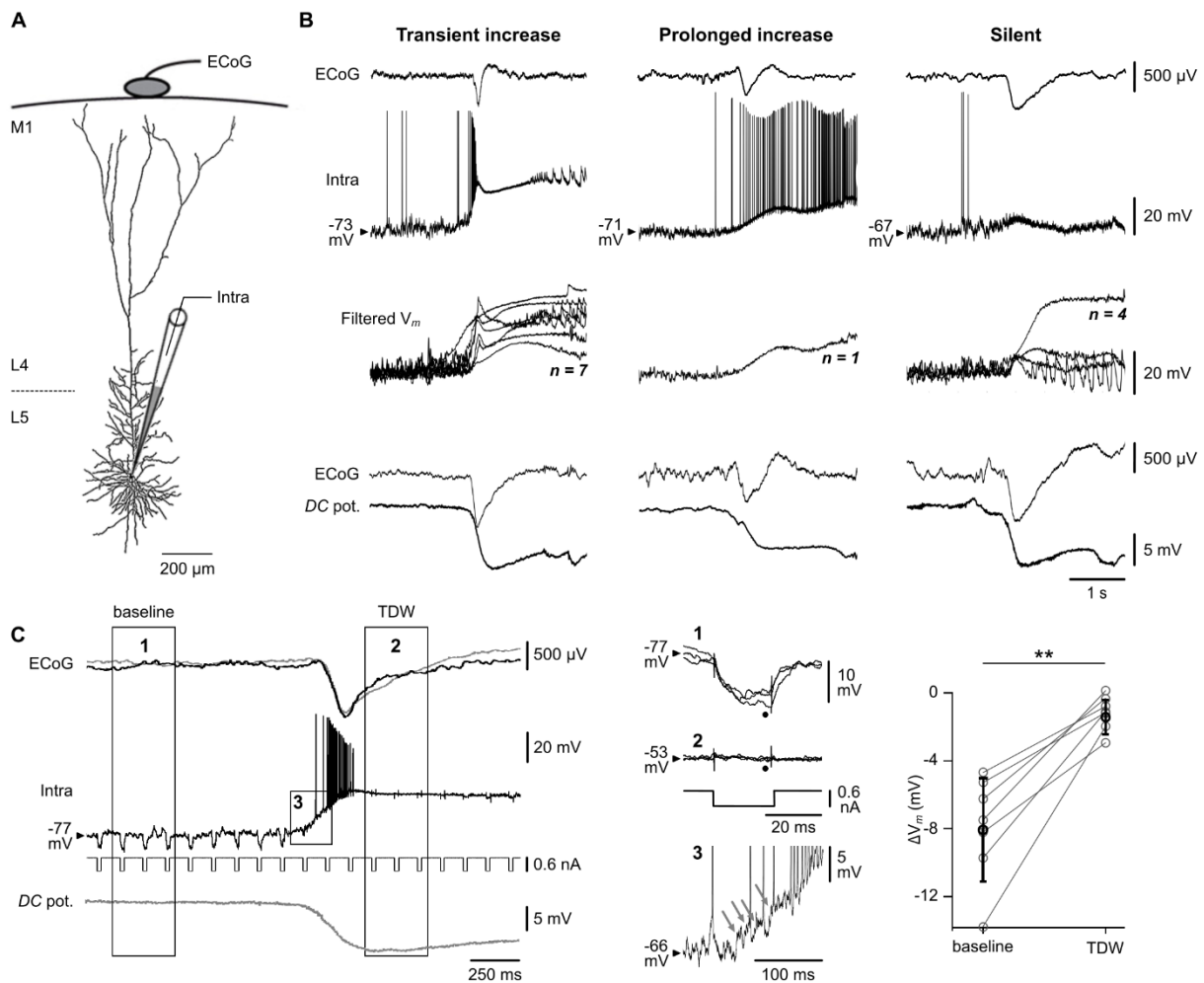


Figure 3 Intracellular correlates of the TDW in pyramidal M1 neurons. (A) Reconstruction of a layer 5 M1 pyramidal neuron intracellularly recorded (Intra) in conjunction with the ECoG activity from a DTX. **(B)** Top, Short epochs of intracellular activity from three M1 neurons showing a transient increase, a prolonged increase or a decrease in their firing rate in association with the TDW. V_m values are indicated on the left of the traces. Middle, Superimposed (by matching V_m values before TDW) subthreshold cell activity (after removal of APs and low-pass filtering at 70 Hz) from the cortical neurons of the three groups showing TDW-associated membrane depolarizations. Bottom, ECoG TDW and corresponding DC potential extracellularly recorded at the end of the intracellular recordings illustrated in the top panel. Time calibration applies for all traces. **(C)** ECoG activity (top traces) simultaneously recorded with DC potential (lower trace) or intracellular activity of a M1 neuron (middle trace) during the repeated injection of current pulses (-0.6 nA, 20 ms, every 100 ms) in baseline and during the TDW. Expansion of three voltage deflections (measured at the

time indicated by the black dots) during baseline (1) and TDW (2) periods are shown superimposed on the right. The expanded frame (3) shows that the onset of the TDW-associated depolarization (in absence of current pulses) is sculpted by the temporal summation of depolarizing synaptic potentials (oblique arrows). The summary graph illustrates the decrease in current-induced V_m changes during the TDW as compared to baseline ($n = 7$ neurons). $**P < 0.01$ (two-tailed Wilcoxon signed-rank test).

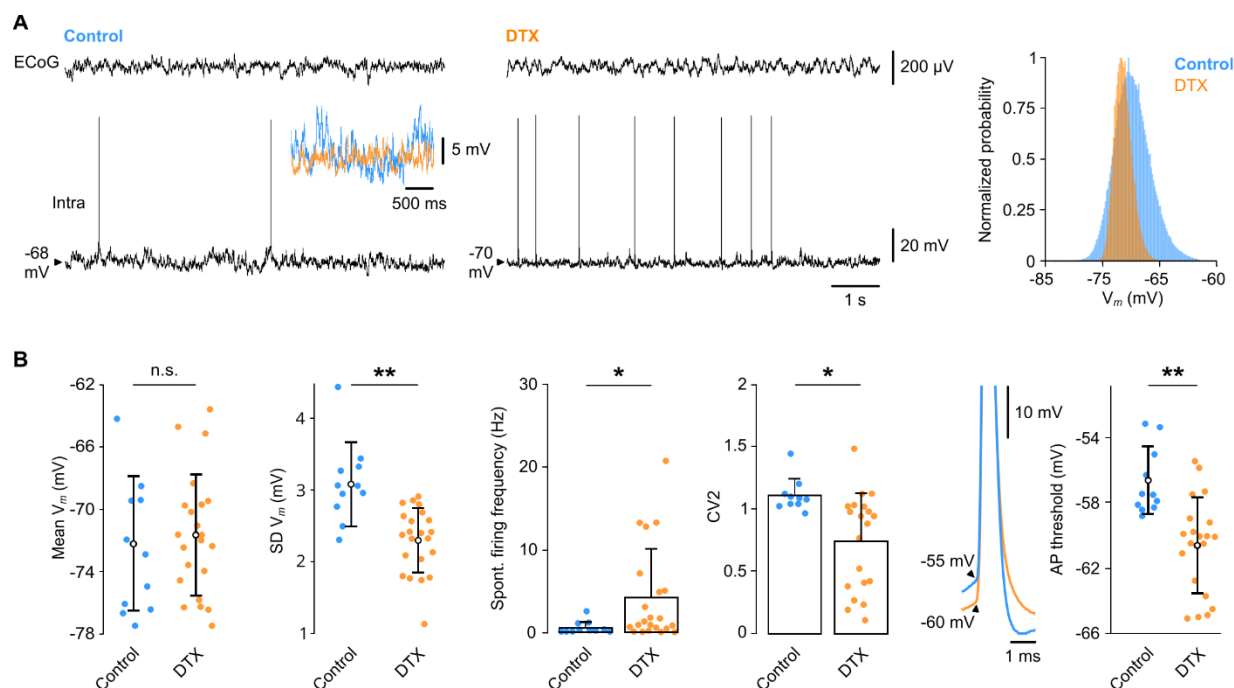


Figure 4 Spontaneous activity of M1 neurons is increased in DTX rats. (A) Simultaneous recordings of M1 ECoG and intracellular activity from a subjacent pyramidal cell in control (left) and DTX (middle) condition. Inset, DC superimposition of spontaneous synaptic activities (2.5 s duration) recorded in the control (blue) and DTX (orange) neuron. Right, distribution of V_m values from the two illustrated neurons. **(B)** Summary plots comparing mean V_m , SD V_m , spontaneous firing frequency, and CV2 of spike intervals in control (blue circles) and DTX (orange circles) condition. Right, DC superimposition of average ($n > 10$) spontaneous APs recorded in a DTX and a control neuron. Spikes are truncated for commodity. Population analysis revealed a significant decrease in the voltage firing threshold in DTX neurons as compared to control ($n = 11$ control and $n = 22$ DTX neurons). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, n.s., not significant (two-tailed Mann-Whitney rank-sum test with Benjamini-Hochberg's post hoc correction).

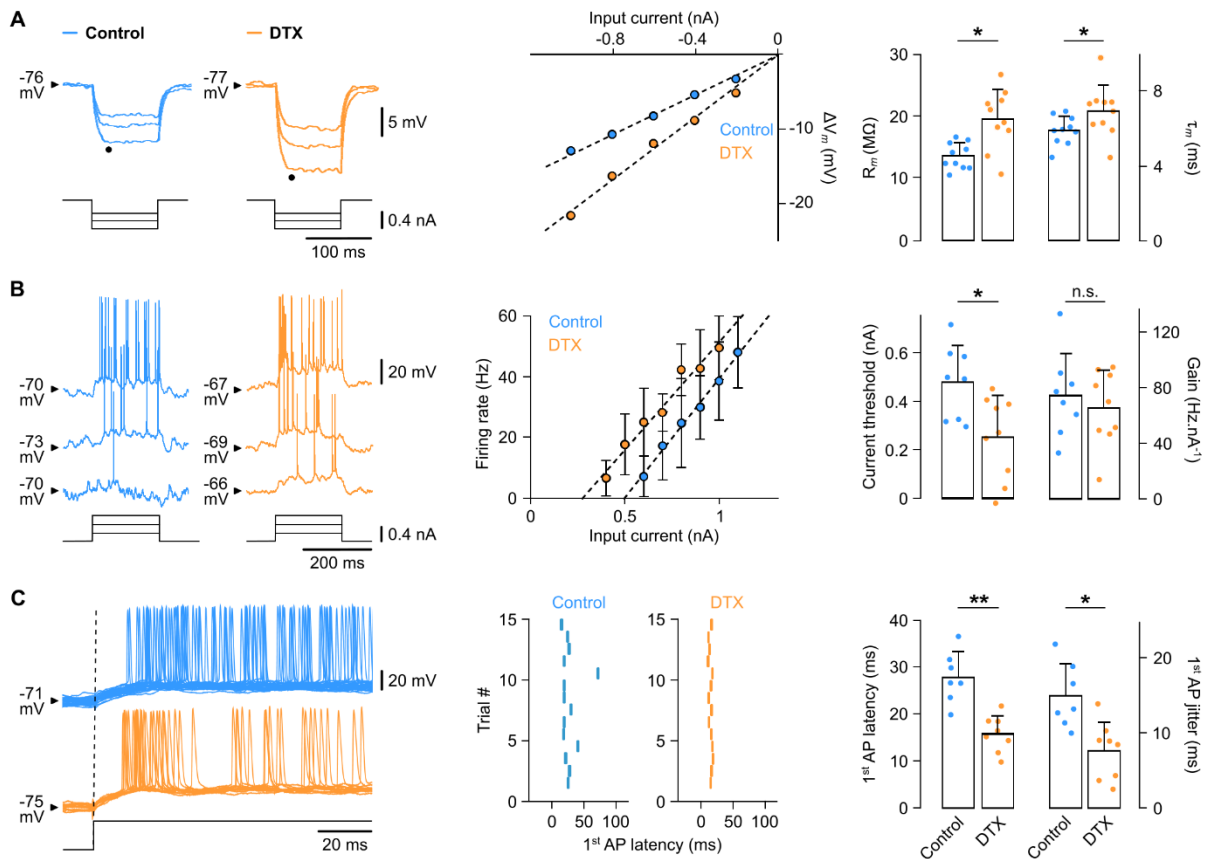


Figure 5 DTX M1 pyramidal neurons are more excitable. (A) Left, Average ($n = 16$ –28 trials) voltage responses of M1 pyramidal neurons (top traces), recorded from a rat intracortically-injected with PBS (Control) or DTX, to negative current pulses of increasing intensity (bottom traces) and corresponding $V-I$ plots. The black dots indicate the timing of ΔV_m measurements. Here and in the following panels, the pre-pulse V_m is indicated on the left of the traces. Blue and orange traces correspond to control and DTX condition, respectively. Dashed lines in $V-I$ plots correspond to the best linear regression ($r^2 > 0.99$ for both condition). Right, Summary plot comparing mean (\pm SD) values of R_m and τ_m in both conditions ($n = 10$ neurons). (B) Firing responses of a M1 pyramidal neuron (top traces) to depolarizing currents steps of increasing intensity (bottom traces) in control and DTX condition, and corresponding $F-I$ curves. Each symbol corresponds to the mean (\pm SD) firing rate calculated from 20–25 successive trials. Dashed lines correspond to the best linear regression ($r^2 > 0.95$) in the two conditions. Pooled current threshold and gain values from neurons in control ($n = 8$) and DTX condition ($n = 9$) are compared on the right. (C) Left, Fourteen overlaid firing responses (the first 100 ms are illustrated) of a M1 neuron in control and DTX rats. The corresponding raster plots of the first evoked AP are illustrated on the

right of the traces. Right, Mean values of first AP latency and jitter in control ($n = 7$) and DTX condition ($n = 8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, n.s., not significant (two-tailed Mann-Whitney rank-sum test with Benjamini-Hochberg's post hoc correction).

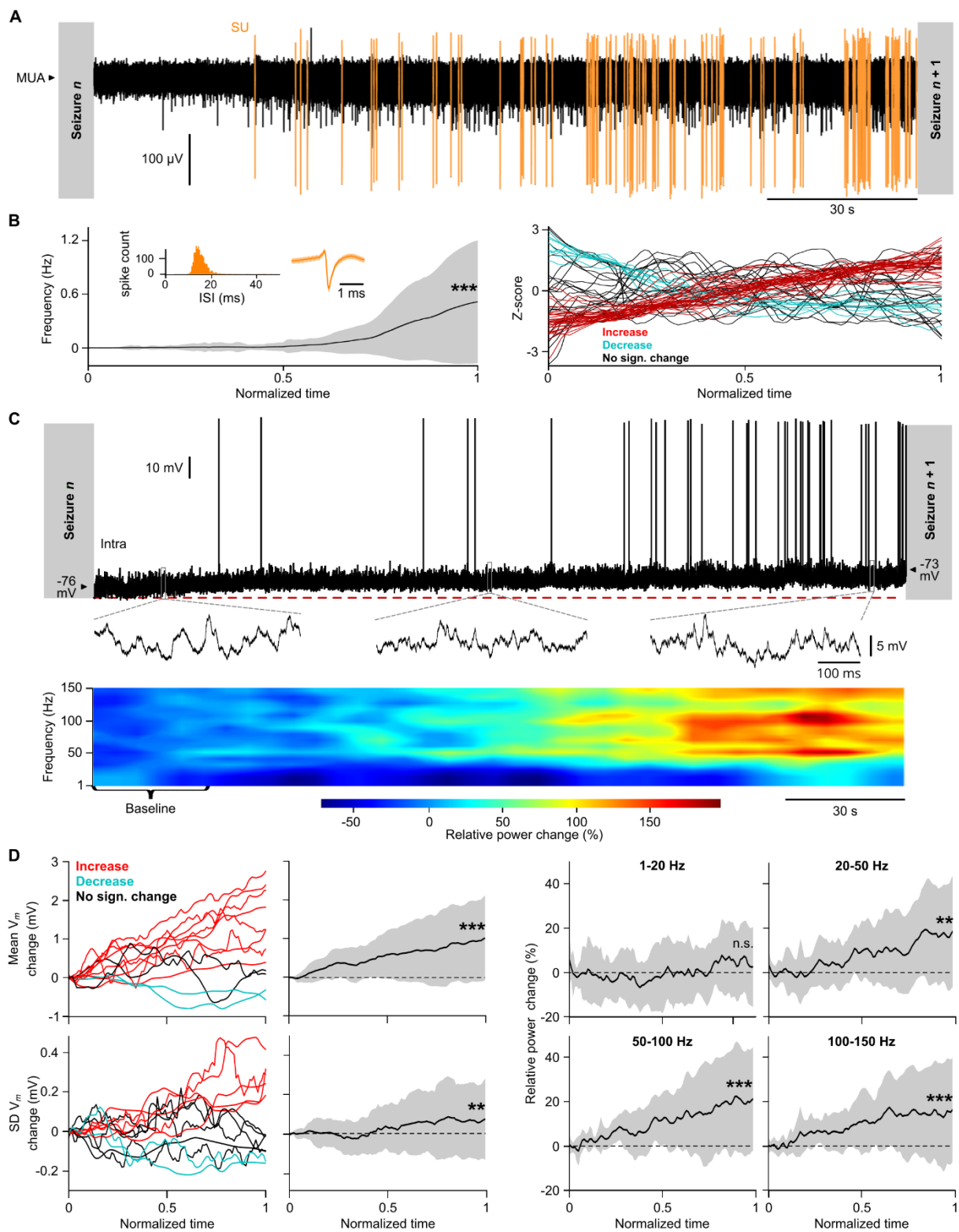


Figure 6 Progressive neuronal changes over the interictal periods. (A) Examples of MU (black trace) and SU (orange trace) activities in between seizures (grey shaded areas). **(B)** Left, Evolution of the mean (\pm SD) firing rate of the SU illustrated in (A) along inter-seizure periods ($n = 219$), after normalization of the duration of interictal episodes. ISI distribution and average spike waveform profile are shown in inset. Right,

Mean firing rate (normalized with a z-score) for all sorted SUs ($n = 65$, $n = 53$ – 219 inter-seizure periods per SU). The majority of cells showed a progressive increase in their spike frequency in between seizures (red lines, $n = 34/65$; $P < 0.05$, Pearson correlation), with the remaining neurons either exhibiting a decrease (blue lines, $n = 9$ $P < 0.05$) or an absence of significant change (black lines, $n = 22$, $P > 0.05$) in their firing rate. **(C)** Top, Intracellular activity of a M1 pyramidal neuron during the inter-seizure period (top traces) and expanded view of short periods of subthreshold synaptic activity (lower traces). A time-frequency map of subthreshold neuronal activity is shown below the records. The frequency power is normalized by the baseline power. **(D)** Top left, mean V_m computed over a sliding-time window of 30 seconds (each line corresponds to a single neuron). Pearson's correlation revealed a significant depolarization ($n = 8$), a lack of change ($n = 2$) or a hyperpolarization ($n = 2$) of V_m during inter-seizure periods. The evolution in time of mean V_m (\pm SD) computed over all neurons is shown at right. Bottom left, Similar measurements and statistics applied to the SD V_m . Right, Interictal evolution of the mean (\pm SD) relative power change computed for four different frequency bands. Note the increased power for frequencies above 20 Hz. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, n.s., not significant (Pearson's correlation with Benjamini-Hochberg's post hoc correction).

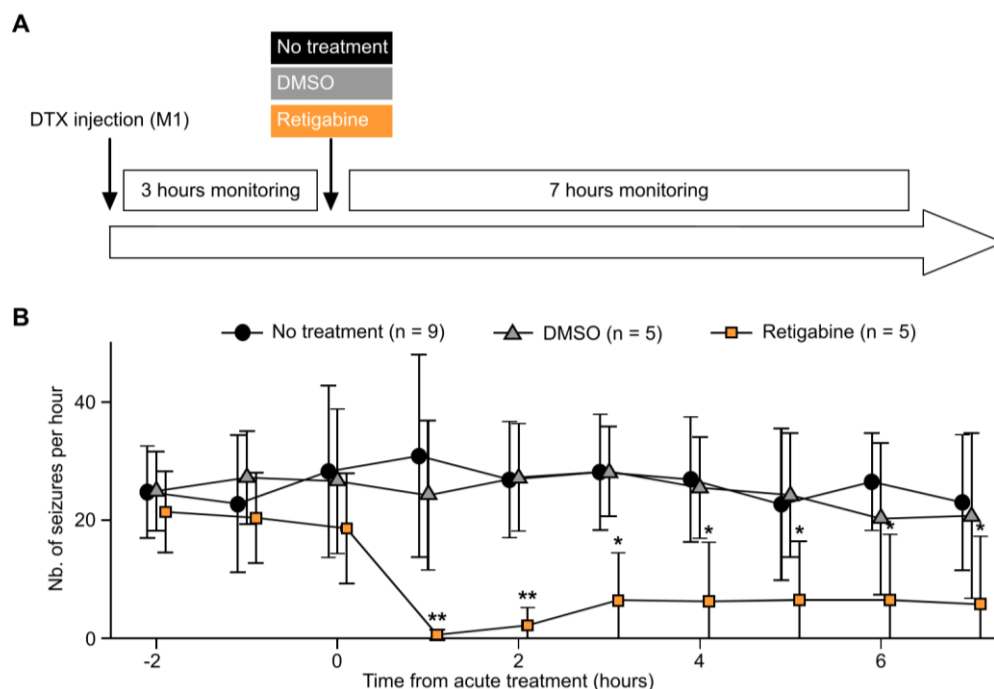


Figure 7 DTX-induced seizures are blocked by retigabine. (A) Experimental design for testing the effects of retigabine on DTX-induced seizures. Rats were implanted with M1L and M1R electrodes for long-term EEG monitoring of seizure activity following intracerebral injection of DTX in M1. After 3 hours of monitoring, rats were treated with acute injection of retigabine (5 mg.kg^{-1} , $n = 5$ rats) or DMSO 50% (2 ml.kg^{-1} , $n = 5$ rats) to assess the effect of these compounds on seizure recurrence. A DTX group did not receive any acute treatment (no treatment, $n = 9$). (B) Number of seizures per hour recorded in the three experimental groups. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (two-tailed Mann-Whitney rank-sum test with Benjamini-Hochberg's post hoc correction).

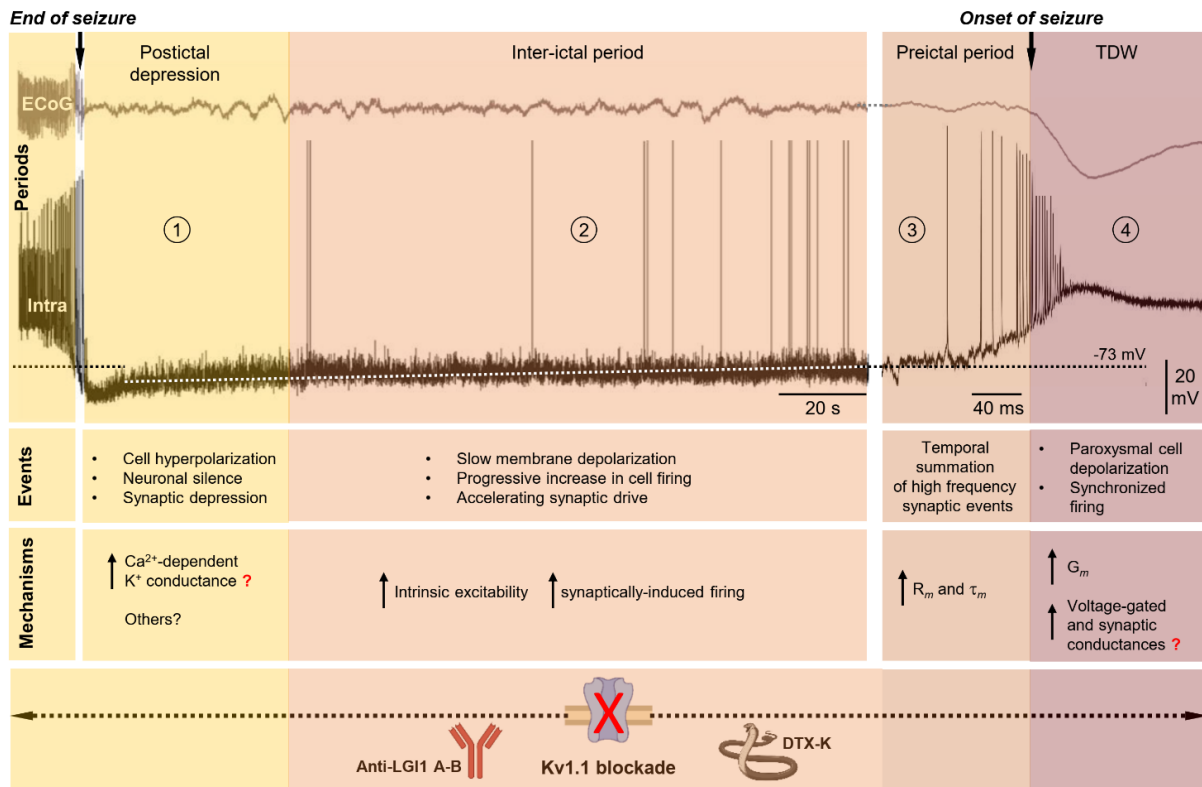


Figure 8 Diachronic scenario that could explain the cyclic recurrence of seizures after disruption of Kv1.1 channels. See *Discussion* for explanations on each step of this scenario.

Supplementary Material

Supplementary Material and Methods

Multi-scale electrophysiological recordings in sedated DTX rats

ECoG activity was recorded with of a low impedance (~ 60 k Ω) silver electrode placed on the dura above M1, and a reference electrode apposed on a contralateral temporal muscle. ECoG signals were amplified with a differential AC amplifier (Model 1700; A-M Systems), filtered between 0.1 Hz and 1 kHz, and digitized at 3 kHz (CED 1401 Micro3; Spike2 software version 7.20, Cambridge Electronic Design) for off-line analysis.

Recordings of LFP and MUA were performed using a 16-channel (250- μ m electrode separation distance) silicon-based probe (35 μ m site IrOx, ATLAS Neuroengineering[®]) inserted into the M1, 200 μ m anterior to the injection site. LFP signals were amplified and filtered between 0.1 Hz and 6 kHz, using a DigitalLynx (NeuraLynx[®]) amplifier, and digitized at 32 kHz for post hoc analysis.

Intracellular recordings were performed with glass micropipettes filled with 2 M potassium acetate (50–90 M Ω) format the vicinity of the DTX injection site. Recordings were obtained from cortical neurons ($n = 33$ from 19 rats) located in the M1 layer 5 at depths ranging from 950 to 2200 μ m below the cortical surface.^{1,2} Current-clamp recordings were amplified with an Axoclamp 900A amplifier (Molecular Devices) operating in bridge mode, bandpass filtered between *DC* and 30 kHz, and digitized at 30 kHz. Recorded cortical neurons were identified on-line as pyramidal cells on the basis of their distinctive intrinsic firing patterns in response to direct stimulations,³ and off-line by their morphological features (Fig. 3A). Extracellular *DC* potentials were obtained immediately after the loss of intracellular recordings with the same microelectrodes (Fig. 3B). Intracellularly recorded neurons were filled with neurobiotin (1% added to the pipette solution; Vector Laboratories) through repeated injection of depolarizing current pulses (0.5–1 nA; 100–200 ms) applied at 1–2 Hz during the last 10–15 min of the recording sessions.⁴

At the end of experiments, rats were euthanized with euthasol and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were removed and cut in coronal sections for histological processing. For LFP experiments, brain sections were stained

with cresyl violet to localize injector and silicon probe tracks. The morphology of neurobiotin-filled neurons was revealed as previously described.⁴ All recovered neurons were located in layer 5 of M1L and possessed the typical morphological features of deep-layer pyramidal neurons.²⁻⁴

Signal analysis

Analysis was performed with a combination of Fieldtrip (release 20200919)⁵ and custom-developed scripts in MATLAB (The Mathworks Inc., version R2019b). Custom analysis scripts can be found at <https://github.com/Paul-Baudin/EpiCode/tree/master/projects/dtx>. Intracellular signals were analyzed with Spike2 software (Cambridge Electronic Design, version 9.08b).

EEG and EMG signals. EEG signals were first low-pass filtered at 70 Hz and EMG records were high-pass filtered at 10 Hz. The regularity of TDW occurrence was calculated with the CV2 method⁶: here $CV2 = (2|\Delta t_{i+1} - \Delta t_i|) / (\Delta t_{i+1} + \Delta t_i)$, and $\Delta t_i = t_i - t_{i-1}$ is the inter-TDW-interval. TDW half-width was the duration of TDW at half-amplitude. Analysis of rodent data was restricted to the first 10 hours following DTX injection. Artefactual trials were discarded for the morphological analysis. The start and end of the tonic-dystonic muscular contraction was defined as the first (and last) event crossing a threshold set at 3 times the SD of the baseline rectified EMG signal.

LFP and MUA records. For spike detection, the raw wide-band signal was filtered (> 300 Hz) and negative deflections > 6 median absolute deviations of the filtered trace were considered as spikes. A combination of density-based clustering and template matching algorithms were used to automatically cluster the detected spikes.⁷ Clusters were evaluated as to whether they reflected putative single-unit (SU) or multi-unit (MU) activities, based on the ISI distribution, the percentage of refractory period violation (RPV = ISI < 2 ms) and the spike waveform profile. Analysis was restricted to putative SUs located in layer 5. Spike activity of selected units was time-aligned to the peak of each TDW and trials were averaged to construct peri-stimulus time histograms (PSTHs) and spike density plots. Units were classified according to their firing rate change in a time period starting 200 ms before and ending 2 s after the TDW peak. Non-parametric cluster-based permutation tests⁸ were used to determine significant changes relative to the baseline, taken as the -2 to -1 s period preceding the TDW peak. SUs showing a significant increase in firing rate during more than 95% of the defined period were classified as 'prolonged increase'. SUs with a significant increased

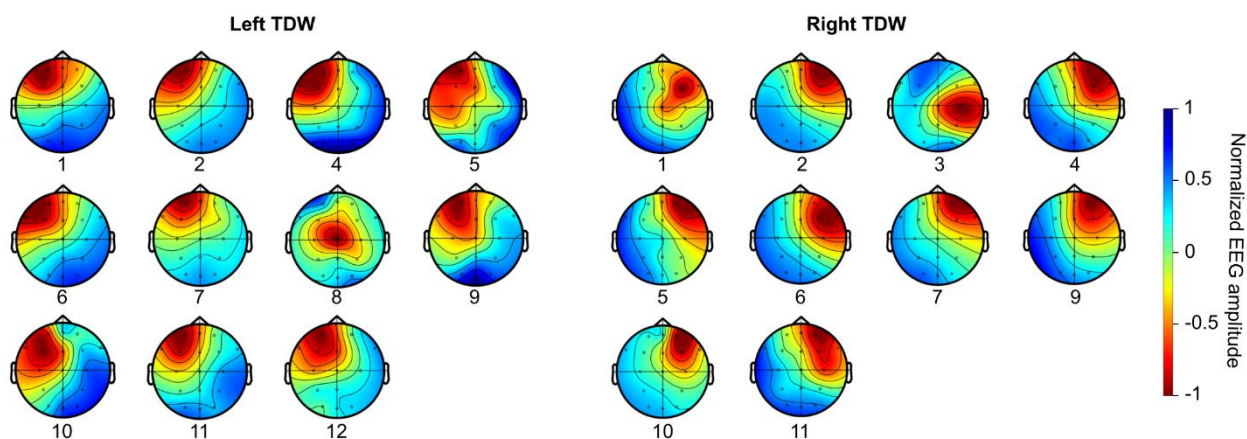
firing rate during less than 80% of the TDW were classified as 'transient increase'. None of the recorded units exhibited an enhanced discharge for more than 80%, and less than 95%, of the TDW period. SUs with no significant increase (or decrease) in firing were classified as 'no change/decrease'. During interictal periods, action potential (AP) frequency was computed every second and inter-seizure duration was normalized to allow averaging of the different epochs. Pearson correlations between firing rate and time were performed to assess significant changes over interictal periods.

Intracellular records. Average membrane potential (V_m) of cortical neurons was calculated as the mean of the distribution of spontaneous subthreshold neuronal activity and the magnitude of V_m fluctuations was quantified as the SD of the distribution (SD V_m). V_m and SD V_m values, mean spontaneous firing rate and firing regularity (estimated with the CV2 method) were extracted from recordings of at least 1 min. Voltage threshold of APs was defined as the V_m at which the dV_m/dt first exceeded $10 \text{ mV}\cdot\text{ms}^{-1}$.⁹

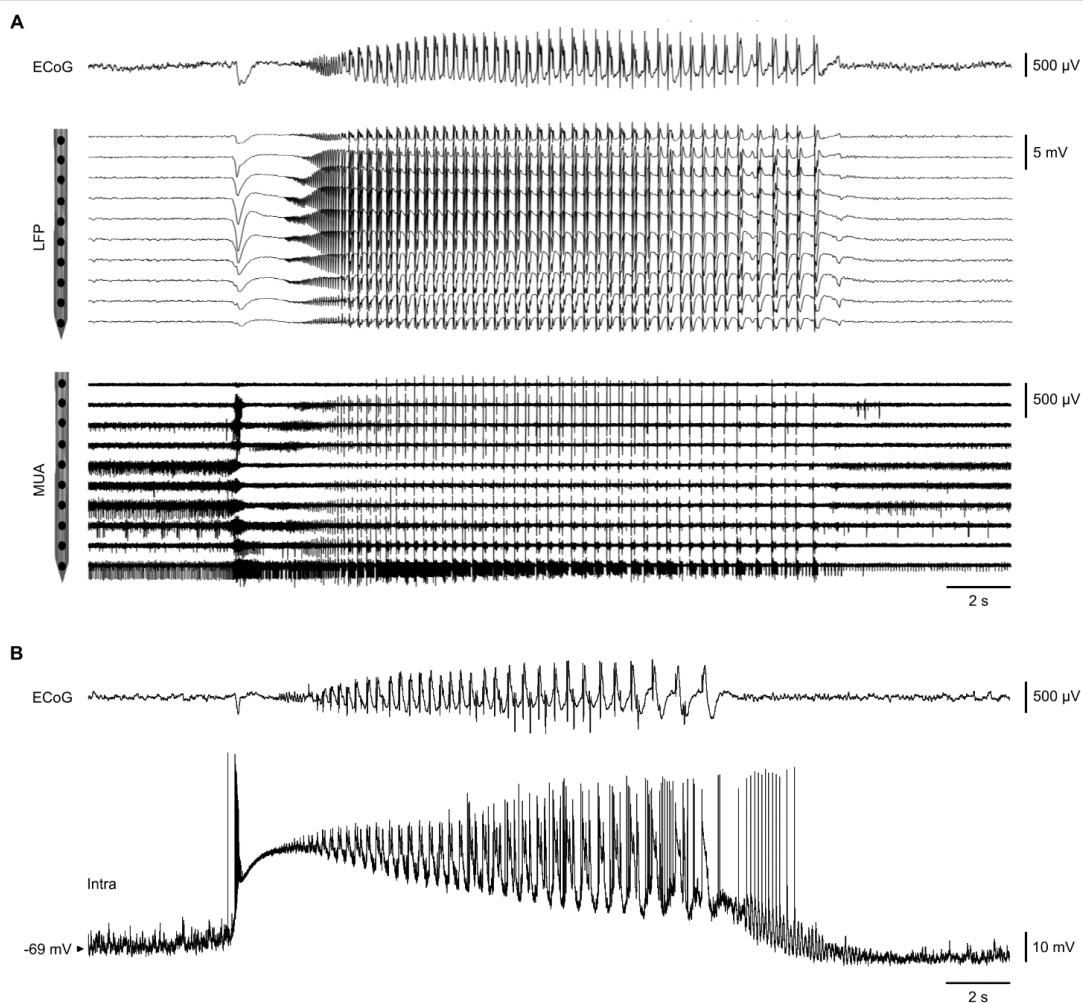
Voltage–current (V – I) relationships were constructed from the mean V_m drops (ΔV_m) evoked by hyperpolarizing current pulses of varying intensity (-0.2 to -1 nA ; 100 ms duration; every 0.5 s ; $n > 10$ trials per intensity). ΔV_m was measured at the peak of the hyperpolarizing voltage deflection, immediately after the end of the membrane capacitance charge, to avoid interference with a possible hyperpolarization-activated depolarizing sag potential.¹⁰ Once the linearity of the V – I relations was attested, R_m was calculated as the slope of the corresponding linear fit (Fig. 5A, dashed lines).⁴ To assess dynamical changes of the integrative properties of cortical neurons during TDWs, we applied brief repeated hyperpolarizing (-0.6 nA , 20 ms duration, every 100 ms) current pulses and measured the corresponding mean ΔV_m (Fig. 3C). The membrane time constant (τ_m) was derived from an exponential decay fit applied to the initial phase of the mean hyperpolarization evoked by current pulses of -0.2 – -0.4 nA . Neuronal transfer function, which describes the cell output firing frequency as a function of injected depolarizing current pulses of increasing intensity (F – I relationship, 0.1 – 2 nA , 200 ms pulses at 1 Hz ; $n > 10$ trials per intensity), was quantified in DTX and control conditions. Linear regression of F – I curves yielded the threshold current for AP generation (I_{th} ; x-intercept) and the neuronal gain (γ ; slope).^{6,9,11} Latency and temporal precision of the first evoked AP was measured on current pulses inducing a similar firing frequency (20 – 40 Hz) in control and DTX neurons (Fig. 5C).

Dynamic changes of V_m , SD V_m and frequency content of subthreshold intracellular activity during the inter-seizure epochs were assessed over successive periods of 30 seconds and expressed as function of baseline values (defined as the first 30 seconds of the interictal period). Time was normalized to permit averaging across neuronal population. Time-frequency maps were constructed using a multitaper decomposition analysis with a sliding time window of 1 second,⁵ after removing of APs which were replaced by a piecewise cubic hermite polynomial interpolation. Pearson correlations were performed to assess significant changes over interictal periods.

Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. Unilateral fronto-central topography of TDW in anti-LGI1 encephalitis patients. EEG signals were recorded with 21 scalp electrodes placed according to the 10-20 system. Signals were averaged from 100 ms before to 100 ms after the TDW peak and normalized. 9 out of 12 patients presented both right and left TDW.



Supplementary Figure 2. Multi-scale neuronal correlates of seizure activity in DTX rats. (A) Coupled recordings in a sufentanil-sedated DTX rat of ECoG (top trace) and LFP activities at various depths within M1 (lower traces) using a 16-channel silicon probe. A typical seizure is depicted, consisting in a TDW shortly followed by fast oscillations and spikes-polyspikes activity whose internal frequency progressively decreased with time. The extraction of MUA by filtering (300–6000Hz) of LFP waveforms revealed rhythmic discharges of M1 neurons in phase with the spikes-polyspikes activity. (B) Coupled recordings of ECoG (top trace) and intracellular activity of a M1 pyramidal neuron (bottom trace) during a typical seizure in a sufentanil-sedated DTX rat. Note the membrane depolarization associated with TDW and the rhythmic AP discharge during the core of the tonic-clonic seizure.

Supplementary Tables

Demographic characteristics	
Age at onset, mean \pm SD, min.-max., years	62.6 \pm 16.8, 21-81
Female, Nb. (%)	4 (33.3)
Epileptic seizures	
Tonic-dystonic seizures, Nb. (%)	12 (100)
Unilateral, Nb. (%)	3 (25)
Bilateral, Nb. (%)	9 (75)
Mesial temporal lobe seizures, Nb. (%)	5 (41.7)
Focal to bilateral tonic-clonic seizures, Nb. (%)	3 (25)
Other symptoms	
Psychiatric symptoms, Nb. (%)	6 (50)
Cognitive impairment, Nb. (%)	7 (58.3)
Vigilance impairment, Nb. (%)	1 (8.3)
Dysautonomia, Nb. (%)	0
Laboratory investigations	
Hyponatremia related to SIADH, Nb. (%)	5 (41.7)
CSF pleocytosis (> 5 WBC/mm ³), Nb. (%)	2 (16.7)
Elevated CSF protein (> 0.45 g/L), Nb. (%)	6 (50)
Intrathecal IgG synthesis, Nb. (%)	1 (8.3)
Positive anti-LGI1 antibodies	12 (100)
In serum only, Nb. (%)	5 (41.7)
In CSF only, Nb. (%)	3 (25)
In both, Nb. (%)	4 (33.3)
Brain MRI	
T2w-FLAIR hyperintensities, Nb. (%)	6 (50)
Mesial temporal lobe, Nb. (%)	6 (50)
Unilateral, Nb. (%)	5 (41.7)
Bilateral, Nb. (%)	1 (8.3)
Other locations, Nb. (%)	0
Antiepileptic drugs	
Maximum number of antiepileptic drugs, mean \pm SD, min.-max.	1.8 \pm 1.2, 0-5
Immunomodulatory and immunosuppressive drugs	
Intravenous immunoglobulin, Nb. (%)	10 (83.3)
Corticosteroids, Nb. (%)	10 (83.3)
Second-line therapy (rituximab or cyclophosphamide), Nb. (%)	0
Preventive maintenance treatment (mycophenolate mofetil or azathioprine), Nb. (%)	2 (16.7)
Evolution	
Complete remission, Nb. (%)	12 (100)
Relapse, Nb. (%)	1 (8.3)
Hospitalization in ICU, Nb. (%)	2 (16.7)
Death, Nb. (%)	0
Hippocampal sclerosis, Nb. (%)	3 (25)
Paraneoplastic syndrome	
Associated neoplasia, Nb. (%)	0
Thymic hyperplasia, Nb. (%)	0

Supplementary Table 1. Main clinical and biological data, therapeutics and outcome of anti-LGI1 encephalitis patients. CSF: cerebrospinal fluid, SIADH: syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion, ICU: intensive care unit.

	Transient increase (n = 7)	Prolonged increase (n = 1)	Silent (n = 4)
Recording depth (μm)	1426 \pm 291	1593	1678 \pm 441
Firing pattern (RS/IB)	6 RS, 1 IB	RS	2 RS, 2 IB
Resting V_m (mV)	-72.7 \pm 4.1	-71.6	-70.6 \pm 4.8
Input resistance (M Ω)	19.4 \pm 5.3	<i>Not measured</i>	19.8 \pm 5.5
Mean firing rate (Hz)	2.2 \pm 4.9	0.54	0.88 \pm 0.80
AP threshold (mV)	-60.9 \pm 2.0	-62.1	-57.1 \pm 2.6
Current threshold (nA)	0.31 \pm 0.12	<i>Not measured</i>	0.37 \pm 0.13
<i>F-I</i> slope (Hz.nA ⁻¹)	65.1 \pm 20.8	<i>Not measured</i>	79.6 \pm 13.5

Supplementary Table 2. Recording depth and electrical membrane properties of the different groups of intracellularly recorded neurons. Values are mean \pm SD. RS, regular spiking; IB, intrinsic bursting; *F-I*, frequency-current. No significant difference was found between the different groups and parameters ($P \geq 0.3$, two-tailed Mann Whitney rank-sum test).

Supplementary Movies

Supplementary Movie 1. Examples of TDS in patients.

Supplementary Movie 2. Examples of TDS induced in a rat after focal injection of DTX into M1.

Supplementary Movie 3. The TDS is followed by a tonic-clonic seizure in DTX rats.

Supplementary references

1. Paxinos G, Watson CR. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Acad Press*. Published online 1986.
2. Wilent WB, Contreras D. Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2004;24(16):3985-3998. doi:10.1523/JNEUROSCI.5782-03.2004
3. Steriade M. Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(2):121-134. doi:10.1038/nrn1325
4. Williams MS, Altwegg-Boussac T, Chavez M, Lecas S, Mahon S, Charpier S. Integrative properties and transfer function of cortical neurons initiating absence seizures in a rat genetic model: Epileptic seizures and information processing. *J Physiol*. 2016;594(22):6733-6751. doi:10.1113/JP272162
5. Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen J-M. FieldTrip: Open Source Software for Advanced Analysis of MEG, EEG, and Invasive Electrophysiological Data. *Comput Intell Neurosci*. 2011;2011:1-9. doi:10.1155/2011/156869
6. Altwegg-Boussac T, Chavez M, Mahon S, Charpier S. Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J Physiol*. 2014;592(16):3577-3595. doi:10.1113/jphysiol.2013.270561
7. Yger P, Spampinato GL, Esposito E, et al. A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with ground truth recordings in vitro and in vivo. *Elife*. 2018;7:e34518.
8. Maris E, Oostenveld R. Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neurosci Methods*. 2007;164(1):177-190. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.03.024
9. Mahon S, Charpier S. Bidirectional Plasticity of Intrinsic Excitability Controls Sensory Inputs Efficiency in Layer 5 Barrel Cortex Neurons in Vivo. *J Neurosci*. 2012;32(33):11377-11389. doi:10.1523/JNEUROSCI.0415-12.2012

10. Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:299-327. doi:10.1146/annurev.ph.58.030196.001503
11. Altwegg-Boussac T, Schramm AE, Ballestero J, et al. Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain J*

III. DISCUSSION

CHAPITRE 7

TRANSFERT PASSIF *IN VIVO* D'AUTO-ANTICORPS HUMAINS

Plusieurs études ont montré un rôle pathogène direct des anticorps anti-LGI1, *via* une altération de l'expression et de la fonction des canaux Kv1 et des AMPA-R (Ohkawa et al. 2013; Petit-Pedrol et al. 2018; Kornau et al. 2020; Ramberger et al. 2020). Toutefois, le lien entre ces perturbations et les crises d'épilepsie n'a jamais été démontré. Mon objectif a été de déterminer si les auto-anticorps anti-LGI1 étaient responsables des crises d'épilepsie chez les patients.

Pour cela, j'ai étudié l'effet de l'injection d'auto-anticorps dirigés contre la protéine LGI1 sur l'activité cérébrale de rat ou de souris *in vivo*, en utilisant deux protocoles: l'un aigu et l'autre chronique. Pour le protocole d'injection aiguë, j'ai ciblé l'hippocampe et le cortex moteur primaire (M1), qui sont les deux principales régions ciblées dans l'EAI à anticorps anti-LGI1 (Navarro et al. 2016). Ces expériences ont montré que l'injection de LCR ou d'IgG purifiées à partir de sérum de patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 dans l'hippocampe ou dans M1, chez 26 rats, n'a pas induit d'anomalies épileptiques. Des résultats similaires ont été observés lors du protocole d'injection chronique dans l'hippocampe. Malgré une bonne diffusion des IgG humaines de patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1, aucune anomalie épileptique n'a pu être observée, chez 14 souris et chez 6 rats, lors d'une injection chronique de 14 jours et d'un suivi des animaux pendant un mois à l'EEG-vidéo.

Je discute dans les paragraphes suivants de l'implication que peuvent avoir nos résultats sur la compréhension de la maladie, en nuancant avec les limites de notre approche méthodologique.

7.1 Un modèle animal avec phénotype atténué par rapport aux patients

Depuis le début de ma thèse, deux équipes ont réalisé des injections d'anticorps anti-LGI1 *in vivo*, et ont enregistré leurs conséquences 7 jours après une injection hippocampique (Ramberger et al. 2020), ou après 14 jours d'infusion chronique dans les ventricules cérébraux (Petit-Pedrol et al. 2018). Bien que ces procédures expérimentales aient diminué l'expression de Kv1.1 et des AMPA-R, et aient augmenté l'excitabilité des neurones de l'hippocampe, elles n'ont pas permis l'émergence de crises, qui sont pourtant le principal symptôme des patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1. Chez les souris LGI1^{-/-} qui présentent des crises généralisées fréquentes, la densité des Kv1.1 est diminuée de plus de 50 % par rapport aux souris contrôles (Seagar et al. 2017). Comme les symptômes des EAI à anticorps anti-LGI1 évoluent pendant plusieurs semaines à plusieurs mois avant d'atteindre un phénotype sévère, il est probable que la diminution de 10 à 15 % de l'expression de Kv1.1 après deux semaines d'infusion n'ait pas été suffisante pour déclencher des crises (Fig. 21) (Petit-Pedrol et al. 2018).

Des modifications comportementales ont été observées après 14 jours d'injection chronique (Planagumà et al. 2015; Taraschenko et al. 2019), ou 6 jours après une injection aiguë (Würdemann et al. 2016) d'anticorps de patients atteints d'EAI à anti-NMDA-R dans l'hippocampe de souris *in vivo*. Comme pour les injections chroniques d'anticorps anti-LGI1, les injections d'anticorps anti-NMDA-R entraînaient un phénotype atténué par rapport aux patients. Les patients atteints d'EAI à anticorps anti-NMDA-R présentent généralement une progression rapide des manifestations neuro-psychiatriques pouvant conduire au coma en quelques jours ou semaines (Dalmau et al. 2017). Les souris, après injection d'anticorps anti-NMDA-R de patients présentaient des troubles de mémoire significatifs. Cependant, les tests d'anxiété et de locomotion n'ont pas montré de différence (Planagumà et al. 2015), et aucune souris n'est morte spontanément (Planagumà et al. 2015; Würdemann et al. 2016; Taraschenko et al. 2019). De plus, elles ne présentaient pas de crise (Planagumà et al. 2015; Würdemann et al. 2016), ou bien des crises non convulsives (Taraschenko et al. 2019).

Ainsi, la méthode de transfert passif d'anticorps, cruciale pour démontrer la pathogénicité des auto-anticorps, ne semble pas adaptée pour reproduire le phénotype épileptique des patients. Dans ce contexte, nos résultats, rapportant l'absence de déclenchement de crises lors d'injections d'anticorps anti-LGI1 de manière aiguë ou chronique, paraissent cohérents avec la littérature récente.

Il est possible que suite à nos injections, des anomalies locales d'activités neuronales aient été induites, mais qui n'étaient pas suffisantes pour induire des crises. Lors des expériences d'injection aiguë, l'électrode multi-canaux que j'ai utilisée enregistrait, en plus de l'activité LFP, des potentiels d'action extracellulaires. L'analyse de ces signaux est prévue, afin de tester l'hypothèse d'une modification locale d'activité. En particulier, il serait intéressant de comparer l'activité de chaque neurone enregistré avant et après l'injection des anticorps, notamment leur fréquence de décharge et leur régularité. De plus, nous chercherons des modifications dans la synchronie du réseau enregistré par les différentes électrodes.

7.2 Méthodes d'injection et diffusion des IgG

Une incubation d'anticorps anti-LGI1 de patients sur des cultures organotypiques d'hippocampe pendant 3 jours permet de diminuer de plus de 50% la quantité de la sous-unité GluA1 des AMPA-R exprimés à la synapse (Ohkawa et al. 2013). En comparaison, après 14 jours d'injection *in vivo*, GluA1 n'est diminuée que de 10% par rapport aux contrôles (Petit-Pedrol et al. 2018). Cela pourrait s'expliquer par la diffusion lente des anticorps dans le cerveau, qui réduit fortement l'accès des auto-anticorps à leurs cibles antigéniques, à la différence de cultures de neurones isolés ou de tranches de cerveau où les anticorps contenus dans la solution dans laquelle baigne le tissu peuvent accéder directement à une large surface neuronale.

Des techniques d'imagerie en temps réel ont permis de mesurer les propriétés de diffusion d'IgG non spécifiques marquées par fluorescence, après injection dans l'agarose ou dans le cortex de rats adultes *in vivo* (Wolak et al. 2015). Les auteurs ont montré que la diffusion des IgG est environ 10 fois plus importante dans l'agarose que dans le cerveau. Ils ont calculé que les anticorps diffusent dans le cerveau avec une constante de diffusion de 6.10^{-8} cm²/s, soit 1 mm² en 41 heures. Cette diffusion lente pourrait s'expliquer par des propriétés du microenvironnement cérébral, mais également par des facteurs spécifiques des IgG, tels que leur taille et leur forme, ou leur charge électrique. De plus, la liaison non spécifique des IgG avec des composants du cerveau, notamment *via* leur fraction Fc, pourrait ralentir ou stopper la diffusion (Wolak et al. 2015). Une liaison spécifique, en particulier dans le cas des auto-anticorps, pourrait également ralentir la diffusion.

Par conséquent, l'approche par injection aiguë suivie d'un enregistrement de 5 à 10h ne semble pas suffisante pour étudier l'effet des auto-anticorps sur les activités neuronales, (1) car cette durée ne semble pas permettre aux anticorps d'atteindre une quantité suffisamment importante d'auto-antigènes, (2) et car l'effet d'une injection chronique d'anticorps anti-LGI1 n'affecte la quantité de Kv1.1 de manière significative qu'après plusieurs jours d'injection chronique (Fig. 21) (Petit-Pedrol et al. 2018).

Les effets relativement faibles de l'injection chronique de 14 jours sur la diminution de Kv1.1 et des AMPA-R pourraient dépendre d'une injection trop courte. En effet, plus l'injection était courte et plus la diminution était faible (Fig. 21) (Petit-Pedrol et al. 2018). La diminution à 14 jours, correspondant à la durée maximale d'injection dans cette étude, ne serait donc pas maximale, et pourrait être augmentée par des injections plus longues. Cependant, une infusion plus longue pose le problème de la stabilité des anticorps, laissés à presque 37°C dans une pompe sous cutanée, et dont la demi-vie est d'environ 15 à 30 jours (Mankarious et al. 1988). L'utilisation d'une pompe rechargeable pourrait permettre de renouveler la solution d'anticorps et d'éviter que les anticorps ne restent trop longtemps à température ambiante (Tan et al. 2011). Une alternative pourrait être l'immunisation des animaux contre la protéine LGI1, afin qu'ils produisent eux-mêmes des auto-anticorps. Une ouverture active de la BHE serait nécessaire pour permettre aux anticorps d'accéder au SNC, comme ce qui a été fait dans des modèles d'encéphalomyélite allergique expérimentale (Reboldi et al. 2009) ou de chorée de Sydenham (Platt et al. 2017). Une immunisation contre les NMDA-R a été rapportée chez des souris génétiquement modifiées présentant des altérations de la BHE (Pan et al. 2019). Cependant, cette étude ne permet pas de répondre aux questions que nous soulevons ici, car les auteurs n'ont pas étudié l'expression neuronale des NMDA-R, ni recherché la présence de crises, et les tests comportementaux n'ont pas été faits de manière comparative au cours du temps.

CHAPITRE 8

PHYSIOPATHOLOGIE DES TDS

L'incapacité à induire des crises lors de nos injections d'auto-anticorps anti-LGI1 *in vivo*, ainsi que les avancées importantes de la littérature sur les fonctions des auto-anticorps présentés dans la partie précédente, nous ont conduits à trouver une stratégie alternative pour modéliser l'inhibition de LGI1 sans recourir à l'utilisation d'auto-anticorps. Notre stratégie expérimentale a consisté à cibler des mécanismes physiopathologiques en aval de LGI1, en inhibant directement les canaux Kv1, qui sont exprimés à la fois dans les compartiments cellulaires somatodendritiques et axonaux (Ovsepian et al. 2016), et dont la fonction est altérée par les anticorps anti-LGI1 (Petit-Pedrol et al. 2018; Kornau et al. 2020; Ramberger et al. 2020). Nous avons discuté ci-dessus que les anticorps n'induisent probablement pas une inhibition suffisante de Kv1 pour déclencher des crises. De plus, chez les souris LGI1^{-/-}, des anomalies du développement cérébral viennent s'ajouter à l'altération des Kv1, ce qui nous éloigne de la physiopathologie des EAI, où, avant de développer une auto-immunité, les patients présentent un cerveau sain. Pour produire une inhibition aiguë de Kv1, dans un cerveau sain, et de manière plus accentuée que par les anticorps anti-LGI1, nous avons injecté de la dendrotoxine-K, un inhibiteur spécifique de Kv1.1 (Wang et al. 1999; Harvey et Robertson 2004). Nous avons ciblé le cortex M1, car c'est la région supposément initiatrice des TDS chez les patients (Navarro et al. 2016).

8.1 Un nouveau modèle *in vivo* de TDS

Nous avons montré que l'injection de DTX dans le cortex moteur de rats adultes reproduit fidèlement les TDS observées chez les patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1. Pour cela, nous avons réalisé, pour la première fois, une description électrophysiologique détaillée des TDS, en caractérisant la contraction tonique-dystonique et l'onde lente qui la précédait, dans une cohorte de 12 patients. Cela a permis de mesurer de manière systématique la morphologie de la contraction musculaire, de l'onde lente, ainsi que leur corrélation temporelle, sur un total de 365 TDS. Nous avons montré un profil EEG et EMG typique des TDS, fortement reproductible entre les patients. L'onde lente précède systématiquement la contraction tonique-dystonique, nous l'avons donc appelée «onde tonique-dystonique» («*Tonic-dystonic wave*», TDW). Les TDW et les activités EMG paroxystiques sont fortement associées chez chaque patient, ce qui suggère un lien de causalité entre l'événement cortical et les symptômes moteurs de la crise.

La comparaison des caractéristiques électrocliniques des crises induites par la DTX chez les rongeurs avec celles enregistrées dans la cohorte de patients a révélé de fortes similitudes. La sémiologie tonique-dystonique, typique des TDS, était retrouvée chez le rat, et ces contractions étaient précédées de manière systématique par une onde lente corticale de grande amplitude. Ainsi, cette onde EEG stéréotypée précédant la contraction tonique-dystonique a aussi pu être dénommée TDW, par analogie avec la pathologie humaine.

Une autre caractéristique des TDS concerne leur fréquence de survenue et leur régularité. Les TDS des patients surviennent, à un stade avancé de la maladie, plusieurs dizaines de fois par heures, correspondant à plusieurs centaines de crises par jour. De plus, ces crises se produisent de manière régulière, homogène sur l'ensemble des enregistrements de chaque patient, et non pas par cluster comme cela peut être observé dans d'autres maladies. Dans notre cohorte, la fréquence moyenne était de 13 TDS par heure, avec un maximum de 30 TDS par heure. Chez les rats, nous observé en moyenne 27 crises par heure, avant la décroissance spontanée de fréquence au bout d'une dizaine d'heures, probablement lorsque la DTX n'exerce plus d'effet. Les crises chez l'animal survenaient, comme les crises humaines, de manière régulière.

Toutefois, à la différence des patients, les TDS du modèle animal se poursuivent systématiquement par une crise tonico-clonique. Un tel phénomène existe aussi chez les

patients, bien que concernant une minorité de crises. En effet, des crises focales temporales ou frontale, ou des crises généralisées tonico-cloniques, survenant juste après une TDS, ont déjà été rapportées dans la littérature chez les patients (Irani et al. 2011; Navarro et al. 2016; Wennberg et al. 2018; Liu et al. 2020). Cependant, elles n'étaient présentes que chez 6 à 50% des patients, et au sein de ces patients elles ne comptaient que pour peu de crises. Dans notre cohorte de 12 patients, nous avons enregistré des crises focales temporales ou frontales juste après une TDS, uniquement chez deux patients, à une seule reprise (Fig. 28). Néanmoins à l'interrogatoire de ces patients, des événements similaires étaient rapportés plusieurs fois par semaine. Cette évaluation est approximative et ne permet pas de conclure sur la fréquence de ces événements. Les enregistrements EEG-vidéo de 1 à 4 h, comme bénéficient les patients ayant une EAI, ne sont pas suffisamment longs pour identifier ces crises de manière systématique chez les patients. Nous ne pouvons pas conclure formellement sur un lien de causalité entre les TDS chez les patients, et les crises qui les suivent occasionnellement. Il pourrait s'agir de deux crises indépendantes survenant par hasard l'une après l'autre. Toutefois, un lien de causalité n'est pas à exclure : la crise motrice pourrait se propager au-delà de la région initiant la TDW, et favoriser des crises frontales classiques prolongées (environ 10-30 s). La survenue d'une crise temporale, faisant suite à une TDS, est plus compliquée à comprendre, compte tenu de l'apparente distance séparant la région centrale, siège de la TDS, et le lobe temporal. Il pourrait s'agir d'une propagation classique par le bais du cortex, ou d'un mécanisme plus complexe impliquant les ganglions de la base.

La présence de crises toniques-cloniques chez le rongeur pourrait provenir d'une inhibition de Kv1.1 qui serait éventuellement plus importante avec la DTX que chez les patients atteints d'EAI à anti-LGII1. La mise en place progressive de l'EAI à anti-LGII1, sur plusieurs semaines voire plusieurs mois, pourrait aussi aboutir à des mécanismes compensateurs empêchant la survenue de crise après la TDS, ce qui ne serait pas le cas lors de l'injection aiguë de DTX. De plus, cette différence d'expression des crises entre les patients et notre modèle animal pourrait s'expliquer par des différences dans les réseaux du cortex M1 entre ces deux espèces. Ces hypothèses sont pour le moment spéculatives, et une étude sur ces questions serait très utile pour approfondir les connaissances physiopathologiques sur les TDS.

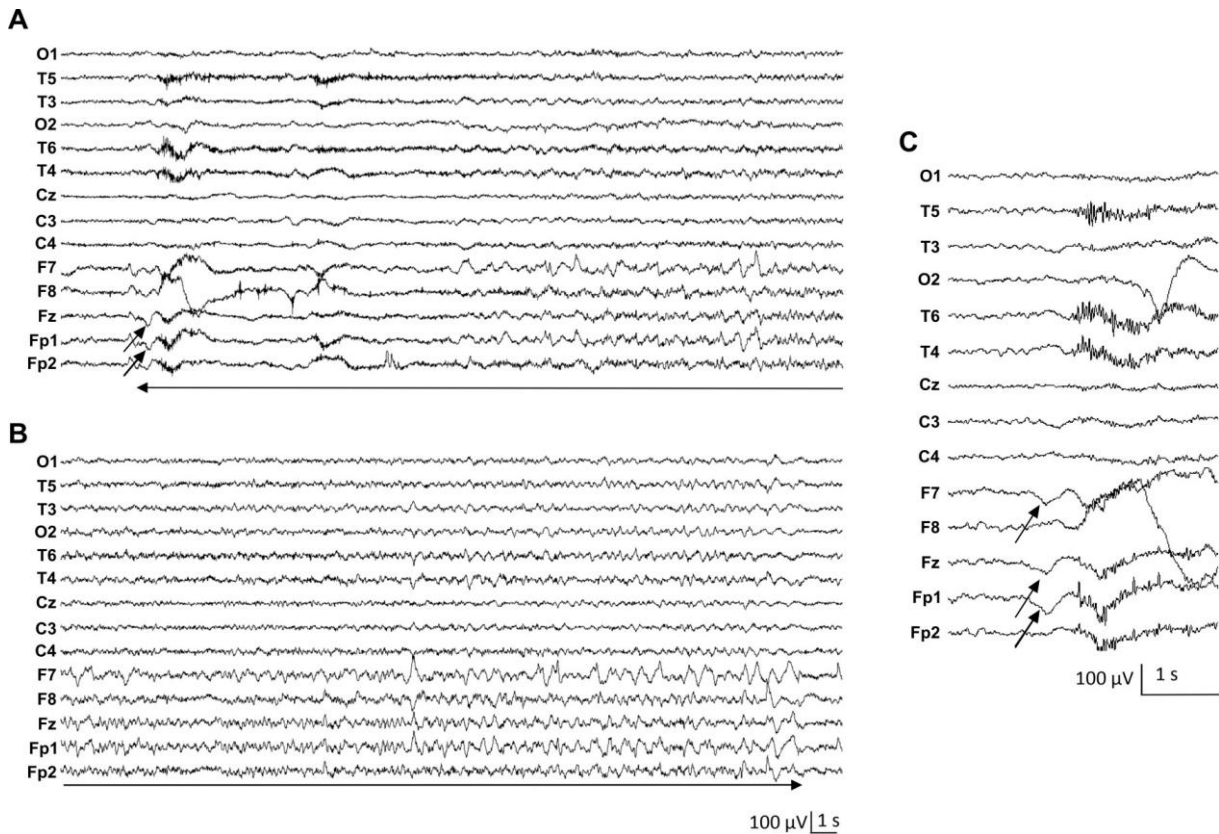


Figure 28. Crise tonique-dystonique suivie d'une crise focale fronto-temporale. (A-B) Tracés EEG d'un patient montrant une TDS, suivie d'une crise focale. L'ensemble commence par une TDW (flèches sur les électrodes frontales gauches en A). La TDW est suivie des artefacts de contraction musculaires visibles sur l'EEG, correspondant à une contraction tonique-dystonique. Puis une activité rythmique émerge, organisée dans les lobes fronto-temporaux, majoritairement sur l'hémisphère gauche. Pendant cette crise, le patient a perdu connaissance. **(C)** Exemple d'une TDS chez le même patient, montrant la TDW (flèches sur les électrodes frontales gauches), suivi des artefacts sur l'EEG causés par la contraction musculaire tonique-dystonique. L'EEG est représenté avec une référence moyenne, avec les valeurs négatives vers le bas.

8.2 Rôle de l'inhibition de Kv1.1 dans la genèse des TDS

Dans notre étude, nous avons inhibé spécifiquement la sous-unité Kv1.1 avec la dendrotoxine-K (DTX), dont la spécificité a été démontrée par différentes études de coimmunoprécipitation (Wang et al. 1999; Harvey et Robertson 2004). Nous avons ainsi montré que, au sein des canaux Kv1, le fait de cibler la sous-unité Kv1.1 était suffisant pour induire des crises.

Les canaux Kv1 médient un courant K^+ qui s'active à des potentiels membranaires proches du seuil de déclenchement des potentiels d'action (Guan et al. 2006) et qui diminue l'excitabilité en limitant et en retardant la décharge neuronale (Guan et al. 2007; Cudmore et al. 2010). Dans nos travaux, nous avons constaté que l'excitabilité intrinsèque des neurones

pyramidaux du cortex M1, était augmentée après injection de DTX. Cela s'est traduit par une augmentation de la résistance membranaire et une réduction des seuils de courant et de voltage pour le déclenchement des potentiels d'action, entraînant une facilitation de leur décharge spontanée et évoquée. Des effets similaires de la DTX sur l'excitabilité neuronale, attribués à une action inhibitrice directe sur les canaux Kv1 *via* la sous-unité Kv1.1 (Guan et al. 2007; Higgs et Spain 2011; Li et al. 2012), ont déjà été rapportés *in vitro* dans les neurones pyramidaux (Bekkers et Delaney 2001; Guan et al. 2007; Cudmore et al. 2010; Higgs et Spain 2011) et dans les interneurons GABAergiques néocorticaux (Goldberg et al. 2008; Li et al. 2012). L'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux après l'injection de DTX s'accompagnait d'une latence plus courte et d'une variabilité plus faible de leur décharge de potentiels d'action induite par des courants dépolarisants, ainsi que d'une augmentation de la régularité de leur décharge spontanée, comme cela a déjà été observé *in vitro* (Cudmore et al. 2010; Higgs et Spain 2011). Ces modifications de propriétés membranaires induites par la DTX dans les neurones du site d'injection sont susceptibles d'être responsables de modifications dynamiques au sein du réseau M1, qui favorisent l'émergence d'activités synchronisées paroxystiques.

Les canaux Kv1 sont des homo- ou des hétéro-tétramères, issus de l'assemblage de quatre sous-unités. Il existe huit sous-unités (Kv1.1-Kv1.8). Les combinaisons d'assemblage entre les différentes sous-unités influencent l'expression de Kv1, et les propriétés du courant potassique qu'il génère. Les différents assemblages sont régulés, et certaines associations sont plus fréquentes que d'autres. Notamment, aucun homo-tétramère de Kv1.1 n'a été retrouvé dans le SNC (Ovsepian et al. 2016), et, l'expression de Kv1.1 dans le cerveau est quasiment identique à celle de Kv1.2 et Kv1.4 (Ovsepian et al. 2016). Ainsi, les conséquences de l'inhibition de Kv1.1 ne sont en fait probablement pas attribuables à Kv1.1 seul, mais impliqueraient des perturbations des hétéro-tétramères Kv1 auxquels il contribue, associé à d'autres sous-unités. Ainsi, l'effet observé dans notre étude pourrait ne pas être spécifique du blocage de Kv1.1, et être similaire après un blocage d'autres sous-unités des canaux Kv1. Cette hypothèse pourrait être étudiée *in vivo* par des injections d'inhibiteurs spécifiques d'autres sous-unités, tels que l'agitoxine, une toxine spécifique des sous-unités Kv1.3 (Garcia et al. 1994), afin de voir si cette toxine permet elle aussi de déclencher des TDS quand elle est injectée dans le cortex M1 de cerveau mature de rat.

8.3 Fréquence élevée et régularité des TDS

Une des caractéristiques des TDS chez les patients est leur survenue très fréquente, et leur régularité. Ces particularités ont été retrouvées dans le modèle de TDS induites par la DTX. Dans les formes les plus avancées d'EAI à anticorps anti-LGI1, on compte plusieurs dizaines de TDS par heure, ce qui était le cas aussi des rats après injection de DTX. En effectuant des enregistrements extracellulaires et intracellulaires des neurones M1 dans ce nouveau modèle de TDS, nous avons décrit des mécanismes cellulaires et de réseau, qui pourraient être responsables de la récurrence typique des TDS. Nous proposons le scénario suivant pour expliquer la récurrence cyclique des crises (Fig. 29) :

1. Nous avons observé dans la plupart des cellules pyramidales une hyperpolarisation du potentiel de membrane (V_m) immédiatement après les crises, malgré l'absence de changement dans les valeurs moyennes de V_m intercritiques par rapport aux neurones contrôles. Cette hyperpolarisation neuronale après la fin de la crise résulte probablement de l'activation de la conductance K^+ dépendante du Ca^{2+} , provoquée par une décharge neuronale intense et une augmentation consécutive de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} au cours de la crise (Fig. 29, période 1). Ce mécanisme a été proposé précédemment dans les périodes de dépression post-crise, dans d'autres types de crises d'épilepsie (Timofeev et al. 2004).
2. Les neurones se dépolarisent ensuite de manière progressive, pendant toute la période intercritique, provoquant une augmentation progressive de leur fréquence de décharge, amplifiée par l'effet facilitateur du blocage de Kv1.1 sur l'activité spontanée (Fig. 29, période 2) (Ovsepian et al. 2016).
3. Cette augmentation du taux de décharge des neurones du cortex M1 pourrait entraîner une amplification de l'activité synaptique de fond, qui peut participer à la dépolarisation progressive de la membrane (Altwegg-Boussac et al. 2014) et faciliter le couplage entre les potentiels post-synaptiques excitateurs et les potentiels d'action (Guan et al. 2007; Ovsepian et al. 2016). Cela pourrait expliquer la fréquence accrue des événements synaptiques dans M1 observés juste avant les crises, et le déclenchement, *via* une sommation temporelle facilitée par une constante de temps membranaire (τ_m) augmentée, d'une dépolarisation paroxystique dans une majorité de neurones (Fig. 29, période 3).
4. La dépolarisation massive anormale sous-jacente aux TDW ressemble à l'événement épileptique appelé « *paroxysmal depolarization shift* » (Prince 1968), qui est dû aux effets

synergiques de conductances (G_m) synaptiques et voltage-dépendantes (Hotka et Kubista 2019). Conformément à ce scénario, nous avons montré que les dépolarisations survenant pendant les TDW étaient associées à un effondrement des valeurs de résistance membranaire (R_m) dans les neurones pyramidaux. La synchronisation des dépolarisations paroxystiques liées aux TDW dans le cortex moteur, attestée par le « DC shift » de grande amplitude enregistré simultanément dans le milieu extracellulaire, est probablement responsable d'une décharge robuste et coordonnée parmi les neurones du cortex M1, y compris ceux du tractus pyramidal initiant les contractions musculaires toniques (Fig. 29, période 4).

Notre nouveau modèle animal fournit ainsi un argument supplémentaire en faveur d'une origine épileptique corticale des TDS.

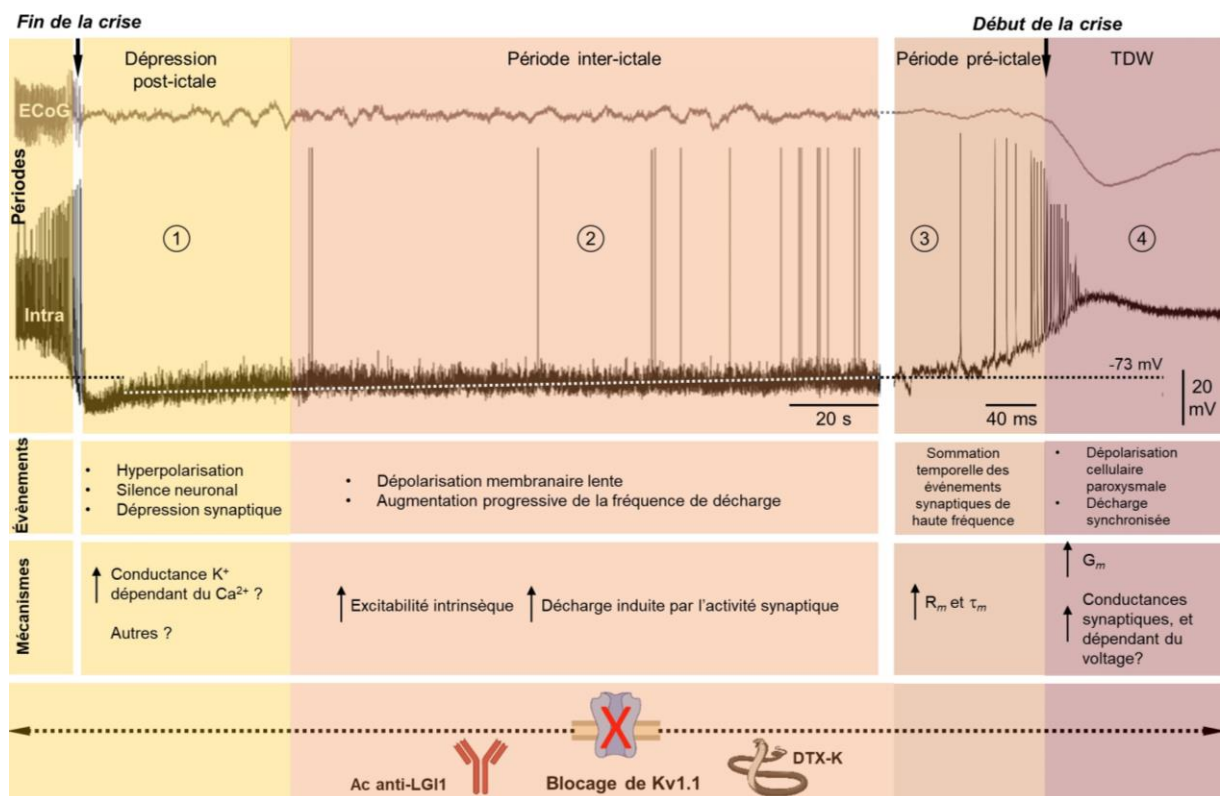


Figure 29. Scénario neuronal qui pourrait expliquer la récurrence cyclique des crises après la perturbation de Kv1.1, via une injection de DTX *in vivo*, ou via la diffusion d'anticorps anti-LG11, dans un cerveau mature. Des explications sur chaque étape de ce scénario sont détaillées dans le paragraphe 8.3. Ac : anticorps; G_m : conductance membranaire; R_m : résistance membranaire; TDW : tonic-dystonic wave; τ_m : constante de temps membranaire; V_m = potentiel membranaire.

CHAPITRE 9

LIMITES DE LA MODÉLISATION PAR LA DTX DES EAI À ANTICORPS ANTI-LGI1

Notre modèle de rongeur, qui reproduit les TDS humaines *via* un blocage spécifique de Kv1.1, ne reproduit pas le processus auto-immun ni le spectre complet des perturbations médiées par les anticorps anti-LGI1.

Il s'agit d'un modèle aigu, utile pour explorer les processus ictogéniques conduisant aux TDS, et éventuellement pour tester des molécules qui bloquent ces phénomènes. Il n'explore néanmoins pas de modifications induites sur le long terme, comme par exemple les séquelles irréversibles observés chez les patients traités tardivement, qui pourraient être causés par une excitotoxicité induite par les crises (González-Burgos et al. 2009). En effet, environ 10 h après l'injection focale de DTX, les crises des rats commencent à diminuer spontanément, et aucune crise n'a été observée 30 h après l'injection de DTX.

De plus, un dysfonctionnement des AMPA-R, observé chez les souris LGI1^{-/-} et chez les souris traitées avec des anticorps anti-LGI1 humains (Fukata et al. 2010; Petit-Pedrol et al. 2018) pourrait également participer à l'initiation des crises en modulant la balance excitation/inhibition, ce qui ne peut pas être étudié par notre modèle. Il est difficile de comprendre comment une efficacité réduite de l'excitation synaptique, causée par une altération des AMPA-R, pourrait favoriser l'émergence de crises. La même question se pose pour les patients atteints d'EAI à anticorps anti-AMPA-R, dont environ un tiers présentent des crises (Zhang et al. 2021). Cela pourrait être causé par une diminution spécifique de l'activité des AMPA-R au niveau des interneurons inhibiteurs, ce qui a été suggéré par l'expression de LGI1, ADAM22 et ADAM23 dans les interneurons de l'hippocampe de souris (Ohkawa et al.

2013). En effet, cela entraînerait une désinhibition du réseau. Cependant, l'inactivation conditionnelle de LGI1 ciblée dans les cellules glutamatergiques, ou dans les interneurons exprimant la parvalbumine (Boillot et al. 2014), n'est pas en faveur de cette hypothèse. En effet, l'inactivation conditionnelle de LGI1 dans les cellules glutamatergiques suffit à déclencher des crises, ce qui n'est pas le cas de la suppression de LGI1 limitée aux cellules exprimant la parvalbumine. Ainsi, les crises associées à une inhibition de LGI1 semblent plus dépendre d'une efficacité accrue des cellules excitatrices, plutôt que d'une réduction désinhibitrice de l'activité des interneurons. Une alternative serait que l'expression réduite des AMPA-R pourrait être impliquée dans les symptômes non épileptiques des patients. De futures études, combinant des blocages de Kv1 et des AMPA-R, seraient nécessaires pour apprécier la contribution spécifique des partenaires synaptiques de LGI1 dans la physiopathologie de l'EAI à anticorps anti-LGI1.

CHAPITRE 10

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'absence d'induction de crise d'épilepsie par les différentes méthodes d'injections d'anticorps *in vivo* que nous avons réalisées, ainsi que dans les modèles publiés récemment sur les EAI à anticorps anti-LGI1 et sur d'autres EAI (cf. paragraphe 7.1), suggère que l'approche par diffusion passive d'anticorps humains *in vivo* chez le rongeur n'est pas une méthode adaptée pour modéliser les symptômes épileptiques de cette maladie. Pour nous affranchir de ces limites, nous avons développé un modèle animal en ciblant directement les canaux Kv1, *via* leur sous-unité Kv1.1, en aval de LGI1. Nous avons montré que l'inhibition de Kv1.1 suffit à déclencher des crises chez le rongeur, et que ces crises reproduisent fidèlement les TDS observées chez les patients souffrant d'une EAI à anticorps anti-LGI1. Des enregistrements électrophysiologiques multi-échelles *in vivo* nous ont permis de mettre en évidence un scénario prédictif de la genèse des TDS à une échelle neuronale. Toutefois plusieurs questions restent en suspens.

Les patients atteints d'EAI à anticorps anti-LGI1 présentent des symptômes relativement stéréotypés, qui affectent particulièrement certaines structures telles que le cortex moteur et l'hippocampe, ainsi que le striatum. Cette répartition entre les structures cérébrales semble contre-intuitive dans la mesure où LGI1, ainsi que les canaux Kv1 et AMPA-R, sont exprimés de manière ubiquitaire dans le cerveau. Plusieurs hypothèses pourraient participer à l'explication de ce phénomène :

- Les conséquences sur Kv1 d'une inhibition ubiquitaire de LGI1 pourraient être différentes selon les régions cérébrales. Cette hypothèse pourrait être testée par des injections de DTX dans différentes régions du cerveau, afin d'observer si des crises similaires ou différentes à celles que nous avons décrites dans M1 surviennent, voire si aucune crise ne se déclenche.
- Une autre hypothèse pourrait être un assemblage différent des canaux Kv1 et du complexe protéique associé, selon les régions. Si d'autres partenaires moléculaires, exprimés de manière non homogène dans le cerveau, peuvent compenser l'inhibition de LGI1, cela pourrait expliquer les différences entre les régions. Il serait ainsi intéressant de réaliser des précipitations du complexe protéique associé à Kv1, dans différentes régions cérébrales, et en particulier dans le cortex M1 et l'hippocampe.
- L'hypothèse d'une réponse auto-immune hétérogène dans l'ensemble du cerveau, avec par exemple une concentration d'anticorps ou de cellules B différente selon les régions cérébrales, paraît peu probable. Une réponse homogène lors d'injections de DTX dans différentes structures cérébrales pourrait aller dans le sens de cette hypothèse, si ces injections déclenchent des crises d'aspect électrique similaire, mais avec des symptômes différents dus à la différence fonctionnelle des régions injectées.

Il serait intéressant d'examiner dans quelle mesure la spécificité de l'inhibition des canaux Kv1 est requise pour déclencher des TDS. Étant donné que les TDS sont pathogénomiques des EAI à anti-LGI1, on s'attend à ce que le phénomène qui les déclenche soit spécifique de LGI1, et que l'inhibition d'autres canaux potassiques ne permette pas de reproduire les TDS. Cette hypothèse pourrait être testée par exemple avec des injections d'AmmTx3, une toxine qui inhibe spécifiquement les canaux Kv4 (Maffie et al. 2013), des canaux potassiques qui médient un courant de type A (Birnbaum et al. 2004). Ces questions sur la spécificité du courant impliqué dans ces crises sont importantes pour la compréhension physiopathologique, mais aussi dans le but de développer à terme des traitements spécifiques.

Nous avons montré que la rétigabine, un agoniste des courants potassique dépendants du voltage (Varghese et al. 2021) connu comme étant efficace sur les épilepsies focales (Gunthorpe et al. 2012), était efficace pour bloquer les crises induites par la DTX. Cet effet pourrait provenir d'une compensation de certains des changements neuronaux déclenchés par le déficit en Kv1.1. Ces résultats suggèrent une nouvelle approche thérapeutique possible qui pourrait, en association avec l'immunothérapie, être utilisée pour traiter les crises au stade

précoce de l'EAI à anticorps anti-LGI1. En effet, l'immunothérapie, qui a prouvé son efficacité, ne bloque les crises qu'après plusieurs semaines, voire plusieurs mois (de Bruijn et al. 2019). Pendant ce temps, les patients continuent à présenter des crises, handicapantes, et pouvant être responsables de séquelles irréversibles. Ainsi, le traitement précoce des crises chez les patients est un enjeu majeur dans cette EAI. La prescription de rétigabine est actuellement suspendue en raison d'effets secondaires importants (Clark et al. 2015). Néanmoins, il s'agit d'effets secondaires à long terme, qui surviennent après plusieurs années (Clark et al. 2015). Dans le cas des EAI à anticorps anti-LGI1, le traitement devrait se limiter à quelques mois, le temps que l'immunothérapie, agisse. Du fait des effets secondaires importants de la rétigabine et de son retrait du marché, notre étude n'est pas suffisante pour suggérer l'utilisation de la rétigabine dans les EAI à anti-LGI1, mais elle montre que le modèle animal pourrait être utilisé dans des études futures pour rechercher et développer de nouveaux traitements.

IV. ANNEXES

ANNEXE A

MOLECULAR STRUCTURE, PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS AND DISRUPTION-RELATED DISEASES OF LGI1 PROTEIN

Revue en cours de révision par le journal *Cellular and Molecular Life Science*, au moment de l'écriture de ce manuscrit.

Molecular structure, physiological functions and disruption-related diseases of LGI1 protein

Paul Baudin (0000-0002-8714-5784)^{1,*}, Louis Cousyn (0000-0003-1407-5575) ^{1,2,*},
MD, Vincent Navarro (0000-0003-0077-8114) ^{1,2,3,†}, MD, PhD

¹ Sorbonne Université, Paris Brain Institute – Institut du Cerveau, ICM, INSERM, CNRS, APHP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

² AP-HP, Epilepsy Unit, Pitié-Salpêtrière Hospital, DMU Neurosciences, Paris, France

³ AP-HP, Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

*These authors contributed equally to this work

† Correspondance to: Prof. Vincent Navarro, MD, PhD, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France;

Email: vincent.navarro@aphp.fr

Abstract:

Leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1) is a secreted glycoprotein, mainly expressed in the brain, and involved in central nervous system development and physiology. Mutations of LGI1 have been linked to autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE). Recently auto-antibodies against LGI1 have been described as the basis for an autoimmune encephalitis, associated with specific motor and limbic epileptic seizures. It is the second most common cause of autoimmune encephalitis. This review presents details on the molecular structure, expression and physiological functions of LGI1, and examines how their disruption underlies human pathologies. Knock-down of LGI1 in rodents reveals that this protein is necessary for normal brain development. In mature brains, LGI1 is associated with Kv1 channels and AMPA receptors, via domain-specific interaction with membrane anchoring proteins and contributes to regulation of the expression and function of these channels. Loss of function, due to mutations or autoantibodies, of this key protein in the control of neuronal activity is a common feature in the genesis of epileptic seizures in ADLTE and anti-LGI1 autoimmune encephalitis.

Keywords: LGI1; Kv1; AMPA receptors; genetic epilepsy; autoimmune encephalitis

1. Introduction

The epilepsies affect more than 1% of the world population and have diverse causes and prognoses. While mutations of genes encoding ion channels are the most frequent cause of inherited epilepsies, other mechanisms may be involved. For instance leucine-rich, glioma inactivated 1 protein (LGI1) is a secreted synaptic protein and mutations of LGI1 are associated with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE) [1–3]. In addition, auto-antibodies against LGI1 are linked to an autoimmune encephalitis (AE). It is becoming clear that such auto-immune disorders are responsible for many unexplained drug-resistant epilepsies [4–6]. AE with anti-LGI1 antibodies is the second most frequent type of AE, and is characterized by limbic encephalitis associated with pathognomonic tonic-dystonic seizures (TDS) [7–10].

LGI1 is a member of the LGI protein family. This family consists of secreted glycoproteins with a leucine-rich repeat (LRR) domain and an epitempin (EPTP) domain, which influence several aspects of nervous system development and

physiology [11]. LGI1 was initially described as a putative tumor suppressor, since it was found at a chromosomal translocation breakpoint in a glioma cell line [12]. LGI1 was also underexpressed in glioblastoma cells [12–14] and reduced tumor cell proliferation and migration [15–17]. However, the link to cancer remains controversial. LGI1 is expressed at low levels in glial cells [18], and tumors are not associated with either ADLTE [19] or with the AE linked to LGI1 auto-antibodies [20].

This review first examines the molecular structure, expression and physiological functions of LGI1. We then discuss how disruption of LGI1 functions, due to either genetic mutations or auto-antibodies, contributes to genetic or autoimmune epileptic syndromes.

2. Structure, expression of LGI1 and molecular partners

2.1. LGI1 structure and domain organization

The human *LGI1* gene, located in the chromosomal region 10q24, is 39.6 kb long and consists of eight exons and seven introns. It encodes a 2.2 kb transcript. The mouse *LGI1* gene shares 91% of its nucleotide sequence with its human orthologue, resulting in 97% amino acid sequence identity [12, 21]. LGI1 is a protein of 557 amino acids with a molecular weight of 64kDa [12]. It includes an N-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain and a C-terminal epitempin repeat (EPTP) domain, also called epilepsy-associated repeat (EAR) domain (Fig. 1). LGI1 has no transmembrane domain, and cleavage of the signal peptide at the N-terminal extremity produces a mature protein of 60kDa. LGI1 is a secreted glycoprotein [1–3, 22, 23]. Before secretion, LGI1 is N-glycosylated on the N192, N127 and N422 residues in the endoplasmic reticulum [3, 24].

The LRR domain is composed of four leucine-rich patterns, each of 24 amino acids, and has a cysteine cluster on each side. It is coded by exons 1 to 6 [21, 25, 26]. The EPTP domain is coded by the exons 7 and 8. It contains a seven-bladed beta-propeller, with each blade composed of four-stranded antiparallel β -sheets of around 45 amino acids [26–29]. LRR and EPTP domains are both thought to mediate interactions with other proteins [28, 30].

2.2. LGI1 expression profile

Various commercial antibodies directed against LGI1 have been shown to cross-react with other members of the LGI protein family [1, 24, 31, 32]. This lack of specificity might seem to preclude analysis of LGI1 protein distribution by immunohistochemistry. However, anti-LGI1 antibodies purified from auto-immune encephalitis patients are known to be specific [33, 34].

In mouse and human tissue, *LG11* transcripts are expressed at high levels in the brain, at moderate levels in spinal cord and peripheral nerves, and are not detected in heart, liver, lungs, placenta, or pancreas [12, 25, 35, 36]. In mouse brain, *LG11* expression is higher in neurons, than in glial cells [24, 35, 37]. *LG11* is expressed by both excitatory and inhibitory neurons. Ohkawa et al. [33] used dual hybridization *in situ* to show that in mouse hippocampus, *LG11* mRNA was coexpressed with vGluT1, the vesicular glutamate transporter 1, specific to excitatory neurons, and also with GAD67, glutamate decarboxylase 67kD, an inhibitory cell marker.

In adult mice, *LG11* mRNA levels are most high in the hippocampus, other limbic structures and neocortex. Hippocampal mRNA signals are most strongly associated with CA3 pyramidal cells and granule cells of the dentate gyrus, with lower expression in the CA1 subfield [1, 38–40]. The application of serum and cerebrospinal fluid (CSF) IgG from anti-LGI1 AE patients to mouse brain sections, revealed strong LGI1 labeling in hippocampal neuropil [7, 33]. In slices from *LG11*^{-/-} mice hippocampus, viral re-expression of LGI1 showed expression in both axons and dendrites [41]. A spatially restricted expression suggested LGI1 is secreted in paracrine fashion. LGI1 has been shown to be enriched at synapses [42, 43] and the axon initial segment of hippocampal neurons [44, 45].

LG11 mRNA is expressed in diverse neocortical areas, with some variability between layers: cortical layers V-VI have higher expression levels than layers I-IV. In adult mice, *LG11* transcripts are detected in the amygdala, piriform cortex, entorhinal cortex and cerebellum. In the cerebellum, anti-LGI1 antibodies from AE patients induce labeling at basket cell synapses and on the soma of Purkinje cells. *LG11* transcripts are absent or expressed at low levels in the olfactory bulb, diencephalon and brainstem [2, 7, 36, 38–40].

A developmental time profile of LGI1 expression has been resolved using Western blot analysis of mouse brain lysates. It shows LGI1 protein first appears during

late embryonic development (E15) and increases until adulthood [2, 37, 46–49]. During embryogenesis, LGI1 expression is not restricted to differentiated neurons but is rather diffuse [31, 49]. This diffuse expression seems to be regulated in a spatial and temporal manner [31]. LGI1 is associated with certain immature migrating neurons [31]. This orchestrated time profile sustains the idea that LGI1 plays a significant role in normal brain development (cf. paragraph 3.1).

2.3. LGI1 molecular partners

2.3.1. LGI1 protein network

Protein partners of LGI1 have been identified by affinity purification in knock-in (KI) mice expressing an epitope-tagged LGI1 protein. Partner proteins from the precipitated complex linked to LGI1 were identified by mass spectrometry and Western Blot [50]. The most abundant proteins identified in this way were ADAM22 (A Disintegrin And Metalloproteinase 22) and ADAM23. Less abundant proteins included ADAM11, postsynaptic membrane-associated guanylate kinase proteins (MAGUKs: PSD95, PSD93 and SAP97), Kv1 channels, presynaptic scaffolding proteins (CASK and Lin7), and the 14-3-3 protein, a known partner of ADAM22 [50, 51]. Some of the identified proteins share some functional attributes with LGI1. As we will describe, genetic disruptions of *LG11* produce animals which exhibit generalized epileptic seizures during early postnatal life [47, 50, 52]. Similar seizures were seen in animals in which *ADAM11* [53], *ADAM22* [54], *ADAM23* [55] and *KCNA1* and *KCNA2* - which code for Kv1 channel subunits - [56, 57] genes are inactivated.

2.3.2. Membrane receptors for LGI1: ADAM11, ADAM22, ADAM23 and Nogo receptor 1

ADAM proteins

Members of the ADAM protein family are components of multi-molecular protein complexes which include LGI1 [50]. The extracellular domain of ADAM proteins contains a metalloproteinase-like domain, a disintegrin domain, a cysteine-rich domain and an epidermal growth factor (EGF)-like domain. Three ADAM proteins (ADAM22, ADAM23 and ADAM11) bind to LGI1 and are exclusively expressed in the CNS [58].

They all lack a zinc-binding motif resulting in a catalytically inactive metalloproteinase domain due to the absence of critical amino acids at this site [58–60].

Further insight into the nature of the multi-molecular protein complex was obtained by immunoprecipitation based on tagged ADAM22 rather than LGI1 [43]. Affinity purification showed that partner proteins included LGI family members (LGI1 to LGI4), ADAM proteins (ADAM11, ADAM22 and ADAM23), pre and postsynaptic MAGUKs and scaffold proteins, presynaptic Kv1 channels, and the 14-3-3 protein partner of ADAM22. Close similarities of protein complexes based on tagged LGI1 or ADAM22 suggest they form part of the same pathway.

PSD95, a protein of the MAGUK family, is another component of the multi-molecular protein complex. PSD95 acts as a postsynaptic anchor for proteins at excitatory synapses. It contributes to synaptogenesis and synaptic plasticity among other processes [61]. Immunoprecipitation based on PSD95 recovers LGI1 and ADAM22, but not ADAM11 and ADAM23 [2]. The basis for this difference is that an alternatively spliced version of ADAM22 contains an intracellular C-terminal PDZ binding motif which interacts with the third PDZ domain of PSD95 but is absent from ADAM11 and ADAM23 [55]. Binding to PSD95, suggests ADAM22 and LGI1 are localized at the postsynaptic side of the synaptic cleft. Time-lapse imaging of mCherry tagged ADAM22 and ADAM23 in cell culture, provides further support for a postsynaptic location of ADAM22 and suggests that ADAM23 may be located presynaptically. Axonal transport of ADAM23 was largely anterograde, while ADAM22 was predominantly transported in a retrograde sense [45]. However, this assumed localization may not be completely resolved. ADAM22 is also enriched presynaptically in the axonal compartment at the axon initial segment [45]. Further studies may bring clarification.

ADAM proteins act as chaperone-like proteins for LGI1 as well their role in anchoring LGI1 to the cell membrane. They participate in LGI1 maturation and N-glycosylation processes [45]. Furthermore, ADAM22 and ADAM23 colocalize with LGI1 in axonal transport vesicles [45], suggesting possible interdependent interactions for their transport and subcellular distribution. Membrane expression of LGI1 is strongly decreased in ADAM22^{-/-} and ADAM23^{-/-} mice [62], as is ADAM22 and ADAM23 expression in LGI1^{-/-} animals [50, 62], providing further evidence for interactions between ADAM family proteins and LGI1.

Nogo Receptor 1 (NgR1)

The Nogo receptor 1, NgR1, is coded by the *RTN4R* gene. It is a 473 amino acid protein, which contains a signal peptide, eight LRR domains, an LRR C-terminal flanking domain cysteine rich, a unique region and a glycosylphosphatidylinositol membrane anchorage site [63]. NgR1 interacts directly with LGI1 [48, 64]. It co-immunoprecipitates with ADAM22 from rat brain lysate suggesting functional interactions exist [48]. However, it is not present in the multi-molecular protein complex recovered by LGI1 purification, nor in those purified by immunoprecipitation based on tagged ADAM22, Kv1, or PSD95 [2, 43, 50, 65]. The absence of NgR1 in these protein complexes is hard to explain. Possibly NgR1 binding to LGI1 is weaker than that to the ADAM receptors and associated proteins.

The NgR1-ADAM22 complex facilitates binding of LGI1 to ADAM22 [48]. However, LGI1 also binds NgR1 independently in HEK293T cells [48]. In this way LGI1 acts as a competitive inhibitor of NgR1, antagonizing the effects of growth inhibition mediated by the ligands Nogo66, myelin-associated glycoprotein (MAG) and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMPG) [48].

2.3.3. Trans-synaptic assemblies of LGI1

Immunoprecipitation studies suggest that LGI1 interacts with both pre and postsynaptic molecules. It is co-immunoprecipitated with presynaptic anti-Kv1.1 antibodies [65], and with postsynaptic anti-PSD95 antibodies [2]. In addition, both pre and postsynaptic proteins are present in the LGI1-purified multi-molecular complex [50]. Moreover, ADAM22 and ADAM23 co-immunoprecipitated from wild-type mice brain lysates but not those derived from LGI1^{-/-} mice [50]. Based on this evidence, the LGI1 protein has been suggested to form a trans-synaptic bridge between the ADAM23 and ADAM22 proteins [50].

Superresolution imaging has recently provided more details on interactions between LGI1 and ADAM22 using an epitope-tagged ADAM22 KI animal [26]. Cryo-electron microscopy demonstrated 1:1, 2:2 and 3:3 ADAM22-LGI1 complexes in solution, in a ratio of approximately 6:3:1. Crystallization of the 2:2 ADAM22-LGI1-LGI1-ADAM22 hetero-tetramer [26] showed that LGI1 binds to the metalloproteinase-like domain of ADAM22 via its EPTP domain. This LGI1-EPTP domain alone is sufficient to mediate ADAM22 binding. This binding is mediated by interactions

between the amino acids Trp398, Tyr408 and Tyr409 of ADAM22 and a hydrophobic pocket in the EPTP beta propeller of LGI1. The LGI1-ADAM22 complex dimerizes through binding between LRR domains of pairs of LGI1 molecules, thus forming 2:2 dimer-of-dimer heterotetramers [26] (Fig. 2A).

This dimerization is consistent with a trans-synaptic role for 2:2 ADAM22-LGI1 assemblies. The length of the 2:2 heterotetramer is estimated at 19 nm [26], which is close to the size of the synaptic cleft [66]. Different LGI1-ADAM complexes could be possible since LGI1 may similarly bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11 [26, 29]. Experimental evidences for the existence of this trans-synaptic complex *in vivo*, and of the association with different ADAM proteins, remain to be conclusively demonstrated.

In addition to the trans-synaptic complex, LGI1 is also enriched at the axon initial segment, where it colocalizes with ADAM22 and Kv1 channels [44, 45]. Complexes at this site may involve 1:1 or 3:3 ADAM-LGI1 assemblies.

3. Physiological functions of LGI1

3.1. Role of LGI1 during development

3.1.1. LGI1 is required for a normal brain development

LGI1 is expressed during late development in the mouse and expression increases to reach a peak during the first two postnatal weeks (cf. paragraph 2.2). A role for LGI1 in brain development was inferred from structural abnormalities in animals from which LGI1 is genetically deleted. The cortex of early postnatal LGI1^{-/-} mice (P7-P20) shows a diffuse dysplasia together with an abnormal neuronal layer organization [67]. Cortical dysplasia is also induced by conditional inactivation of LGI1 in nestin immunopositive cells, but not in GFAP cells, CAMK2a cells or parvalbumin cells [68]. This data suggests that cortical malformations may result from a loss of LGI1 function in neuronal precursor cells during development. In a different LGI1^{-/-} mouse, cortical malformations were not observed but neuronal loss occurred in the CA1 and CA3 areas, and the thickness of the granule cell layer was enhanced with neuronal dispersion [47]. Defects in cerebellar foliation have been detected in P2-P4 LGI1^{-/-} animals together with a reduction in thickness of the external granule cell layer [69].

3.1.2. LGI1 enhances neurite growth and synapse formation and maturation

LGI1 controls synapse numbers and activity. In LGI1^{-/-} mice, cortical and hippocampal neurons receive fewer synapses and synaptic signaling is reduced [64, 67]. Conversely, application of LGI1 to cultured hippocampal neurons over 6 days increased synapse numbers [64]. LGI1 stimulates dendritic growth of neurons in culture, and enhances axonal growth by suppressing myelin-induced growth cone collapse [48, 55].

Interactions between LGI1 and the Nogo receptor 1, NgR1, (cf. paragraph 2.3.2) are suggested to mediate these effects on axonal and dendritic growth and also on the formation and maturation of synapses [64]. When occupied by its myelin-derived agonist ligands, NgR1 activates RhoA signaling. This small GTPase acts to limit synapse numbers in development [70], and is crucial for normal neuronal morphogenesis [71]. Hippocampal neurons of NgR1^{-/-} mice receive more synapses than control mice [64]. Work on LGI1^{-/-} mice suggests that LGI1 inhibits RhoA activation via NgR1 [64]. Thus, the NgR1-LGI1 balance would regulate RhoA activity during development, and in this way affect synaptic number and function.

LGI1 may also affect neuronal maturation through its interactions with proteins of the ADAM family. Indeed, LGI1-ADAM22 and LGI1-ADAM23 interactions have been shown to influence neuronal development [55]. Furthermore, NgR1 and ADAM22 interact directly, although it is not clear whether ADAM proteins and NgR1 participate in independent LGI1-associated pathways, or function as co-receptors for LGI1. Both arrangements may coexist.

Distinct LGI1^{-/-} mouse strains have provided opposite evidence on LGI1 influences on neuronal process growth and synaptogenesis [42, 62]. Electron microscopy provided no evidence for that dendritic growth or synaptogenesis were altered in different LGI1^{-/-} mice. The reasons for these inconsistencies are unknown, and further work is needed to understand differences between animals with LGI1 deletions.

3.1.3. LGI1 regulates neuronal myelination

Electron microscopy examination of LGI1^{-/-} mice has suggested LGI1 facilitates myelination in the central and peripheral nervous system [72]. Recent data has shown that LGI1 controls the differentiation of oligodendrocyte precursor cells [37]. In LGI1^{-/-}

animals the expression of TSC1 (tuberous sclerosis complex 1) was reduced, upregulating activity of the mTORC1 complex in oligodendrocytes. Since mTORC activity is known to affect CNS myelination [73], over-activation in LGI1^{-/-} mice should tend to reduce myelination [37].

3.2. Roles of LGI1 in the control of neuronal ion channels

3.2.1. LGI1 regulates presynaptic voltage-dependant K⁺ current through Kv1 channels

Kv1 channels are a family of K⁺ channels, which are expressed as protein tetramers of 4 alpha subunits, each with 6 transmembrane domains. Eight alpha subunits have been described so far (Kv1.1 - Kv1.8). They can assemble into homotetramers or heterotetramers. Different combinations control the biophysics, pharmacology and dynamics of K⁺ currents and also sites of membrane insertion and channel mobility [74]. Alpha subunits may be associated with accessory intracellular beta subunits which modify channel properties and currents [75]. Kv1 channels are expressed ubiquitously and exhibit great diversity in expression, topography, and associated subunits [74, 76]. Expression levels are high in axons and terminal boutons as well as somata and dendrites. Kv1 channels are enriched and colocalize with LGI1 in axon initial segments [44, 45].

K⁺ currents mediated by Kv1 channels activate at membrane potentials near neuronal firing threshold [77] thus operating to prevent hyperexcitability by limiting and delaying neuronal firing [78, 79]. Kv1 channels control action potential shape, timing and frequency and transmitter release from axonal terminals [79–82]. Kv1.1 subunits tend to promote fast activating, slowly inactivating outward K⁺ currents in response to depolarization [74], which are blocked by the specific inhibitor dendrotoxin-K [83, 84].

Interactions between Kv1 and LGI1 suggest that LGI1 affects Kv1 expression and functional properties. Co-immunoprecipitation studies with anti-LGI1 antibodies precipitate Kv1 channels, and reciprocally LGI1 protein was isolated in co-immunoprecipitation work based on anti-Kv1.1 antibodies [50, 65]. However LGI1 does not bind directly to Kv1, but interactions are mediated indirectly via proteins of the ADAM family and PSD95-like MAGUKs [43]. LGI1 does not interact in the same way

with all different Kv1 subunits. In LGI1^{-/-} mice, Kv1.1 and Kv1.2 expression, but not that of Kv1.4 and Kv1.6, was considerably reduced [44, 85].

Functional interactions between LGI1 and Kv1.1 were first described by Schulte et al. in a heterologous expression system [65]. LGI1 potentiated K⁺ currents by blocking fast-inactivation of Kv1.1 channels, which is mediated by the beta subunit Kvβ1. Similarly, LGI1, associated with ADAM22, potentiates K⁺ currents in HEK293 cells transfected with Kv1.1/Kv1.4 [86]. Furthermore in LGI1^{-/-} mice, axonal expression of Kv1.1 channels in CA3 pyramidal cells is strongly decreased, as well as Kv1.1 currents, which increases neuronal excitability [44]. Dendrotoxin-K, the specific Kv1.1 antagonist, increases neuronal excitability and transmitter release in wild-type neurons, but not in neurons lacking LGI1 [44], confirming that LGI1 acts on Kv1.1 channels.

3.2.2. LGI1 regulates postsynaptic AMPA-R channels

Glutamate-activated ionotropic AMPA receptors (AMPA-R) underlie fast, excitatory synaptic transmission in the mammalian brain. They are heterotetramers formed by diverse assemblies of AMPA-receptor subunits GluR1 to GluR4. When activated by synaptically released glutamate, ion flux through a membrane pore opened in the receptor mediates a postsynaptic excitatory current [87].

While the multi-molecular protein complex derived by immunoprecipitation of tagged LGI1 did not contain AMPA-R, it did contain PSD95 and SAP97 [50], which both interact with AMPA-Rs. PSD95 is a scaffolding protein, which stabilizes AMPA-R at the postsynaptic membrane [61]. It binds, through its two first PDZ domains, to stargazin protein which in turn binds to AMPA-R subunits [88]. SAP97 is another anchoring protein of the MAGUK family. It binds directly through its second PDZ domain, to a PDZ ligand motif on the C-terminus of the GluR1 subunit [89]. An alternatively spliced version of ADAM22 also possesses a C-terminal cytoplasmic PDZ ligand motif which binds to the third PDZ motif of PSD95 [2].

PSD95 overexpression increases the number of AMPA-R expressed at postsynaptic sites and so increases the amplitude of synaptic events [61, 88]. This effect was abolished in LGI1^{-/-} mice and in KI mice expressing a mutated version of ADAM22 without its PDZ binding site to PSD95 [41, 43]. These data suggest that both LGI1 and ADAM22 are needed for PSD95 membrane anchoring of AMPA-R.

Postsynaptic stabilization of AMPA-R is thus indirectly linked to LGI1, via complexes of either ADAM22-PSD95-stargazin or ADAM22-PSD95-SAP97.

LGI1 may also regulate AMPA-R mediated synaptic currents. Application of LGI1 protein to acute slices of rat hippocampus enhanced EPSC amplitudes [2]. Inversely, AMPA-R currents decreased in slices from LGI1^{-/-} mice or from animals expressing mutated ADAM22 [41, 43, 50]. Moreover, AMPA-R currents were restored by LGI1-expressing lentivirus injections in hippocampal slice culture from LGI1^{-/-} mice [41]. Thus LGI1 directly enhances postsynaptic events presumably by recruiting AMPA-Rs to postsynaptic sites. AMPA-R decrease in LGI1^{-/-} mice was not a consequence of seizures in these animals, as the study of Lovero et al. [41] reported AMPA-R alteration in P8 mice, before the emergence of spontaneous seizures (cf. paragraph 4.1.2).

Some of these findings have been disputed in work with other strains of LGI1^{-/-} mice. Other studies reported no differences in AMPA-R expression or in EPSC properties compared to control mice [42, 52]. The reasons for those discrepancies remain unclear. However, a number of different approaches, including LGI1^{-/-} mice, ADAM22 KI mice expressing a non-functional ADAM22, as well as PSD95 overexpression in LGI1^{-/-} and ADAM22-mutated mice, tend to conclude that LGI1 acts on molecules that stabilize AMPA-Rs at post-synaptic sites and so enhances the number of receptors expressed. These findings are congruent with data from protein interaction studies.

4. Human pathologies related to LGI1 disruption

4.1. Genetic disruption of LGI1

4.1.1. Autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE)

In 1995, Ottman et al. reported a familial focal epilepsy with autosomal dominant inheritance linked to chromosome 10q [90]. Predominant auditory features were suggestive of a lateral temporal lobe onset. LGI1 mutations were identified a few years later in several families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy [25, 35, 38]. Although heterozygous mutations in reelin, *RELN*, have also been reported in

ADLTE families [91], LGI1 mutations remain predominant and are identified in about one-half of cases [35, 38, 92]. A reduced penetrance around 70% is described [25, 35, 38, 92–94].

The first symptoms of ADLTE occur during adolescence or early adulthood. Focal aware seizures - formerly known as ‘auras’ - with auditory features are the most suggestive manifestations. Ictal auditory symptoms are reported in 62% of patients and seizures are reportedly triggered by sudden sounds, such as a phone ringing for about 20% of them [93]. Initial ictal symptoms include simple sounds such as buzzing, ringing and humming, or more complex hallucinations such as voices or music. Positive or negative auditory illusions include altered sound volumes or frequencies. Patients may experience other less common types of focal aware seizures: visual or olfactory hallucinations, dysmnestic features (*déjà-vu*), or vertigo. 20% of patients describe ictal aphasia [93] as a receptive aphasia, formerly called Wernicke’s aphasia. Focal to bilateral tonic-clonic seizures affect about two thirds of patients [93]. Brain MRI scans are frequently normal, while EEG records may reveal temporal epileptiform activity. ADLTE is generally well controlled by antiepileptic drugs. However drug treatment must be maintained for life since relapses are frequent when drugs are withdrawn.

4.1.2. LGI1 mutations: a loss-of-function pathophysiology

At least 45 distinct mutations of LGI1 have been identified in ADLTE patients. Lists of mutations were published in 2016 and 2020 [95, 96], and no new mutations of LGI1 have been reported since 2020. Of the 45 mutations, there are 30 missense (67%), 7 frameshift (16%), 4 in splicing donor or acceptor sites (9%), 2 nonsense (4.5%) and 2 microdeletions (4.5%). The mutations are homogeneously distributed throughout the *LGI1* sequence, with no specific domain preference (Fig. 1).

Three lines of LGI1^{-/-} mice have been generated to model pathophysiological effects of a genetic loss of LGI1 function [47, 50, 52]. They exhibit similar behavioral phenotypes. Spontaneous generalized epileptic seizures appeared during the second postnatal week at a frequency of approximately one per hour. Ictal EEG events originated earlier in the hippocampus than in the cortex [47]. Weight gain in these young animals was strongly reduced when seizures emerged and LGI1^{-/-} mice died prematurely during the third postnatal week [47, 50, 52]. No spontaneous epileptic seizures have been observed in LGI1^{+/-} mice. Their survival was normal, as was their

fertility [47, 50, 52]. However, at one month, they were more sensitive than LGI1^{+/+} mice to the induction of seizures by the convulsant pentylenetetrazole (PTZ) [50] and by sound stimulation [47]. Thus, LGI1 loss of functions leads to an epileptic phenotype, in a gene-dose dependent manner.

The function of LGI1 mutations associated with ADLTE has been assessed. Frameshift, splice-site, nonsense and deletion mutations seem likely to induce loss of function since protein sequences are strongly altered. Most missense mutations tested (21/24) show defects in secretion while 3/24 are secretion competent [96]. The loss of secretion may result from abnormal protein conformations which would lead to premature degradation by quality control machinery. This hypothesis was tested for the E383A mutation, with a transgenic LGI1^{-/-} model made to express the mutated protein [62], and also for the L385R mutation, in a transgenic rat model [97]. Both animal models exhibited generalized seizures and died prematurely between the second and fourth week of life. Both mutated proteins were unstable and prematurely degraded. The chemical corrector, 4-phenylbutyric acid, which acts to stabilize misfolded proteins, improved secretion of the mutated LGI1 and reduced seizure susceptibility in LGI1-E383A mice, confirming conformational alterations of the LGI1-E383A protein [62].

The three secretion-competent LGI1 mutations were also functionally assessed. The S473L mutation impairs LGI1 binding to ADAM22 but not to ADAM23 [26, 62]. The R474Q mutation did not alter LGI1-ADAM22 or LGI1-ADAM23 binding, but did suppress LGI1 dimerization [26]. The third secretion-competent LGI1 mutation, R407C, did not affect LGI1-ADAM binding, or LGI1-LGI1 binding. Lethal epilepsy was not detected in LGI1^{-/-} mice crossed with transgenic mice to overexpress wild-type LGI1 [50]. Expression of LGI1-R407C in LGI1^{-/-} mice rescued the phenotype, as observed with re-expression of wild-type LGI1. Such a rescue did not occur with the S473L and R474Q mutations [26, 62]. These data suggest that the R407C mutation is non-pathogenic. In contrast, for the pathogenic but secretion-competent mutations S473L and R474Q, function is lost but with no major effects on protein conformation. If the R407C mutation is not pathogenic, could its detection in one ADLTE family [98] be a false-positive? Possibly mutation of a different gene, such as reelin [91], might be involved in this family.

In summary, most LGI1 mutations induce a loss of function which is independent of the type of mutation and its localization in the gene, leading to the epileptic disease.

Genotype-phenotype correlations are therefore absent. No differences were found between truncating and missense mutations, or between the mutations from different sites along the gene. No correlation has been established between different mutations and their respective penetrance [95, 99, 100]. In addition, the behavioral phenotype of LGI1^{+/-} mice overexpressing LGI1-S473L or LGI1-R474Q was similar to that of LGI1^{+/-} mice, indicating the absence of dominant-negative effects [62].

4.2. Autoimmune disruption of LGI1

4.2.1. Autoimmune encephalitis associated with antibodies directed against LGI1

An AE with antibodies targeting the LGI1 protein was reported in 2010 [7, 9]. Before this report, a group of AE syndromes involving central and peripheral nervous systems had been identified and related to antibodies directed against the voltage-gated potassium channel complex, or VGKC [101]. Anti-VGKC antibodies were later shown to target either LGI1 or contactin-associated protein-like2 (CASPR2), which are two protein members of the VGKC complex [7, 9]. The term ‘anti-VGKC encephalitis’ has now been redefined as two distinct subgroups - anti-LGI1 encephalitis and anti-CASPR2 encephalitis - with distinct symptoms and prognosis.

Anti-LGI1 encephalitis is the second most common subtype of AE - related to anti-neuropil antibodies - after anti-NMDA (N-methyl-d-aspartate) receptor encephalitis. It represents about 25% (range, 17.6-34.6%) of all AE subtypes [102–106], and is the most frequently observed subtype in epilepsy units.

Demographic characteristics

Patients with anti-LGI1 encephalitis have a median age of 56-65 – which could explain an association with Alzheimer’s disease – and are more often males than females in a ratio of 2:1 [8, 10, 20, 107–112]. Data from several cohorts suggests a genetic predisposition exists with a strong association to Human Leukocyte Antigen (HLA) class II alleles. HLA-DRB1*07:01 was found in 88-91% of patients [113–116]. Non carriers of this allele were younger (median age: 46), more frequently female, with fewer psychiatric symptoms and less frontal lobe dysfunction [116].

Clinical phenotypes

Two brain regions – motor cortex and the mesial temporal lobe - are mainly affected by anti-LGI1 encephalitis and clinical phenotypes differ accordingly (Fig. 3) [10]. When motor cortex is involved, tonic-dystonic seizures (TDS) are generated. They have also been termed faciobrachial dystonic seizures (FBDS) and are pathognomonic of anti-LGI1 encephalitis. When the mesial temporal lobe is involved, clinical symptoms are indicative of a limbic encephalitis.

Clinical characteristics of TDS are described in Table 1 and supported by a video recording in the Online Resource 1. The term tonic-dystonic seizure (TDS) is preferred to faciobrachial dystonic seizure (FBDS) since face involvement may be variable or absent. TDS events in video-EEG recordings are preceded by a specific and highly reproducible slow wave [10, 117, 118]. This wave, which can be easily missed, lasts around 500 ms and arises from fronto-central electrodes contralateral to the TDS. EEG analysis using average montage and co-recording of EMG activity of the corresponding muscles can help better identify this slow wave (Fig. 3, right). In EMG records, the tonic component of the TDS is characterized by a 'rhombus'-like shape of duration 1-2 sec. Polymyographic records revealed two different EMG profiles associated with TDS [10]. In 2/5 patients, EMG activity was continuous, corresponding to a purely tonic spasm. In 3/5 patients, EMG activity consisted of short rhythmic bursts corresponding to a tonic spasm with superimposed short duration (20-40 ms) myoclonus. The temporal and spatial organization of the jerks was compatible with rapid pyramidal conduction along the corticospinal pathway, as for cortical myoclonus. Taken together, these features support a cortical origin for TDS. Finally, 18F-fluoro-deoxy-glucose (18F-FDG) positron emission tomography (PET) showed a strong increase of metabolism in contralateral primary motor cortex (Fig. 3, right) [10]. These observations suggest TDS originates in motor cortex. A strong bilateral striatal hypermetabolism is detected in AE linked to anti-LGI1. While the motor cortex activation may generate the tonic phase of TDS, the striatum involvement might cause the dystonic posture [119].

Limbic encephalitis (Fig. 3, left) is characterized by mesial temporal lobe seizures and cognitive disorders of subacute onset (typically less than 3 months). Patients with anti-LGI1 AE initially experience focal mesial temporal lobe seizures (MTLS) with no loss of consciousness, mainly including vegetative symptoms (ascending epigastric feeling, hot and cold feeling, pilo-erection), as well as sudden

fear or anxiety, which may be misdiagnosed as psychiatric symptoms. Dysmnestic symptoms (déjà-vu, déjà-vécu) can also occur, but rather in patients suffering from epilepsy in relation to a hippocampal sclerosis as late sequelae, without any active dysimmune encephalitis. The duration of seizures in patients with limbic encephalitis is typically a few seconds, and their frequency may reach 30-40 per day. Thereafter, focal seizures with impaired awareness and automatisms, and focal to bilateral tonic-clonic seizures and status epilepticus may occur. Cognitive disorders associated with limbic encephalitis center on memory impairment, largely involving episodic verbal and visuospatial memories, due to hippocampal involvement. Confusion and disorientation are encountered in case of bilateral involvement of mesial structures. Mean Mini-Mental State Examination (MMSE) score is 20-23.5 points, indicating a mild cognitive impairment [10, 111, 120, 121]. Hippocampal edema is evident on MRI scans made early in an AE. It consists of T2 and FLAIR hypersignals associated with an increased volume (Fig. 3, left). In later stages, signs of hippocampal sclerosis start to predominate, including T2/FLAIR hypersignal associated with atrophy and loss of internal structures. 18F-FDG PET highlights hippocampal hypermetabolism in active limbic encephalitis. Frontal and temporal lobe hypometabolism is typical in patients with cognitive impairment.

Hyponatremia is reported in about two thirds of AE patients (39-69%) [7, 9, 10, 20, 107, 109–111]. They result from a syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH), which may originate from a hypothalamic involvement. Accordingly, a link between hyponatremia and mesial temporal involvement with major cognitive disorders was reported [8, 10]. Peripheral nervous system may also be involved. Peripheral neuropathy and peripheral nerve hyperexcitability have been reported in approximately 5-10 % of patients with anti-LGI1 encephalitis [20, 122]. Neuropathic pain usually displays a length-dependent pattern and responds to immunotherapy [122].

History of the disease

Anti-LGI1 encephalitis originates either in motor cortex or mesial temporal structures. Later, both regions are affected (Fig. 4). Some patients first experience unilateral TDS, which later becomes bilateral. Similarly, the mesial temporal lobe may first be affected unilaterally before the encephalitis affects bilateral cortical structures and severe cognitive impairment ensues. As knowledge on the syndrome improves, the delay

between symptom onset and diagnosis has decreased, from about 12 months a decade ago to 1-3 months at present. The disease usually follows a monophasic time course, with rare long-term relapses. Relapses appear to occur in 25-41% of patients, usually in the first year after recovery [123–125]. Sequels of an initial encephalitis usually stem from a delayed diagnosis, associated with a temporal lobe involvement. For instance an early hippocampal edema can evolve into hippocampal sclerosis and induce MTLE. Epileptic seizures persist in about 20% of patients after treatment and recovery from the encephalitis. Administration of corticosteroids may protect against this evolution [110, 125]. In older patients, interaction with Alzheimer's disease processes can aggravate cognitive dysfunction. CSF biomarkers should be explored to understand such interactions.

Biological findings

Antibodies against LGI1 are mainly IgG4 subtypes [126–128]. They can be identified in both CSF and blood. Antibodies can sometimes be detected only in blood, notably in isolated TDS. IgG4 are not pro-inflammatory antibodies, but rather mediate inhibitory protein-protein interactions with their targets [129]. Unlike other AE syndromes, CSF may be normal, and in contrast to anti-NMDAR AE, lymphocytic meningitis is not observed. In order to exert their pathological effects on their antigens, autoantibodies have to access the CNS. Entry of autoantibodies into the CNS can occur via diffusion of IgG, or via the passage of B cells, from the periphery to the CNS, across the blood brain barrier. B cell IgG synthesis has been demonstrated in the CNS [34]. It is not known if this mechanism coexists with peripheral IgG diffusion to CNS, which is suggested by the approximately 100 times more concentrated antibodies in the serum compared to the CSF [130]. The role of inflammation in anti-LGI1 AE remains to be clarified. Possibly 'encephalopathy' could be a better description since there may be no direct inflammation, even if hippocampal edema is observed probably resulting from inflammation due to excitotoxic processes [131] (Fig. 3, left).

Treatments

TDS and MTLE are poorly controlled by standard antiepileptic drugs [102, 127, 132, 133]. Immunomodulatory and immunosuppressive treatments acting on B lymphocytes and immunoglobulins are more efficient. High doses of corticosteroids with intravenous polyclonal immunoglobulins are often used as a first-line therapy; rituximab has also

been used. Plasma exchange has been used in emergencies. Other drugs have also been used, such as cyclophosphamide. However, there is no class 1 evidence for the use of specific drugs.

4.2.2. Anti-LGI1 antibodies inhibit LGI1

When an antibody has been linked to an autoimmune disease, it is crucial to determine whether it plays an active role in the pathophysiology or whether it is just an effective biomarker. For anti-LGI1 AE, the absence of major inflammatory reactions in the CSF, and IgG4 subtype of most autoantibodies in patients (cf. paragraph 4.2.1) tend to favor a humoral rather than a cellular dysimmune reaction. The reversal of symptoms by immunotherapy also suggests that antibodies mediate AE, and not cytotoxic T lymphocytes which would induce irreversible tissue lesions.

The effects of human anti-LGI1 antibodies have been studied on neurons, *in vitro* and *in vivo*. Anti-LGI1 antibodies are polyclonal and recognize epitopes of both the LRR and EPTP domains of LGI1 [33, 34, 130] which have recently been shown to initiate distinct pathophysiological effects [34, 130]. Binding to the EPTP domain impairs interactions between LGI1 and ADAM22 and also ADAM23. This disruption is similar to that induced by the secretion-competent mutation S473L (cf. paragraph 4.1.2). In contrast antibody binding to the LRR domain induces internalization of LGI1 and its membrane receptors.

Antibody injections into mouse hippocampus or cerebral ventricles, reduce expression of Kv1 and AMPA-R channels after 7-14 days [130, 134], reproducing effects observed in LGI1^{-/-} mice (cf. paragraph 4.1.2). AMPA-R expression was also decreased after adding anti-LGI1 antibodies to rat hippocampal neurons in culture medium [33]. Anti-LGI1 antibodies consistently increase neuronal excitability, regardless of the domain targeted, *in vitro* [34] and *in vivo* [130, 134]. *In vivo* infusion of antibodies in mice, reduces synaptic long-term potentiation [130, 134], and induces reversible memory deficits [134].

Surprisingly seizures do not emerge, even if intracerebral anti-LGI1 antibody injection *in vivo* decreases expression of Kv1 and AMPA-R channels and increases neuronal excitability [130, 134]. AE evolves over weeks or months, so perhaps a two week exposure to antibodies, which decreased channel expression by ~15%, did not suffice to trigger seizures [134]. For comparison, Kv1.1 expression was reduced by

~50% from control in LGI1 KO mice that exhibited frequent generalized seizures [44, 85]. Thus, antibody infusion, critical to demonstrate pathogenicity, may not be the optimal method to explore human epileptic phenotypes.

In summary, LGI1 autoantibodies change neuronal and synaptic function so as to increase neuronal excitability. This loss of LGI1 function in AE is a pathophysiological common point with changes induced by LGI1 mutations in ADLTE patients (Fig. 2B). Seizures represent a common pathological point for AE and ADLTE, even if many clinical symptoms differ sharply.

5. Conclusion

This review has explored consequences of the loss of function of LGI1, a feature common to ADLTE, a genetic syndrome and AE, an autoimmune disease. Reduced Kv1 currents due to loss of LGI1 function led to an increased neuronal excitability and activity, in both genetic and autoimmune animal models, which seem likely to contribute to epileptic disorders linked to LGI1.

LGI1 also controls AMPA-R expression. Precise details on mechanisms have added support to this previously controversial hypothesis. However it remains unclear how a reduced efficacy of fast synaptic excitation could favor the emergence of seizures in the genetic syndrome ADLTE or in the immune related AE. The same question remains to be answered for anti-AMPA-R AE patients, who may also exhibit seizures in estimated 28% of patients [135]. One proposed mechanism involves a specific decrease of AMPA-R activity in inhibitory interneurons [33]. However conditional inactivation of LGI1 in either glutamatergic cells or in parvalbumin containing interneurons [32] did not support this hypothesis. Conditional inactivation in glutamatergic cells sufficed to trigger seizures, but deletion of LGI1 limited to parvalbumin cells did not induce seizures. Thus seizures in LGI1^{-/-} mice may depend on an increased efficacy of excitatory cells rather than a disinhibitory reduction in interneuron efficacy. A reduced AMPA-R expression could also be involved in some non-epileptic symptoms of ADLTE and anti-LGI1 AE patients.

Evidence that LGI1 mutations induce an aberrant brain organization, with abnormal neuronal and synaptic morphologies, suggests that subtle developmental abnormalities may also contribute to seizures resulting from LGI1 mutations in ADLTE. More severe epileptic phenotypes result when LGI1 is deleted during embryogenesis

than when deletions are made during adult life [32]. Developmental effects might partly explain different clinical profiles of ADLTE patients and anti-LGI1 AE patients, for whom LGI1 is inhibited in a fully mature brain.

LGI1 has emerged as a major molecular influence on the regulation of brain development, neuronal excitability and synaptic transmission and plasticity. Comprehension of this physiology is crucial to understand normal brain function as well as the pathophysiological syndromes reviewed here. Better understanding of the physiology, pharmacology and biochemistry will open new therapeutic approaches, such as targeting LGI1 molecular partners, or designing anti-epileptic drugs to target the altered cellular and synaptic currents.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The authors affirm that patients provided informed consent for publication of the images in Figure 3 and in Online Resource 1.

Consent for publication

All authors gave their consent for publication.

Availability of data and material

Not applicable.

Competing interests

V.N. reports personal fees from UCB, Liva Nova, and Eisai, outside the submitted work. The other authors declare that they have no competing interests.

Funding

Agence nationale de la recherche, 'Investissements d'avenir' program ANR-10-IAIHU-06

Fondation pour la Recherche Médicale, grant FDT202012010523

Fondation Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES, Marie Laure PLV Merchandising)

Authors' contribution

Original draft preparation and editing: PB, LC, VN.

Acknowledgments

We thank Richard Miles, for critical reading of the manuscript.

References

1. Senechal KR, Thaller C, Noebels JL (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>
2. Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, et al (2006) Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 313:1792–1795. <https://doi.org/10.1126/science.1129947>
3. Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, et al (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>
4. Dalmau J, Geis C, Graus F (2017) Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiological Reviews* 97:839–887. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2016>
5. Goodfellow JA, Mackay GA (2019) Autoimmune encephalitis. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* 49:287–294. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2019.407>
6. Husari KS, Dubey D (2019) Autoimmune Epilepsy. *Neurotherapeutics* 16:685–702. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00750-3>
7. Irani SR, Alexander S, Waters P, et al (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>
8. Irani SR, Mitchell AW, Lang B, et al (2011) Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Annals of Neurology* 69:892–900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307>
9. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, et al (2010) Investigation of LGI1 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)
10. Navarro V, Kas A, Apartis E, et al (2016) Motor cortex and hippocampus are the two main cortical targets in LGI1-antibody encephalitis. *Brain* 139:1079–1093. <https://doi.org/10.1093/brain/aww012>
 11. Pakozdy A, Patzl M, Zimmermann L, et al (2015) LGI Proteins and Epilepsy in Human and Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:997–1005. <https://doi.org/10.1111/jvim.12610>
 12. Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK (1998) A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 17:2873–2881. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202481>
 13. Krex D, Hauses M, Appelt H, et al (2002) Physical and functional characterization of the human LGI1 gene and its possible role in glioma development. *Acta Neuropathol* 103:255–266. <https://doi.org/10.1007/s004010100463>
 14. Besleaga R, Montesinos-Rongen M, Perez-Tur J, et al (2003) Expression of the LGI1 gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression. *Virchows Archiv* 443:561–564. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0874-3>
 15. Kunapuli P, Chitta KS, Cowell JK (2003) Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene* 22:3985–3991. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206584>
 16. Kunapuli P, Kasyapa CS, Hawthorn L, Cowell JK (2004) LGI1, a Putative Tumor Metastasis Suppressor Gene, Controls in Vitro Invasiveness and Expression of Matrix Metalloproteinases in Glioma Cells through the ERK1/2 Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279:23151–23157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314192200>
 17. Gabellini Nadia, Masola V, Quartesan S, et al (2006) Increased expression of LGI1 gene triggers growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 207:711–721. <https://doi.org/10.1002/jcp.20627>
 18. Piepoli T, Jakupoglu C, Gu W, et al (2006) Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro-Oncology* 8:96–108. <https://doi.org/10.1215/15228517-2005-006>
 19. Gu W, Brodtkorb E, Piepoli T, et al (2005) LGI1: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics* 6:59–66. <https://doi.org/10.1007/s10048-005-0216-5>
 20. Gadoth A, Pittock SJ, Dubey D, et al (2017) Expanded phenotypes and outcomes among 256 LGI1/CASPR2-IgG-positive patients. *Ann Neurol* 82:79–92. <https://doi.org/10.1002/ana.24979>

21. Somerville RPT, Chernova O, Liu S, et al (2000) Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGI1. *Mammalian Genome* 11:622–627. <https://doi.org/10.1007/s0033500101280>
22. Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, et al (2007) Absence of mutations in the LGI1 receptor ADAM22 gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsy Research* 76:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.06.014>
23. de Bellescize J, Boutry N, Chabrol E, et al (2009) A novel three base-pair LGI1 deletion leading to loss of function in a family with autosomal dominant lateral temporal epilepsy and migraine-like episodes. *Epilepsy Research* 85:118–122. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.02.007>
24. Head K, Gong S, Joseph S, et al (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>
25. Gu W, Wevers A, Schröder H, et al (2002) The LGI1 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)
26. Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, et al (2018) Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nat Commun* 9:1546. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03947-w>
27. Scheel H (2002) A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Human Molecular Genetics* 11:1757–1762. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.15.1757>
28. Staub E, Pérez-Tur J, Siebert R, et al (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)
29. Leonardi E, Andreatza S, Vanin S, et al (2011) A Computational Model of the LGI1 Protein Suggests a Common Binding Site for ADAM Proteins. *PLoS ONE* 6:e18142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018142>
30. Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11:725–732. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(01)00266-4)
31. Silva J, Wang G, Cowell JK (2011) The temporal and spatial expression pattern of the LGI1 epilepsy predisposition gene during mouse embryonic cranial development. *BMC Neurosci* 12:43. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-43>
32. Boillot M, Huneau C, Marsan E, et al (2014) Glutamatergic neuron-targeted loss of LGI1 epilepsy gene results in seizures. *Brain* 137:2984–2996. <https://doi.org/10.1093/brain/awu259>

33. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, et al (2013) Autoantibodies to Epilepsy-Related LGI1 in Limbic Encephalitis Neutralize LGI1-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience* 33:18161–18174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013>
34. Kornau H, Kreye J, Stumpf A, et al (2020) Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGI1 Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *Ann Neurol* 87:405–418. <https://doi.org/10.1002/ana.25666>
35. Morante-Redolat JM (2002) Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Human Molecular Genetics* 11:1119–1128. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1119>
36. Furlan S, Roncaroli F, Forner F, et al (2006) The LGI1/Epitempin gene encodes two protein isoforms differentially expressed in human brain. *J Neurochem* 98:985–991. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03939.x>
37. Xie Y-J, Zhou L, Wang Y, et al (2018) Leucine-Rich Glioma Inactivated 1 Promotes Oligodendrocyte Differentiation and Myelination via TSC-mTOR Signaling. *Front Mol Neurosci* 11:231. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00231>
38. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, et al (2002) Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30:335–341. <https://doi.org/10.1038/ng832>
39. Herranz-Pérez V, Olucha-Bordonau FE, Morante-Redolat JM, Pérez-Tur J (2010) Regional distribution of the leucine-rich glioma inactivated (LGI) gene family transcripts in the adult mouse brain. *Brain Research* 1307:177–194. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.013>
40. Smedfors G, Olson L, Karlsson TE (2018) A Nogo-Like Signaling Perspective from Birth to Adulthood and in Old Age: Brain Expression Patterns of Ligands, Receptors and Modulators. *Front Mol Neurosci* 11:42. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00042>
41. Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, et al (2015) The LGI1–ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E4129–E4137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511910112>
42. Boillot M, Lee C-Y, Allene C, et al (2016) LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. *Sci Rep* 6:21769. <https://doi.org/10.1038/srep21769>
43. Fukata Y, Chen X, Chiken S, et al (2021) LGI1–ADAM22–MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2022580118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022580118>

44. Seagar M, Russier M, Caillard O, et al (2017) LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:7719–7724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618656114>
45. Hivert B, Marien L, Agbam KN, 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:. <https://doi.org/10.1242/jcs.219774>
46. Ribeiro PAO, Sbragia L, Gilioli R, et al (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>
47. Chabrol E, Navarro V, Provenzano G, et al (2010) Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice. *Brain* 133:2749–2762. <https://doi.org/10.1093/brain/awq171>
48. Thomas R, Favell K, Morante-Redolat J, et al (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>
49. Kusuzawa S, Honda T, Fukata Y, et al (2012) Leucine-rich glioma inactivated 1 (Lgi1), an epilepsy-related secreted protein, has a nuclear localization signal and localizes to both the cytoplasm and the nucleus of the caudal ganglionic eminence neurons: Nuclear translocation of Lgi1. *European Journal of Neuroscience* 36:2284–2292. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08129.x>
50. Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, et al (2010) Disruption of LGI1–linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3799–3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914537107>
51. Gödde NJ, D’Abaco GM, Paradiso L, Novak U (2006) Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 protein family members. *J Cell Sci* 119:3296–3305. <https://doi.org/10.1242/jcs.03065>
52. Yu YE, Wen L, Silva J, et al (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>
53. Kole MJ, Qian J, Waase MP, et al (2015) Selective Loss of Presynaptic Potassium Channel Clusters at the Cerebellar Basket Cell Terminal Pinceau in Adam11 Mutants Reveals Their Role in Ephaptic Control of Purkinje Cell Firing. *Journal of Neuroscience* 35:11433–11444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1346-15.2015>
54. Sagane K, Hayakawa K, Kai J, et al (2005) Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neuroscience* 6:33. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-33>

55. Owuor K, Harel NY, Englot DJ, et al (2009) LGI1-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>
56. Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, et al (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)
57. Brew HM, Gittelmann JX, Silverstein RS, et al (2007) Seizures and Reduced Life Span in Mice Lacking the Potassium Channel Subunit Kv1.2, but Hypoexcitability and Enlarged Kv1 Currents in Auditory Neurons. *Journal of Neurophysiology* 98:1501–1525. <https://doi.org/10.1152/jn.00640.2006>
58. Edwards D, Handsley M, Pennington C (2008) The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine* 29:258–289. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>
59. Sagane K, Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I (1999) Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23 k. 8
60. Liu H, Shim AHR, He X (2009) Structural Characterization of the Ectodomain of a Disintegrin and Metalloproteinase-22 (ADAM22), a Neural Adhesion Receptor Instead of Metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* 284:29077–29086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014258>
61. El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, et al (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364–1368
62. Yokoi N, Fukata Y, Kase D, et al (2015) Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat Med* 21:19–26. <https://doi.org/10.1038/nm.3759>
63. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409:341–346. <https://doi.org/10.1038/35053072>
64. Thomas RA, Gibon J, Chen CXQ, et al (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>
65. Schulte U, Thumfart J-O, Klöcker N, et al (2006) The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron* 49:697–706. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.033>
66. Savtchenko LP, Rusakov DA (2007) The optimal height of the synaptic cleft. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1823–1828. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606636104>
67. Silva J, Sharma S, Cowell JK (2015) Homozygous Deletion of the LGI1 Gene in Mice Leads to Developmental Abnormalities Resulting in Cortical Dysplasia:

- Loss of LGI1 Leads to Cortical Dysplasia. *Brain Pathology* 25:587–597. <https://doi.org/10.1111/bpa.12225>
68. Silva J, Qin H, Cowell JK (2019) Selective inactivation of LGI1 in neuronal precursor cells leads to cortical dysplasia in mice. *genesis* 57:e23268. <https://doi.org/10.1002/dvg.23268>
 69. Xie Y-J, Zhou L, Jiang N, et al (2015) Essential roles of leucine-rich glioma inactivated 1 in the development of embryonic and postnatal cerebellum. *Sci Rep* 5:7827. <https://doi.org/10.1038/srep07827>
 70. Wills ZP, Mandel-Brehm C, Mardinly AR, et al (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>
 71. Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1:173–180. <https://doi.org/10.1038/35044547>
 72. Silva J, Sharma S, Hughes B, et al (2010) Homozygous inactivation of the *LGI1* gene results in hypomyelination in the peripheral and central nervous systems: Hypomyelination in *LGI1* Null Mice. *J Neurosci Res* 88:3328–3336. <https://doi.org/10.1002/jnr.22496>
 73. Lebrun-Julien F, Bachmann L, Norrmén C, et al (2014) Balanced mTORC1 activity in oligodendrocytes is required for accurate CNS myelination. *J Neurosci* 34:8432–8448. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1105-14.2014>
 74. Ovsepian SV, LeBerre M, Steuber V, et al (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>
 75. Dodson PD, Forsythe ID (2004) Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends in Neurosciences* 27:210–217. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.02.012>
 76. Trimmer JS (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>
 77. Guan D, Lee JCF, Tkatch T, et al (2006) Expression and biophysical properties of Kv1 channels in supragranular neocortical pyramidal neurones. *J Physiol* 571:371–389. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097006>
 78. Guan D, Lee JCF, Higgs MH, et al (2007) Functional roles of Kv1 channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 97:1931–1940. <https://doi.org/10.1152/jn.00933.2006>
 79. Cudmore RH, 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>

80. Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419:35–42. <https://doi.org/10.1038/nature00978>
81. Ovsepian SV, Steuber V, Le Berre M, et al (2013) A defined heteromeric K_v 1 channel stabilizes the intrinsic pacemaking and regulates the output of deep cerebellar nuclear neurons to thalamic targets: K_v 1 channel governs cerebellar output to thalamus. *The Journal of Physiology* 591:1771–1791. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.249706>
82. Guan D, Pathak D, Foehring RC (2018) Functional roles of Kv1-mediated currents in genetically identified subtypes of pyramidal neurons in layer 5 of mouse somatosensory cortex. *Journal of Neurophysiology* 120:394–408. <https://doi.org/10.1152/jn.00691.2017>
83. Wang FC, Bell N, Reid P, et al (1999) Identification of residues in dendrotoxin K responsible for its discrimination between neuronal K⁺ channels containing Kv1.1 and 1.2 alpha subunits. *Eur J Biochem* 263:222–229. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00494.x>
84. Harvey AL, Robertson B (2004) Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. *CMC* 11:3065–3072. <https://doi.org/10.2174/0929867043363820>
85. Zhou L, Zhou L, Su L, et al (2018) Celecoxib Ameliorates Seizure Susceptibility in Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *J Neurosci* 38:3346–3357. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3245-17.2018>
86. Lancaster E, Burnor E, Zhang J, Lancaster E (2019) ADAM23 is a negative regulator of Kv1.1/Kv1.4 potassium currents. *Neuroscience Letters* 704:159–163. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.012>
87. Henley JM, Nair JD, Seager R, et al (2021) Kainate and AMPA receptors in epilepsy: Cell biology, signalling pathways and possible crosstalk. *Neuropharmacology* 195:108569. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108569>
88. Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, et al (2002) Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13902–13907. <https://doi.org/10.1073/pnas.172511199>
89. von Ossowski L, Tossavainen H, von Ossowski I, et al (2006) Peptide binding and NMR analysis of the interaction between SAP97 PDZ2 and GluR-A: potential involvement of a disulfide bond. *Biochemistry* 45:5567–5575. <https://doi.org/10.1021/bi0511989>
90. Ottman R, Risch N, Hauser WA, et al (1995) Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet* 10:56–60. <https://doi.org/10.1038/ng0595-56>
91. Dazzo E, Fanciulli M, Serioli E, et al (2015) Heterozygous Reelin Mutations Cause Autosomal-Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *The American Journal of Human Genetics* 96:992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.020>

92. Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, et al (2003) Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: Clinical Spectrum, New Epitempin Mutations, and Genetic Heterogeneity in Seven European Families: FAMILIAL LATERAL TEMPORAL EPILEPSY. *Epilepsia* 44:1289–1297. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.20003.x>
93. Michelucci R, Pasini E, Malacrida S, et al (2013) Low penetrance of autosomal dominant lateral temporal epilepsy in Italian families without *LG11* mutations. *Epilepsia* 54:1288–1297. <https://doi.org/10.1111/epi.12194>
94. Bisulli F, Naldi I, Baldassari S, et al (2014) Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: A new locus on chromosome 19q13.11-q13.31. *Epilepsia* 55:841–848. <https://doi.org/10.1111/epi.12560>
95. Boillot M, Baulac S (2016) Genetic models of focal epilepsies. *J Neurosci Methods* 260:132–143. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.06.003>
96. Yamagata A, Fukai S (2020) Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of *LG11*–*ADAM22*. *Cell Mol Life Sci* 77:267–274. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03269-0>
97. Baulac S, Ishida S, Mashimo T, et al (2012) A rat model for *LG11*-related epilepsies. *Human Molecular Genetics* 21:3546–3557. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds184>
98. Striano P, Busolin G, Santulli L, et al (2011) Familial temporal lobe epilepsy with psychic auras associated with a novel *LG11* mutation. *Neurology* 76:1173–1176. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318212ab2e>
99. Rosanoff MJ, Ottman R (2008) Penetrance of *LG11* mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 71:567–571. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000323926.77565.ee>
100. Nobile C, Michelucci R, Andrezza S, et al (2009) *LG11* mutations in autosomal dominant and sporadic lateral temporal epilepsy. *Hum Mutat* 30:530–536. <https://doi.org/10.1002/humu.20925>
101. Vincent A, Buckley C, Schott JM, et al (2004) Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 127:701–712. <https://doi.org/10.1093/brain/awh077>
102. de Bruijn MAAM, van Sonderen A, van Coevorden-Hameete MH, et al (2019) Evaluation of seizure treatment in anti-*LG11*, anti-NMDAR, and anti-GABA_B R encephalitis. *Neurology* 92:e2185–e2196. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007475>
103. Shen C, Fang G, Yang F, et al (2020) Seizures and risk of epilepsy in anti-NMDAR, anti-*LG11*, and anti-GABABR encephalitis. *Ann Clin Transl Neurol* 7:1392–1399. <https://doi.org/10.1002/acn3.51137>

104. Ilyas-Feldmann M, Prüß H, Holtkamp M (2021) Long-term seizure outcome and antiseizure medication use in autoimmune encephalitis. *Seizure* 86:138–143. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.02.010>
105. Qiao S, Wu H-K, Liu L-L, et al (2021) Characteristics and Prognosis of Autoimmune Encephalitis in the East of China: A Multi-Center Study. *Front Neurol* 12:642078. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.642078>
106. Shan W, Yang H, Wang Q (2021) Neuronal Surface Antibody-Medicated Autoimmune Encephalitis (Limbic Encephalitis) in China: A Multiple-Center, Retrospective Study. *Front Immunol* 12:621599. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621599>
107. van Sonderen A, Schreurs MWJ, de Bruijn MAAM, et al (2016) The relevance of VGKC positivity in the absence of LGI1 and Caspr2 antibodies. *Neurology* 86:1692–1699. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002637>
108. Binks SNM, Veldsman M, Easton A, et al (2021) Residual Fatigue and Cognitive Deficits in Patients After Leucine-Rich Glioma-Inactivated 1 Antibody Encephalitis. *JAMA Neurol* 78:617. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.0477>
109. Li T-R, Zhang Y-D, Wang Q, et al (2021) Clinical Characteristics and Long-Term Prognosis of Anti-LGI1 Encephalitis: A Single-Center Cohort Study in Beijing, China. *Front Neurol* 12:674368. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.674368>
110. Lin N, Liu Q, Chen J, et al (2021) Long-term seizure outcomes in patients with anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 encephalitis. *Epilepsy Behav* 122:108159. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108159>
111. Qiao S, Wu H, Liu L, et al (2021) Clinical Features and Long-Term Outcomes of Anti-Leucine-Rich Glioma-Inactivated 1 Encephalitis: A Multi-Center Study. *NDT Volume* 17:203–212. <https://doi.org/10.2147/NDT.S292343>
112. Zhao Q, Sun L, Zhao D, et al (2021) Clinical features of anti-leucine-rich glioma-inactivated 1 encephalitis in northeast China. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 203:106542. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2021.106542>
113. Kim T-J, Lee S-T, Moon J, et al (2017) Anti-LGI1 encephalitis is associated with unique HLA subtypes: HLA Subtypes in Anti-LGI1 Encephalitis. *Ann Neurol* 81:183–192. <https://doi.org/10.1002/ana.24860>
114. van Sonderen A, Roelen DL, Stoop JA, et al (2017) Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4: Anti-LGI1 Encephalitis. *Ann Neurol* 81:193–198. <https://doi.org/10.1002/ana.24858>
115. Binks S, Varley J, Lee W, et al (2018) Distinct HLA associations of LGI1 and CASPR2-antibody diseases. *Brain* 141:2263–2271. <https://doi.org/10.1093/brain/awy109>
116. Muñoz-Castrillo S, Haesebaert J, Thomas L, et al (2021) Clinical and Prognostic Value of Immunogenetic Characteristics in Anti-LGI1 Encephalitis. *Neurol*

- Neuroimmunol Neuroinflamm 8:e974.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000974>
117. Wennberg R, Steriade C, Chen R, Andrade D (2018) Frontal infraslow activity marks the motor spasms of anti-LGI1 encephalitis. *Clinical Neurophysiology* 129:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2017.10.014>
 118. Liu X, Han Y, Yang L, et al (2020) The exploration of the spectrum of motor manifestations of anti-LGI1 encephalitis beyond FBDS. *Seizure* 76:22–27. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.12.023>
 119. Brüggemann N (2021) Contemporary functional neuroanatomy and pathophysiology of dystonia. *J Neural Transm (Vienna)* 128:499–508. <https://doi.org/10.1007/s00702-021-02299-y>
 120. Celicanin M, Blaabjerg M, Maersk-Moller C, et al (2017) Autoimmune encephalitis associated with voltage-gated potassium channels-complex and leucine-rich glioma-inactivated 1 antibodies - a national cohort study. *Eur J Neurol* 24:999–1005. <https://doi.org/10.1111/ene.13324>
 121. Hang H, Zhang J, Chen D, et al (2020) Clinical Characteristics of Cognitive Impairment and 1-Year Outcome in Patients With Anti-LGI1 Antibody Encephalitis. *Front Neurol* 11:852. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00852>
 122. Ramanathan S, Tseng M, Davies AJ, et al LGI1- versus CASPR2-antibody neuropathic pain: clinical and biological comparisons. *Annals of Neurology n/a*: <https://doi.org/10.1002/ana.26189>
 123. van Sonderen A, Thijs RD, Coenders EC, et al (2016) Anti-LGI1 encephalitis: Clinical syndrome and long-term follow-up. *Neurology* 87:1449–1456. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003173>
 124. Chen W, Wang M, Gao L, et al (2021) Neurofunctional outcomes in patients with anti-leucine-rich glioma inactivated 1 encephalitis. *Acta Neurol Scand*. <https://doi.org/10.1111/ane.13503>
 125. Smith KM, Dubey D, Liebo GB, et al (2021) Clinical Course and Features of Seizures Associated With LGI1-Antibody Encephalitis. *Neurology* 10.1212/WNL.0000000000012465. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012465>
 126. Ariño H, Armangué T, Petit-Pedrol M, et al (2016) Anti-LGI1-associated cognitive impairment: Presentation and long-term outcome. *Neurology* 87:759–765. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003009>
 127. Thompson J, Bi M, Murchison AG, et al (2018) The importance of early immunotherapy in patients with faciobrachial dystonic seizures. *Brain* 141:348–356. <https://doi.org/10.1093/brain/awx323>
 128. Bien CG, Bien CI, Dogan Onugoren M, et al (2020) Routine diagnostics for neural antibodies, clinical correlates, treatment and functional outcome. *J Neurol* 267:2101–2114. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09814-3>

129. Koneczny I (2018) A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol* 9:97. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00097>
130. Ramberger M, Berretta A, Tan JMM, et al (2020) Distinctive binding properties of human monoclonal LGI1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain* 143:1731–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa104>
131. González-Burgos I, Velázquez-Zamora DA, Beas-Zárate C (2009) Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. *Int J Dev Neurosci* 27:741–745. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.08.016>
132. Irani SR, Stagg CJ, Schott JM, et al (2013) Faciobrachial dystonic seizures: the influence of immunotherapy on seizure control and prevention of cognitive impairment in a broadening phenotype. *Brain* 136:3151–3162. <https://doi.org/10.1093/brain/awt212>
133. Feyissa AM, Lamb C, Pittock SJ, et al (2018) Antiepileptic drug therapy in autoimmune epilepsy associated with antibodies targeting the leucine-rich glioma-inactivated protein 1. *Epilepsia Open* 3:348–356. <https://doi.org/10.1002/epi4.12226>
134. Petit-Pedrol M, Sell J, Planagumà J, et al (2018) LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awy253>
135. Zhang T-Y, Cai M-T, Zheng Y, et al (2021) Anti-Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor Encephalitis: A Review. *Front Immunol* 12:652820. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.652820>

Figures

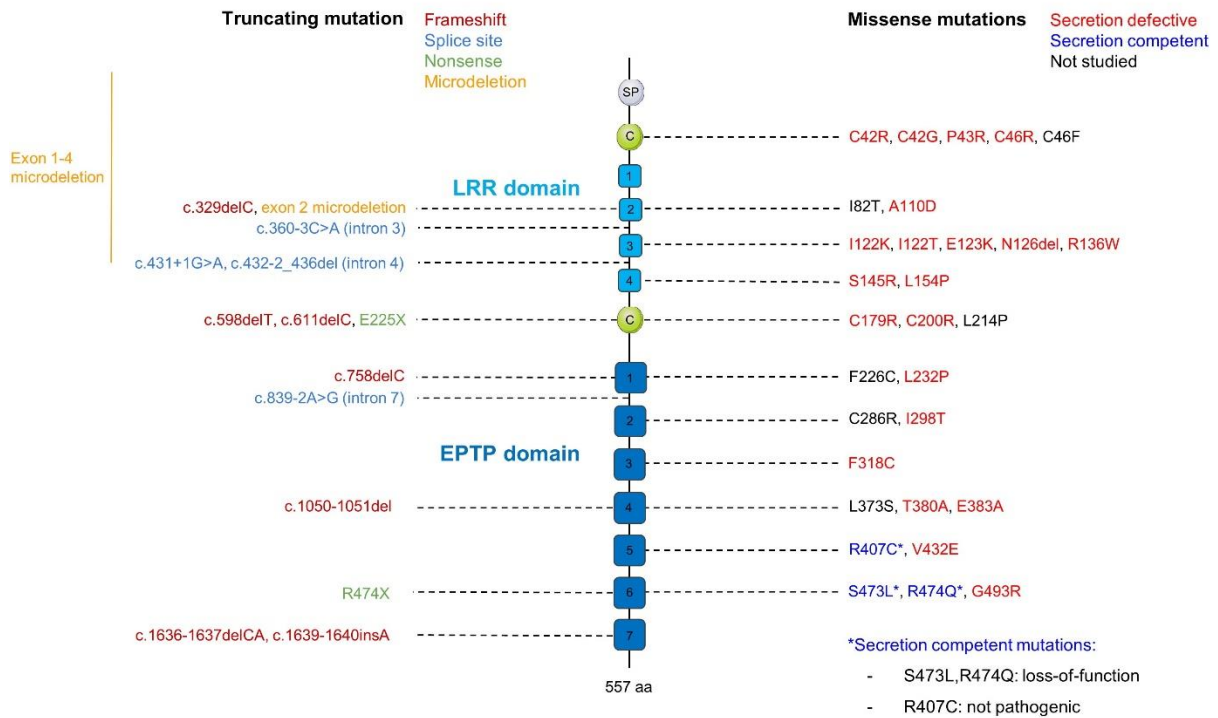


Fig. 1 Domain organization of LGI1 and localization of mutations linked to ADLTE. Mutations are distributed along the whole gene sequence, without domain-preference. The list of mutations was compiled from Boillot and Baulac, 2016 [95] and Yamagata and Fukai, 2020 [96]. SP: signal peptide (cleaved in mature protein); C: cysteine cluster.

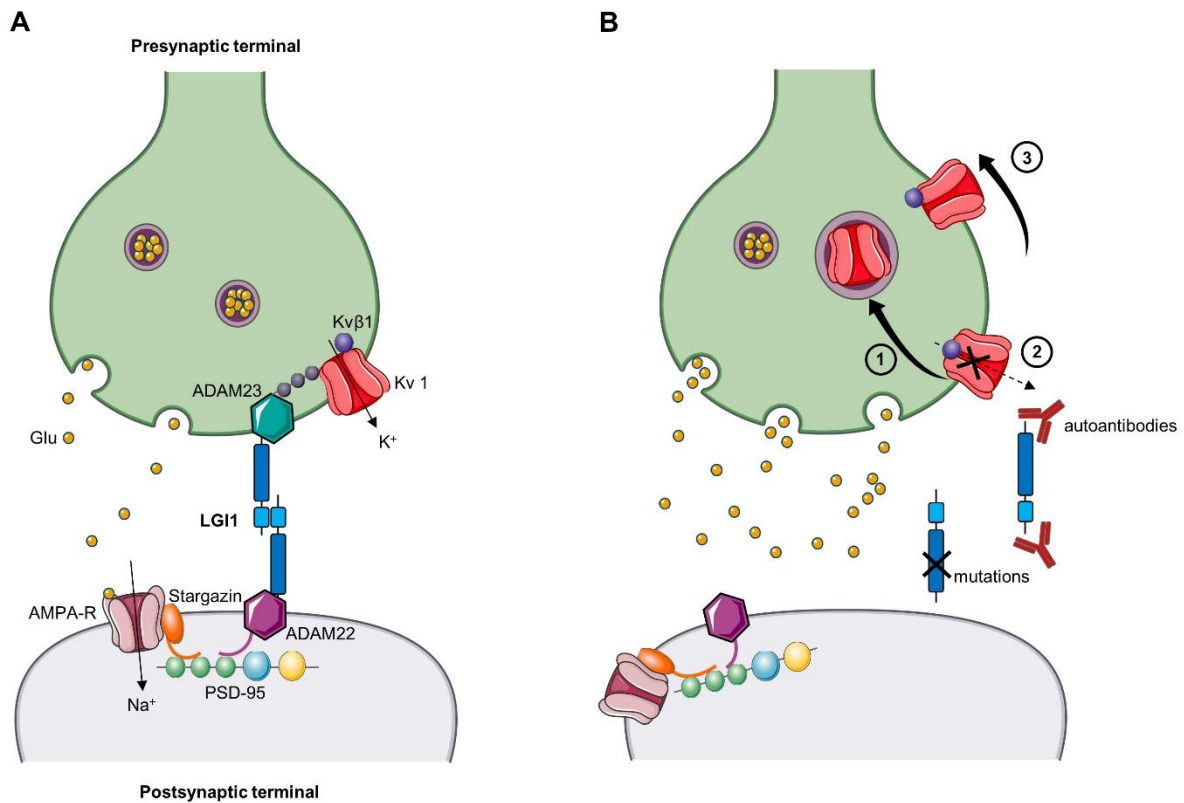


Fig. 2 Synaptic organization of LGI1 and disruption by mutations and autoantibodies. (A) Organization of LGI1 in a trans-synaptic complex with protein partners, and indirect functional interactions with presynaptic Kv1 channels and postsynaptic AMPA-Rs. (B) Pathogenic disruptions of LGI1, either by loss-of-function mutation or by autoantibodies. LGI1 alterations were shown to disrupt both Kv1 channels and AMPA-R expression and function. This could result from (1) internalization of Kv1 channels with their protein complex [130], (2) a decrease in Kv1 current, through fast-inactivation mediated by Kvβ1 [65, 86], (3) removal of Kv1 channels and AMPA-R from the synapse, or decreased expression [44, 85, 130, 134]. The loss of Kv1 currents enhances neurotransmitter release and so increases synaptic glutamate levels. This may be the most promising candidate mechanism linking LGI1 disruption to seizures. We used Servier Medical Art to create the figure.

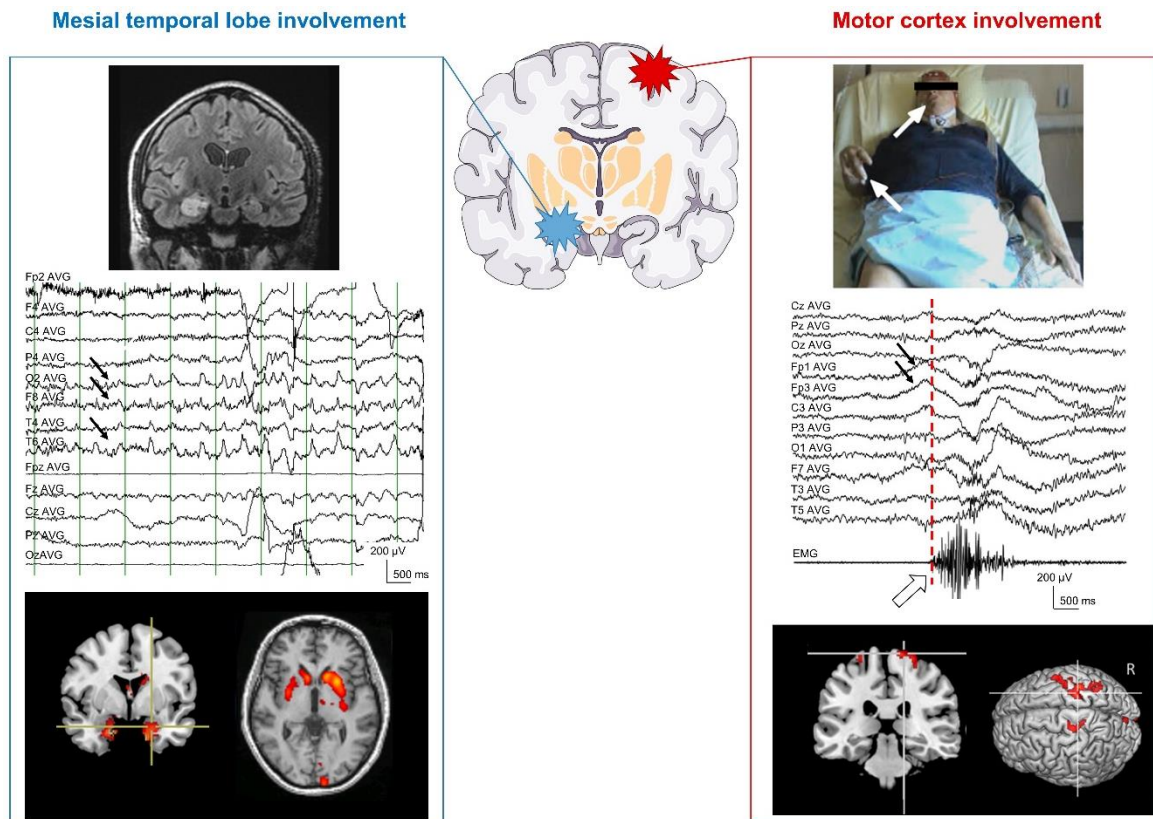


Fig. 3 Two main targets of anti-LGI1 encephalitis: mesial temporal lobe and motor cortex. **Left**, Mesial temporal lobe involvement. Hippocampal hyper-intensity and edema can be found on the brain MRI (top left, coronal FLAIR image), as well as focal temporal lobe seizures on EEG (middle left; arrows indicate the EEG channels involved in the seizure), and hippocampal hypermetabolism on F18-FDG-PET (bottom left; coronal view, superimposed on brain MRI). A striking bilateral striatal hypermetabolism is often detected in anti-LGI1 encephalitis. **Right**, Motor cortex involvement. Tonic-dystonic seizures (TDS) occur as in the top right (tonic contraction of the right hemiface and arm). Concomitant scalp EEG shows a fronto-central slow wave (middle right, black arrows) before the contralateral muscle contraction (white arrow, right arm EMG). F18-FDG-PET (bottom right) shows a hypermetabolism located on the primary motor cortex. F18-FDG-PET figures are reproduced with permission from Navarro et al., 2016 [10].

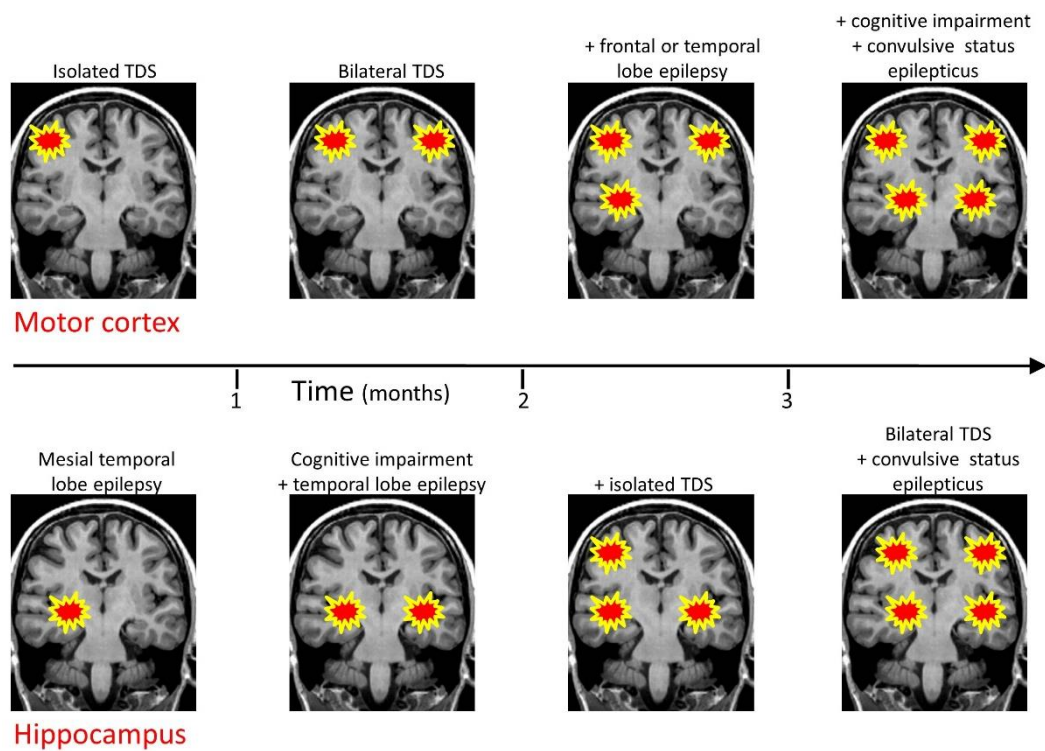


Fig. 4 Natural clinical history of anti-LGI1 encephalitis. At disease onset unilateral motor cortex (unilateral TDS, top left) or mesial temporal lobe (isolated mesial temporal lobe seizure, bottom left) may be equally affected structures. The further evolution is characterized by bilateral involvement, leading to either bilateral TDS, or cognitive disorders and MTLs. Finally, both structures, motor cortex and mesial temporal lobe, may be involved. The figure is reproduced with permission from Navarro et al., 2016 [10].

Duration	Brief motor events around 1 sec
Location	Unilateral hemiface and upper limb (<i>i.e.</i> , FBDS), or unilateral upper and lower limbs, and less frequently the trunk
Lateralization	<ul style="list-style-type: none"> - One side at disease onset. - Later, possibly both sides, usually independently. - 'A bascule' TDS can also occur and consist in seizures affecting on one side then the other one after a few seconds
Type of movement disorders	<ul style="list-style-type: none"> - Tonic component, which mimics epileptic spasms - Dystonic component, which can be seen in the fingers and the hand, sometimes associated with brief automatisms
Consequences	<ul style="list-style-type: none"> - Falls or 'drop attacks' when affecting lower limbs - Vocalization when affecting the head
Consciousness	Rarely associated with a loss of consciousness, but 'classical' seizures from frontal or temporal lobes can emerge after disease progression
Triggers	Sometimes triggered by surprise (ring, etc.), movement or strong (positive or negative) emotions
State of vigilance	Occurring during both awakening and sleep stages
Evolution	Progressive increase in frequency: from 1 TDS per week to 1 TDS every 2-3 min.

Table 1 Main characteristic of TDS in anti-LGI1 AE.

Online Resource 1 Video recordings of TDS in a patient with anti-LGI1 AE.

The patient presented both right and left TDS, as well as some 'à bascule' TDS affecting one side then the other one after a few seconds.

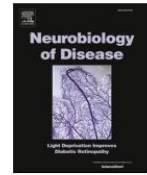
ANNEXE B

**DISTURBANCES OF BRAIN CHOLESTEROL METABOLISM: A
NEW EXCITOTOXIC PROCESS ASSOCIATED WITH STATUS
EPILEPTICUS**



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Disturbances of brain cholesterol metabolism: A new excitotoxic process associated with status epilepticus

Aurélie Hanin^a, Paul Baudin^a, Sophie Demeret^b, Delphine Roussel^a, Sarah Lecas^a,
Elisa Teyssou^a, Maria Damiano^c, David Luis^a, Virginie Lambrecq^{a,c,d}, Valerio Frazzini^{a,c},
Maxens Decavèle^{e,f}, Isabelle Plu^{d,g}, Dominique Bonnefont-Rousselot^{h,i}, Randa Bittar^{h,j,1},
Foudil Lamari^{h,1}, Vincent Navarro^{a,c,d,k,*}, On Behalf of the Study Group²

^a Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, INSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Paris, France

^b AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Department of Neurology, Neuro-ICU, Paris, France

^c AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Epileptology Unit and Clinical Neurophysiology Department, Paris, France

^d Sorbonne Université, 75006 Paris, France

^e Sorbonne Université, INSERM, UMRS1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, 75005 Paris, France

^f AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Pneumologie, Médecine Intensive et Réanimation (Département R3S), Paris, France

^g AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Department of Neuropathology, Paris, France

^h AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Department of Metabolic Biochemistry, Paris, France

ⁱ UTCBS, INSERM U 1267, UMR 8258 CNRS, Université de Paris, Paris, France

^j Sorbonne Université, UMR_S 1166 ICAN, F-75013 Paris, France

^k Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

24-hydroxycholesterol
Cholesterol
Status epilepticus
Excitotoxicity

ABSTRACT

The understanding of the excitotoxic processes associated with a severe status epilepticus (SE) is of major importance.

Changes of brain cholesterol homeostasis is an emerging candidate for excitotoxicity. We conducted an overall analysis of the cholesterol homeostasis both (i) in fluids and tissues from patients with SE: blood (n = 63, n = 87 controls), CSF (n = 32, n = 60 controls), and post-mortem brain tissues (n = 8, n = 8 controls) and (ii) in a mouse model of SE induced by an intrahippocampal injection of kainic acid.

24-hydroxycholesterol levels were decreased in kainic acid mouse hippocampus and in human plasma and post-mortem brain tissues of patients with SE when compared with controls. The decrease of 24-hydroxycholesterol levels was followed by increased cholesterol levels and by an increase of the cholesterol synthesis. Desmosterol levels were higher in human CSF and in mice and human hippocampus after SE. Lanosterol and dihydrolanosterol levels were higher in plasma from SE patients.

Our results suggest that a CYP46A1 inhibition could occur after SE and is followed by a brain cholesterol accumulation. The excess of cholesterol is known to be excitotoxic for neuronal cells and may participate to neurological sequelae observed after SE. This study highlights a new pathophysiological pathway involved in SE excitotoxicity.

1. Introduction

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure (Trinka et al., 2015). In 25% of cases, SE is refractory (RSE) to antiepileptic drugs (AED) and requires anesthetics (Rossetti and

Lowenstein, 2011). The excessive and sustained activation of neurons can induce excitotoxic processes. As a result, patients may present brain atrophy on MRI, especially in hippocampal structures, with subsequent severe neurologic sequelae, such as cognitive disorders (memory impairment) and a further development of epilepsy (Rossetti et al., 2006).

* Corresponding author at: Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, INSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Paris, France.

E-mail address: vincent.navarro@aphp.fr (V. Navarro).

¹ These authors contributed equally to the manuscript.

² Please see the collab authors listed under the study group section.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105346>

Received 14 January 2021; Received in revised form 5 March 2021; Accepted 22 March 2021

Available online 24 March 2021

0969-9961/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Abbreviations

24-OHc	24-hydroxycholesterol	ICU	intensive care unit
25-OHc	25-hydroxycholesterol	KA	kainic acid
ABC	ATP-binding cassette	LDL	Low-density lipoprotein
AED	antiepileptic drug	Lp-PLA2	lipoprotein-associated phospholipase A2
ApoA1	apolipoprotein A1	LXR	Liver X receptor
ApoE	apolipoprotein E	m	male
ARDS	acute respiratory distress syndrome	NORSE	new-onset refractory status epilepticus
BBB	blood-brain barrier	NRSE	non-refractory status epilepticus
CI	confidence intervals	PBS	phosphate-buffered solution
CONT	controls	PSRSE	prolonged super-refractory status epilepticus
EC	esterified cholesterol	RSE	refractory status epilepticus
EPI	epileptic patients	SD	standard deviation
f	female	SE	status epilepticus
FC	free cholesterol	SEM	standard error of the mean
FCONT	functional controls	TC	total cholesterol
HDL-c	HDL-cholesterol	TG	triglycerides
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A	UPLC-MS/MS	ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer

The understanding of the pathophysiological mechanisms underlying the excitotoxic processes is crucial to better manage the SE by identifying new neuroprotective therapeutics and prevent neurological sequelae that may impact the patient's life quality. We focused on an emerging pathway, the brain cholesterol homeostasis (de Freitas et al., 2010). Brain cholesterol plays a major role in brain development, synaptogenesis and neuronal activity by inhibition or potentiation of voltage-dependent and ligand-gated ion channels activity (Björkhem and Meaney, 2004; Dietschy and Turley, 2004; Korinek et al., 2015; Levitan et al., 2014). Brain cholesterol is synthesized *de novo*, mostly by astrocytes through the Bloch pathway and to a lesser extent in neurons through the Kandutsch-Russell pathway (Mitsche et al., 2015; Zhang and Liu, 2015). Then, cholesterol is transported by apolipoprotein E (ApoE) to neurons. Cholesterol can't freely cross the intact blood-brain barrier (BBB) (Dietschy and Turley, 2004). Cholesterol is metabolized into 24-hydroxycholesterol (24-OHc) by the neuron-specific cholesterol-24 hydroxylase enzyme, encoded by the *CYP46A1* gene (Björkhem et al., 1998; Ramirez et al., 2008). In contrast to cholesterol, 24-OHc can be exported across the BBB and regulates the synthesis and the transport of cholesterol by a negative feedback (Leoni and Caccia, 2013).

Disturbances in brain cholesterol homeostasis were reported in neurodegenerative disorders where excitotoxicity plays a major role (Boussicault et al., 2016; Djelti et al., 2015; Martins et al., 2009). Especially, brain cholesterol accumulation, secondary to CYP46A1 downregulation, was found excitotoxic and responsible of neuronal death (Boussicault et al., 2016; Djelti et al., 2015; Martins et al., 2009). We also reported that blocking CYP46A1 expression in mouse hippocampus resulted in cholesterol accumulation, secondary epileptic abnormalities and progressive neuronal loss (Chali et al., 2015). These cellular and electrographic changes were similar to those observed: (i) in patients who presented with a RSE after the control of the SE and (ii) in animal models of SE two weeks after the induction of SE by kainic acid (KA). It suggests that disturbances in brain cholesterol homeostasis may occur during SE and participate to the excitotoxic processes. Especially, we wondered if a CYP46A1 inhibition may occur during SE, and be followed by a decrease of 24-OHc levels and accumulation of cholesterol.

Preliminary data on changes of sterol levels in rodents treated by KA are conflicting (Chali et al., 2019; Heverin et al., 2012; Kim et al., 2010; Ong et al., 2010). This may be explained by the large variabilities in methodological processes: different time point assessments and different anatomical sources. The relation between brain and peripheral compartments were rarely studied. To date, the brain cholesterol

homeostasis has never been explored in SE patients.

For the first time we aim to characterize the changes in sterol levels both in SE patients and in KA mouse model of SE. To study the kinetic changes, we evaluated sterol levels at different time points after SE onset. In addition, to assess the relationship between the brain and the peripheral compartments, we performed analysis in blood, CSF and brain tissues.

Firstly, we investigated if a CYP46A1 inhibition occurs after SE and if it is followed by a decrease of 24-OHc levels.

Secondly, as 24-OHc regulates cholesterol synthesis, we studied the impact of decreased 24-OHc levels on brain and peripheral cholesterol synthesis.

Thirdly, we studied several ways of exchange between the brain and the peripheral compartments, such as blood-brain barrier permeability, and lipid transport.

2. Materials and methods

2.1. Human fluid study

2.1.1. Study design, settings and participants

We prospectively enrolled both men and women patients from intensive care unit (ICU) and neurology units of Pitié-Salpêtrière Hospital, from February 2013 to May 2019. The protocol was approved by our local (2012, CPP Paris-VI) and by the INSERM ethic committees (C16-16, 20152482). Patients or relatives were informed and no one has opposed. The study design and report are in accordance with the STROBE statement (Cuschieri, 2019).

We included patients aged of 16 years or over and admitted to ICU with an ongoing SE. SE was diagnosed according to the International League Against Epilepsy (Trinka and Kälviäinen, 2017). Patients with post-anoxic SE or with an associated neurodegenerative disease were excluded. SE patients were divided into three groups: non-refractory status epilepticus (NRSE), refractory status epilepticus (RSE) and prolonged super refractory status epilepticus (PSRSE) (Hirsch et al., 2018). RSE is defined as a failure of at least two appropriately selected and dosed parenteral medications including a benzodiazepine, with no specific seizure duration required (Hirsch et al., 2018). PSRSE is defined as a RSE that persists for at least 7 days, including ongoing need for anesthetics (Hirsch et al., 2018).

We included control patients (CONT), who were hospitalized in neurology units of Pitié-Salpêtrière Hospital, aged of 16 years or over. They were divided into two groups: (i) *functional* controls (FCONT) if

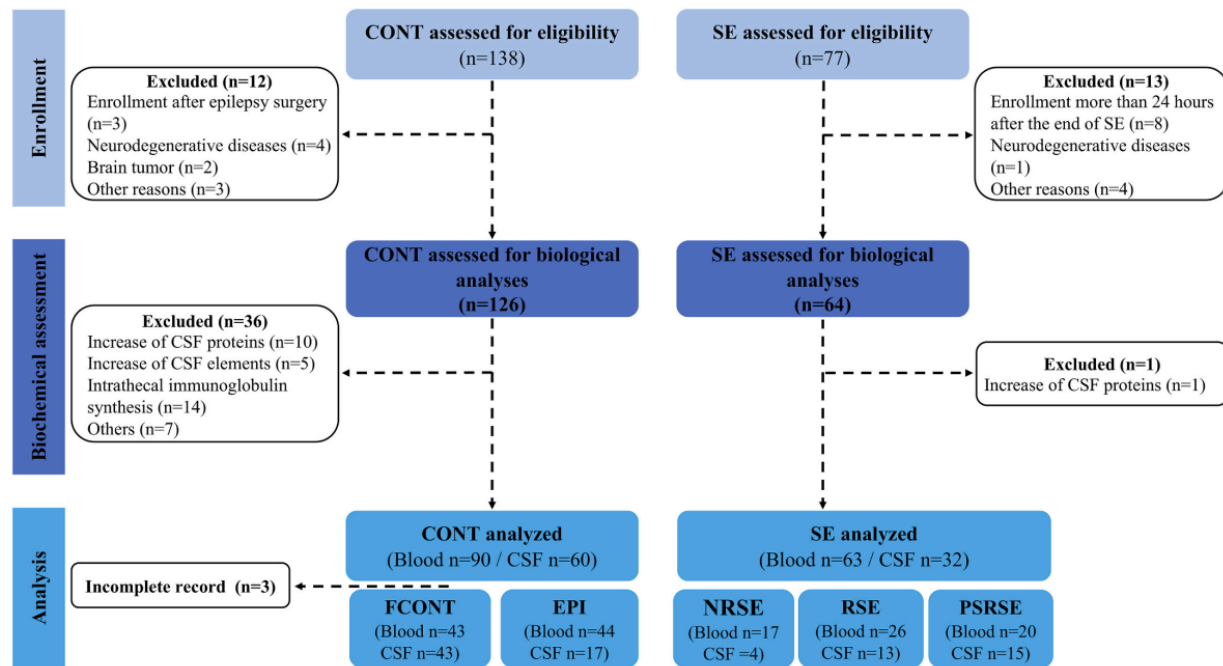


Fig. 1. Flow chart of the study population.

they had functional neurological disorder, based on normality of clinical examination and lumbar puncture, and (ii) *epileptic controls* (EPI) including patients with epilepsy but no SE. Patients with a neurodegenerative disease were also excluded.

2.1.2. Variables

The primary objective was to characterize the cholesterol homeostasis disturbances related to SE with regards to blood, CSF and brain tissues. Venous blood and CSF samples were drawn to measure lipid parameters, hydroxycholesterols, FC and cholesterol synthesis precursors levels with protocols described below. Analyses were performed on blood from 63 SE patients and 87 CONT. Lumbar punctures were only done for diagnostic purpose and concerned 32 SE patients and 60 CONT (Fig. 1).

2.1.3. Study size

This is the first human study conducted to evaluate brain cholesterol homeostasis disturbances induced by SE. Nevertheless, on the basis of animal literature, we estimated that SE patients were four times more likely to present disturbances in lipid homeostasis (OR = 4) and those disturbances could be observed in 10% of control patients. Therefore, a total sample size of 136 participants was required for the study ($\alpha = 5\%$, $\beta = 20\%$). An interim analysis showed a higher rate of the endpoint than expected (OR = 4.5), which reduced the required sample size to 112 participants.

2.2. Human tissues extract

Post-mortem human frozen samples and paraffin tissues of hippocampus, lateral temporal cortex and frontal cortex were obtained from eight controls with no history of acute neurological or psychiatric disorders (delay post death = 33 h), and eight patients with SE diagnosed clinically or based on EEG (delay post death = 48 h). The Table 1 gives patient's gender and age, delay of examination post death, cause of death and which frozen and/or paraffin tissues were available for each patient.

2.3. Mouse model of epilepsy

All experimental studies were performed in accordance with the European Committee Council Directive (2010/63/UE) and approved by the local ethics committee (A75-13-19; 8302-2017). Experiments were performed on C57BL/6 J male mice, aged of 2 months of age and weighing 20–25 g ($n = 99$).

2.3.1. Kainate injection and intracranial surgery

Mice were anesthetized with 2–4% isoflurane performed with analgesia (Buprecare) and placed in a stereotaxic frame. Kainic acid (KA, 50 nL; 20 mM in PBS) or phosphate-buffered-solution (PBS, 50 nL) for control mice, were injected into the right hippocampus (anterior-posterior, -1.8 mm; medio-lateral, -1.8 mm; dorso-ventral, -1.8 mm, with respect to the bregma). This site corresponds to distal dendritic regions of CA1 pyramidal cells (Le Duigou et al., 2008). After injection, 7 mice (2 PBS, 5 KA) were directly implanted with two bipolar stainless-steel electrodes inserted respectively into the right and left hippocampus. A reference electrode was placed on the cerebellum of each mouse. All coordinates were derived and adjusted from Paxinos and Watson mice brain atlas (Paxinos et al., 1985).

2.3.2. Video-EEG recordings

Implanted mice were freely moving and connected to an ADC amplifier, part of a video-EEG acquisition system (Deltamed, Natus). EEG signals were acquired at 4096 Hz and band pass filtered (0.5–70 Hz). Continuous video-EEG recordings were performed during 72 h after surgery, then at 6–7 days and at 14–15 days after surgery. Signal analyses were achieved using Deltamed software.

2.3.3. Mice brain tissues preparation

Animals were euthanized, at 1, 3, 7 or 15 days after KA-injection or PBS-injection, by an intraperitoneal injection of pentobarbital. For biochemical analyses, ipsi- and contralateral hippocampus ($n = 26$ KA-injected mice and $n = 26$ PBS-injected mice; 6 mice per group at 3 and 7 days and 7 mice per group at 1 and 15 days) were dissected. For

Table 1
Clinical data from post-mortem patients.

Patient: gender, age,	Group	Delay of brain examination post death, hours	Frozen tissues	Paraffin tissues	SE etiology	Cause of death	Prior history of epilepsy (Yes/No)	SE duration, days
1. m, 60	Control	18	Frontal Ctx Temporal Ctx	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	Hemorrhagic shock	No	–
2. f, 66	Control	54	Frontal Ctx Temporal Ctx	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	Multiorgan failure	No	–
3. f, 66	Control	36	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	Pulmonary emboli	No	–
4. m, 66	Control	26	Frontal Ctx Temporal Ctx	–	–	Septic shock	No	–
5. m, 55	Control	48	Frontal Ctx Temporal Ctx	–	–	ARDS	No	–
6. f, 29	Control	32	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	–	Septic Shock	No	–
7. m, 85	Control	Not precised	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	–	Exacerbation of diabetes	No	–
8. f, 46	Control	17	Frontal Ctx Temporal Ctx	–	–	Multiorgan failure	Yes	–
1. m, 31	SE	22	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	Withdrawal of life sustaining therapy	No	106
2. f, 27	SE	22	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	Frontal Ctx Hippocampus	NORSE	Multiorgan failure	No	9
3. m, 70	SE	74	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	Not available	No	55
4. f, 56	SE	46	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	AED withdrawal	Multiorgan failure	Yes	44
5. f, 39	SE	67	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	NORSE / Septic Shock	No	34
6. f, 41	SE	70	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	Not available	No	14
7. m, 29	SE	Not precised	–	Ammon's horn	Alcohol induced	Septic Shock	Yes	13
8. f, 70	SE	36	–	Frontal Ctx Hippocampus	Unknown	Pulmonary emboli	Yes	17

Abbreviations: AED = antiepileptic drug; ARDS = Acute Respiratory Distress Syndrome; f = female; m = male; NORSE = New-Onset Refractory Status Epilepticus; SE = status epilepticus.

immunohistochemistry studies, mice (n = 20 KA-injected mice and n = 20 PBS-injected mice; 5 mice per group, per time) were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde.

2.4. Histology and immunohistochemistry

Mouse and human post-mortem brain slices were washed in PBS, and exposed to citrate buffer and Triton. Primary antibodies were applied overnight at 4 °C (NeuN, 1:500, MAB377 Merck-Millipore; CYP46A1, 1:500, ab82814 abcam). Secondary antibodies were applied for 1-h at room temperature (Alexa fluor-555-donkey-anti-mouse, 1:500 for NeuN; Alexa fluor-488-donkey-anti-rabbit, 1:500 for CYP46A1). Images were acquired with Zen software (Zeiss) and fluorescence intensities were quantified using ImageJ software (NIH).

2.5. Biochemical analyses for hydroxycholesterols and cholesterol precursors

Human and mouse tissues were put in an HEPES buffer and homogenized. Homogenates were centrifuged and supernatants were collected. Sterol concentrations were normalized by total protein concentration, evaluated by the bicinchoninic acid assay (Sigma-Aldrich).

An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) with isotopic dilution method was used to measure hydroxycholesterols (24-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol) in plasma, CSF and homogenate brain tissues (Marelli et al., 2018). A similar protocol was applied for sterols (cholesterol, lanosterol, dihydrolanosterol and desmosterol) measurements, with an incubation at room temperature during 45-min.

We measured sitosterol levels, by UPLC-MS/MS, to assess BBB permeability. Sitosterol is a plant sterol only provided via food uptake which was proposed to reflect BBB integrity (Heverin et al., 2004; Saeed et al., 2015).

2.6. Lipid parameters

Venous blood samples were collected and centrifuged to obtain serum. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), HDL-cholesterol (HDL-c) were analyzed by enzymatic methods and apolipoprotein A1 (ApoA1) and apolipoprotein B100 (ApoB) by immunoturbidimetric method on Cobas analyzer (Roche). Free cholesterol (FC) was analyzed by colorimetric method on Konelab 30i analyzer (Thermo Fisher Scientific). Esterified cholesterol (EC) was calculated by difference (EC = TC-FC). Apolipoprotein E (ApoE) was measured by immunonephelometric

Table 2
Biological and demographic characteristics of the study cohort.

	SE	NRSE	RSE	PSRSE	CONT patients	FCONT	EPI
Blood, N (%)	63	17 (27%)	26 (41%)	20 (32%)	87	43 (49%)	44 (51%)
Age, years [CI 95%]	50.3 [45.6–54.9]	59.1 [51.6–66.7]	50.2 [42.7–57.7]	42.8 [34.0–51.6]	46.3 [42.2–50.3]	53.7 [47.5–60.0]	39.0 [34.7–43.2]
Sex (m/f %)	63	71	73	45	41	47	36
ASAT/ALAT, AU [CI 95%]	1.59 [1.24–1.94]	2.40 [1.23–3.56]	1.49 [0.99–1.98]	1.14 [0.96–1.32]	1.26 [1.11–1.41]	1.17 [0.99–1.34]	1.40 [1.13–1.67]
Creatinine, µmol/L [CI 95%]	72.3 [56.6–87.9]	101.4 [46.9–155.7]	65.2 [56.0–74.3]	55.6 [42.8–68.4]	71.2 [66.9–75.5]	71.5 [66.0–77.0]	70.8 [63.4–78.1]
24-OHc, µg/L [CI 95%]	37.2 [32.5–41.9]	28.4 [23.6–33.2]	40.6 [32.7–48.5]	40.2 [30.3–50.2]	44.2 [41.1–47.3]	42.4 [37.9–46.9]	46.0 [41.7–50.3]
25-OHc, µg/L [CI 95%]	23.8 [16.1–31.5]	14.6 [11.0–18.2]	24.9 [17.3–32.5]	30.2 [7.58–52.9]	18.8 [15.5–22.2]	17.7 [12.5–22.8]	20.1 [15.6–24.5]
TC, g/L [CI 95%]	1.59 [1.48–1.71]	1.42 [1.19–1.65]	1.76 [1.58–1.94]	1.53 [1.34–1.72]	1.94 [1.85–2.03]	1.88 [1.74–2.02]	2.00 [1.88–2.12]
FC, g/L [CI 95%]	0.60 [0.54–0.66]	0.50 [0.38–0.63]	0.56 [0.51–0.62]	0.72 [0.57–0.86]	0.57 [0.54–0.59]	0.55 [0.52–0.58]	0.59 [0.55–0.62]
EC, g/L [CI 95%]	1.01 [0.91–1.11]	0.92 [0.75–1.08]	1.22 [1.08–1.36]	0.82 [0.62–1.02]	1.37 [1.30–1.44]	1.29 [1.19–1.38]	1.45 [1.35–1.55]
EC/TC, AU [CI 95%]	0.62 [0.58–0.65]	0.64 [0.60–0.69]	0.68 [0.65–0.70]	0.52 [0.42–0.61]	0.70 [0.70–0.71]	0.70 [0.69–0.71]	0.71 [0.70–0.72]
HDL-c, g/L [CI 95%]	0.37 [0.32–0.42]	0.45 [0.33–0.58]	0.42 [0.35–0.49]	0.23 [0.16–0.29]	0.54 [0.51–0.58]	0.53 [0.48–0.58]	0.56 [0.50–0.61]
TG, g/L [CI 95%]	1.78 [1.39–2.17]	1.25 [0.84–1.65]	1.45 [0.97–1.92]	2.67 [1.72–3.62]	1.26 [1.09–1.44]	1.31 [1.10–1.52]	1.21 [0.93–1.50]
ApoA1, g/L [CI 95%]	1.05 [0.96–1.15]	1.16 [0.92–1.41]	1.16 [1.05–1.26]	0.81 [0.66–0.96]	1.42 [1.36–1.48]	1.39 [1.30–1.47]	1.46 [1.37–1.54]
ApoB, g/L [CI 95%]	0.92 [0.83–1.00]	0.66 [0.53–0.79]	1.00 [0.86–1.13]	1.03 [0.89–1.17]	0.94 [0.89–1.00]	0.90 [0.83–0.97]	0.99 [0.90–1.07]
Lanosterol, µg/L [CI 95%]	42.5 [30.3–54.7]	24.7 [17.7–31.7]	38.5 [25.0–52.1]	61.7 [29.5–94.0]	30.0 [19.9–39.6]	27.7 [14.9–40.5]	31.5 [15.7–47.3]
Dihydrolanosterol, µg/L [CI 95%]	19.0 [13.1–25.0]	12.0 [–1.15–25.1]	13.7 [7.72–19.7]	29.5 [17.1–41.8]	9.99 [8.19–11.8]	9.49 [6.81–12.2]	10.4 [7.90–13.0]
Desmosterol, µg/L [CI 95%]	362.6 [301.8–423.4]	373.4 [132.5–614.3]	358.5 [294.4–422.5]	363.2 [218.2–508.1]	425.9 [358.3–493.4]	461.4 [350.8–572.0]	387.1 [309.2–465.0]
Sitosterol, µg/L [CI 95%]	2309.4 [1154.6–3464.2]	896.2 [–37.4–1829.9]	1018.7 [564.2–1473.1]	5580.8 [2018.7–9142.8]	540.2 [448.9–631.5]	524.0 [379.0–669.0]	558.1 [444.7–617.6]
ApoE, mg/dL [CI 95%]	5.67 [5.00–6.34]	5.00 [3.44–6.55]	4.92 [4.46–5.37]	7.31 [5.82–8.80]	4.37 [4.06–4.68]	4.22 [3.73–4.70]	4.51 [4.11–4.91]
CSF, N (%)	32	4 (12%)	13 (41%)	15 (47%)	60	43 (72%)	17 (28%)
Age, years [CI 95%]	52.5 [45.8–59.2]	57.0 [40.9–73.1]	58.2 [47.5–68.8]	46.4 [35.4–57.4]	51.0 [45.9–56.0]	53.7 [47.5–60.0]	43.9 [35.5–52.4]
Sex (M/F %)	56	100	69	33	45	47	41
24-OHc, µg/L [CI 95%]	1.74 [1.55–1.94]	1.60 [1.04–2.17]	1.72 [1.38–2.05]	1.80 [1.47–2.13]	1.60 [1.49–1.70]	1.61 [1.46–1.75]	1.57 [1.45–1.69]
Cholesterol, mg/L [CI 95%]	2.36 [1.71–3.01]	3.83 [–0.82–8.48]	1.94 [1.35–2.53]	2.44 [1.22–3.66]	1.65 [1.22–2.07]	1.42 [1.01–1.84]	2.19 [1.06–3.32]
Desmosterol, µg/L [CI 95%]	2.38 [2.05–2.70]	2.27 [2.19–2.34]	2.41 [1.95–2.87]	2.37 [1.77–2.97]	1.82 [1.66–1.98]	1.79 [1.60–1.98]	1.89 [1.56–2.21]
Lanosterol, µg/L [CI 95%]	4.19 [0.29–8.09]	<<	1.2	4.69 [0.09–9.30]	2.51 [1.64–3.38]	2.69 [1.59–3.80]	2.06 [0.32–3.79]
Dihydrolanosterol, µg/L [CI 95%]	0.36 [0.09–0.62]	<<	0.31 [0–0.63]	0.39 [–0.18–0.96]	0.36 [0.30–0.43]	0.35 [0.26–0.43]	0.41 [0.28–0.53]
Sitosterol, µg/L [CI 95%]	3.53 [1.00–6.06]	3.30 [–8.14–14.7]	1.21 [0.48–1.95]	5.20 [0.28–10.12]	0.74 [0.52–0.97]	0.69 [0.47–0.90]	0.89 [0.20–1.58]
Sitosterol diffusion CSF/ (blood + CSF), AU [CI 95%]	0.0073 [–0.0016–0.016]	0.0063 [–0.062–0.074]	0.0042 [0–0.0086]	0.011 [–0.013–0.034]	0.0040 [0–0.0073]	0.0044 [0–0.0092]	0.0028 [–0.0062]
ApoE, mg/dL [CI 95%]	0.34 [0.29–0.40]	0.35 [0.04–0.65]	0.32 [0.24–0.39]	0.36 [0.26–0.46]	0.38 [0.34–0.42]	0.40 [0.35–0.45]	0.33 [0.28–0.39]

Data are represented as percentages or mean [CI 95%].

method on BNII analyzer (Siemens).

2.7. ApoE phenotyping

ApoE isoforms were identified with the Hydrigel 18 ApoE Isofocusing (Sebia). A ready-to-use agarose gel containing ampholytes was used to perform a semi-automatic electrophoresis, followed by a specific immunofixation, on Hydrasys2 scan instrument (Bittar et al., 2020). Isoforms bands were compared to specific controls.

2.8. Western-blot analyses

Human post-mortem frozen tissues were homogenized in a Tris buffer, completed with a protease inhibitor and a benzonase nuclease and incubated at 37 °C for 30-min. Sodium dodecyl sulfate was added to 2%. Protein extracts were centrifuged and supernatants protein concentration was evaluated using the bicinchoninic acid assay. Proteins were separated on NuPAGE™ Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific) and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (PRO-TAN™, Whatman GmbH). Primary antibody against CYP46A1 (1:1000) was applied over 3-h and secondary antibody (1:5000) over 1-h at room

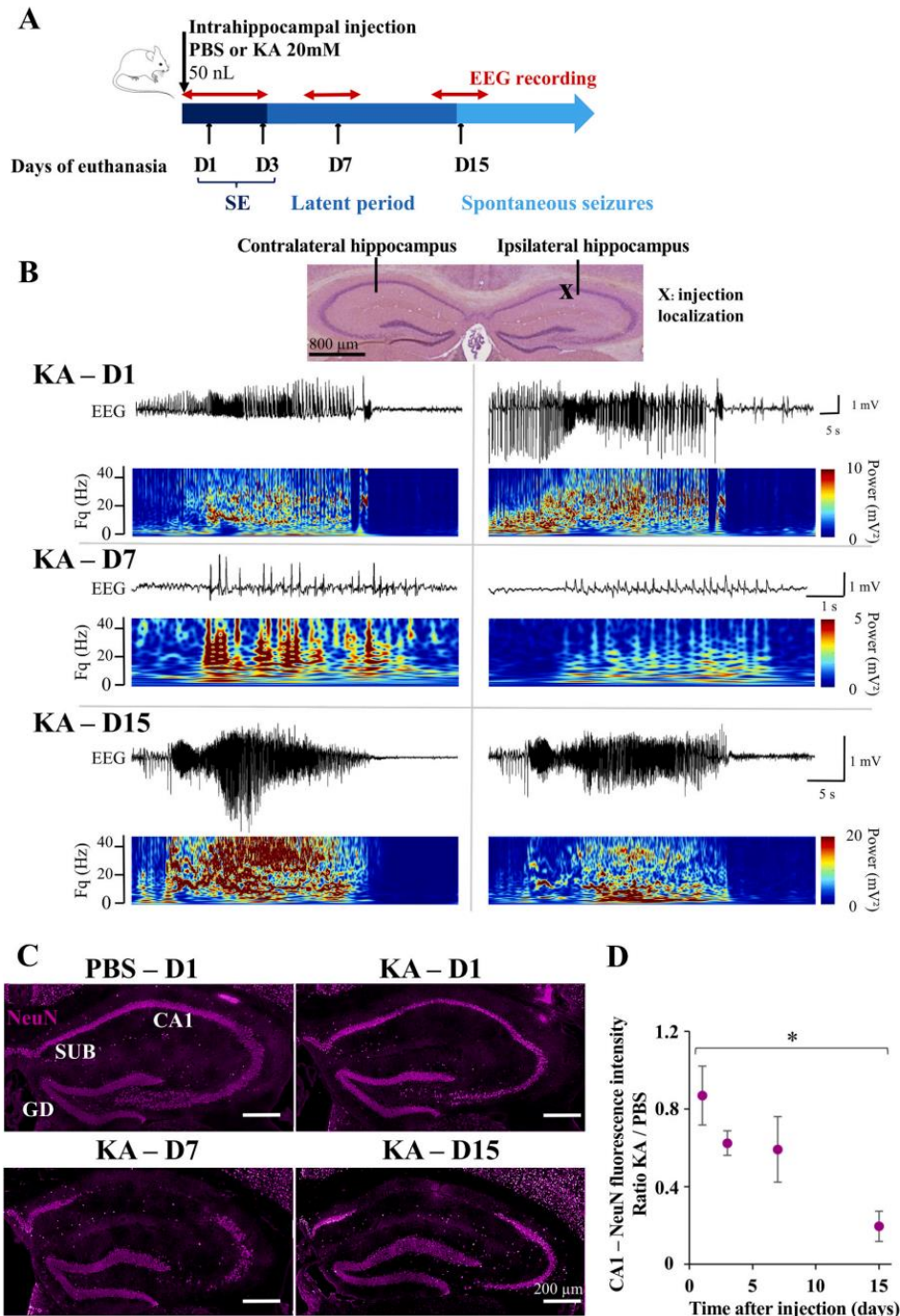
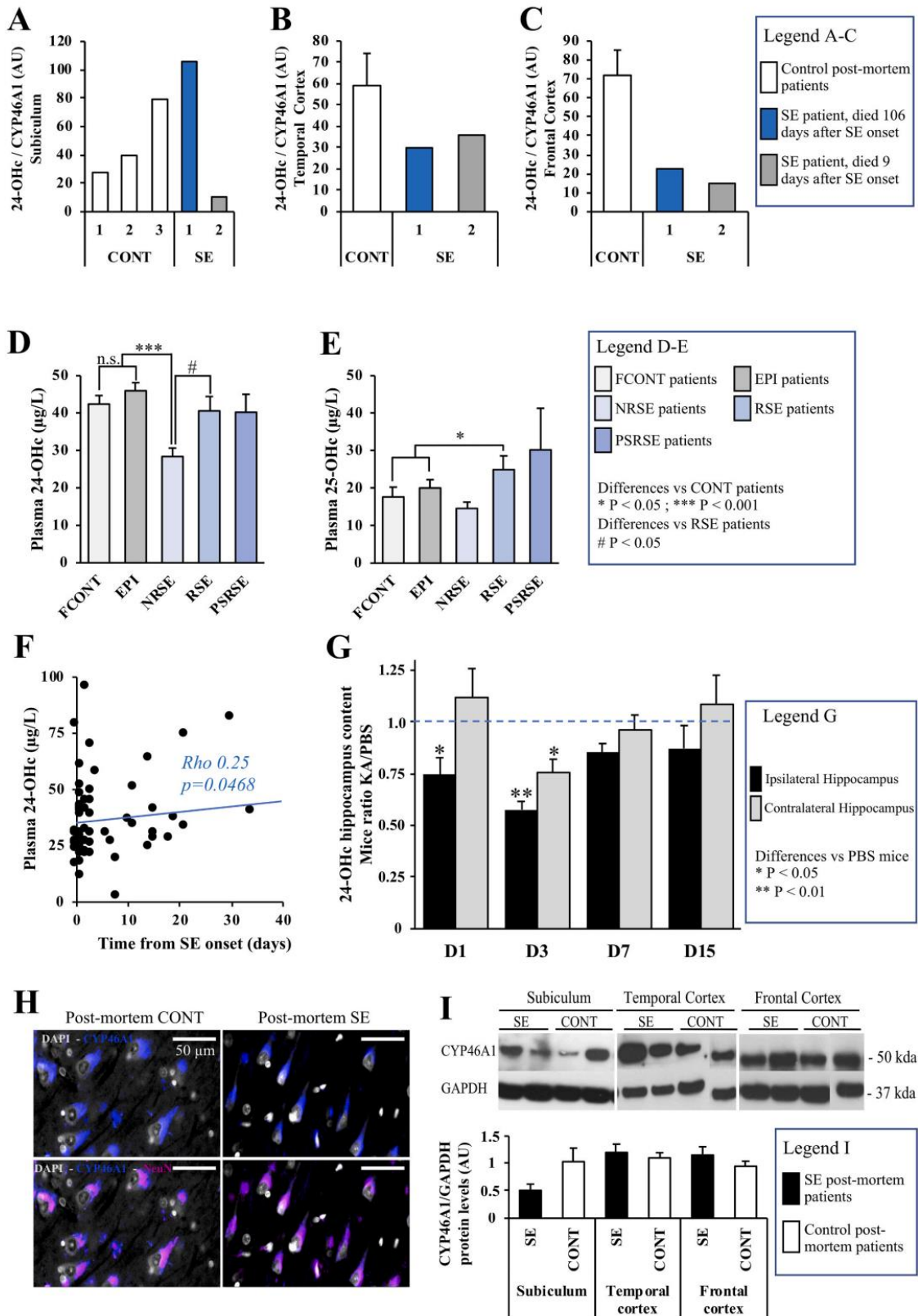


Fig. 2. Time course of epileptic activities and neuronal death after kainate injection.

(A) KA injection is followed by three periods: SE for 3 days, a latent period, and emergence of spontaneous seizures at 15 days. Mice were euthanized 1, 3, 7 or 15 days after injection. (B) Extract of an EEG of ipsilateral (right) and contralateral (left) hippocampus, from a KA mouse, at 1 day after the injection showing continuous polyspikes starting in the ipsilateral and spreading in the contralateral hippocampus (top), at 7 days showing interictal epileptiform discharges (middle) and at 15 days showing a spontaneous seizure followed by prolonged postictal depression with flattening of the EEG (down). Time frequency analysis of each EEG pattern is presented below the EEG extract. (C) NeuN (magenta) neuronal staining of the hippocampus shows a progressive reduction of neuronal density in CA1 region of KA injected mice at 7 days (D7) and 15 days (D15) in comparison with PBS injected mice and KA injected mice at 1 day (D1). Scale bar = 200 μ m. (D) Kinetics of disappearance of NeuN⁺ cells in CA1 region from the 1st day to the 15th day after intrahippocampal injection. Data are represented with the ratio of KA to PBS mice (mean \pm SEM density; 5 animals; statistical analyses: Mann-Whitney test). The * indicates significant decrease ($P = 0.027$) of the fluorescence intensity between D1 and D15.



(caption on next page)

Fig. 3. Status epilepticus induces a decrease of 24-OHc levels both in humans and mice (A-C) 24-OHc levels were measured respectively in the homogenates of subiculum from CONT (n = 3) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (A), lateral temporal cortex from CONT (n = 8) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (B) and frontal cortex from CONT (n = 8) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (C). Data were normalized by the concentration of the CYP46A1 in the extracts. (D) 24-OHc levels in the plasma of CONT and SE patients. Values of the different subgroups (FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients) are presented. We performed pairwise comparisons after a one-way ANOVA test. (E) 25-OHc levels in the plasma of CONT and SE patients. Values of the different subgroups (FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients) are presented. We performed pairwise comparisons after a one-way ANOVA test. (F) 24-OHc plasma levels were correlated with the time between SE onset and blood sampling (days). The degree of correlation was evaluated with the Spearman test ($\rho = 0.25$; $P = 0.047$). (G) 24-OHc levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from mice at the four time points after KA injection (n = 6–7 per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each time. (H) Human paraffin post-mortem slices were stained with the monoclonal antibody against the CYP46A1 (blue). Strong expression was detected in the subiculum region, in which CYP46A1 staining was polarized and visible in the cell bodies and dendrites of pyramidal neurons, from both CONT and SE post-mortem tissues (top). Co-labelling of CYP46A1 and NeuN (magenta) immunostaining in hippocampus subiculum region shows a strong co-localization (down). No variation of intensity was found between CONT (n = 3) and SE post-mortem patients (n = 7). Scale bar = 50 μm . (I) Examples of frozen post-mortem subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex from CONT and SE patients which were processed for western blotting with antibodies directed against CYP46A1 and GAPDH (top). Quantification of CYP46A1 levels normalized to GAPDH from CONT (n = 3 and 8 respectively for subiculum and cortex) and SE patients (n = 2) extracts (down). All data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Student t-test and Mann-Whitney test when appropriate. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ for NRSE patients or RSE patients versus CONT or KA-mice versus PBS-mice. # $P < 0.05$ when compared with RSE patients.

temperature. Signals were detected using ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Signal intensities were analyzed, on a blinded fashion, with MultiGauge 3.0 software. CYP46A1 concentrations were found by densitometry analysis.

2.9. Statistical analysis

Analyses were performed with R Software (R.3.5.0).

We first performed one-way ANOVA tests to evaluate subgroups impact. Then, pairwise comparisons were performed using Student, Mann-Whitney, or Chi² tests when appropriate. The sequential rejective Benjamini-Hochberg test procedure was used to correct for multiple comparisons. Shapiro-Wilk test was performed to assess normality of data distribution. Correlations were evaluated calculating respective Spearman's rho values and their level of significance. Results were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Study participants

The number of patients for each subgroup and each biological compartment are summarized in Fig. 1. Main demographic and biological characteristics are summarized in Table 2. NRSE patients were included more quickly after SE onset than those with RSE ($P = 0.028$).

3.2. Time course of epileptic activities and neuronal death in mice after KA injection

3.2.1. Electrophysiological features

Following KA injection, EEG recordings showed SE, defined by intermittent seizures without recovery of normal background between successive seizures, which began after 30-min and lasted for 3 days (Fig. 2A–B). At 6–7 days post-injection, we observed an interictal activity including spike-and-wave discharges in both hippocampi. After 2 weeks, we observed spontaneous clonic seizures followed by prolonged postictal depression with EEG flattening (Fig. 2A–B).

3.2.2. Histological analyses

A severe progressive neuronal loss was seen in CA1 region (Fig. 2C), starting at the 3rd day and almost total at the 15th day (Fig. 2D).

3.3. SE induces a decrease of 24-OHc levels both in humans and mice

3.3.1. 24-OHc levels in human post-mortem brain tissues

24-OHc levels were measured in subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex from frozen extracts of post-mortem patients (SE

patients n = 2, CONT n = 3), and normalized by CYP46A1 concentration. In subiculum, we found a higher 24-OHc/CYP46A1 ratio for one patient when compared with CONT (Fig. 3A). This patient died after 106 days of a New Onset Refractory Status Epilepticus (NORSE, new onset refractory status epilepticus without a clear acute or active structural, toxic or metabolic cause in a patient without active epilepsy or other preexisting relevant neurological disorder (Hirsch et al., 2018)) and presented with hippocampal atrophy at brain examination. In contrast, there was a decrease of the ratio for the second patient who died only 9 days after SE onset and also suffering from a NORSE (Fig. 3A). In temporal cortex and frontal cortex, we found decreased ratio for both patients (Fig. 3B–C).

3.3.2. 24-OHc levels in human plasma and CSF

We measured 24-OHc levels in CSF and plasma of CONT and SE patients (Table 2). No significant change in CSF 24-OHc levels were found in SE patients, as compared to CONT. However, plasma 24-OHc levels were significantly lower in SE patients when compared with CONT ($P = 0.00064$), FCONT ($P = 0.018$) and EPI ($P = 0.00087$). No difference was found between FCONT and EPI ($P = 0.25$), suggesting that reduced 24-OHc levels are not related to sporadic seizures (Fig. 3D). Among SE patients, only NRSE patients had significantly reduced 24-OHc levels when compared with CONT ($P < 0.001$). NRSE patients showed also lower 24-OHc levels than RSE patients ($P = 0.043$) (Fig. 3D). In contrast to 24-OHc, we found increased 25-hydroxycholesterol (25-OHc) plasma levels for SE patients when compared with FCONT ($P = 0.043$). RSE patients showed also higher 25-OHc levels than CONT patients ($P = 0.035$) (Fig. 3E). We studied the relationship between plasma 24-OHc levels and the time between SE onset and blood sampling: patients who were enrolled quickly after SE onset had significantly lower 24-OHc levels, than those enrolled later ($\rho = 0.25$; $P = 0.047$) (Fig. 3F).

3.3.3. 24-OHc levels in the hippocampus of KA-induced SE mice

We then measured 24-OHc levels both in ipsilateral and contralateral hippocampi from KA mice. Levels were normalized by the total protein concentration, and expressed as the ratio of 24-OHc levels for KA mice and for PBS mice (Fig. 3G). We observed a significant decrease of the ratio the first day after injection in the ipsilateral hippocampus ($P = 0.047$). At the third day, ratios were decreased in ipsilateral ($P = 0.0015$) and contralateral hippocampi ($P = 0.047$). There was no difference between KA and PBS mice during the latent period (D7) and at the time of spontaneous seizures (D15). Decreased 24-OHc levels in KA mice preceded the decrease in NeuN+ cells (Fig. 2D), indicating that the reduced 24-OHc production by the CYP46A1 is not merely related to the neuronal death.

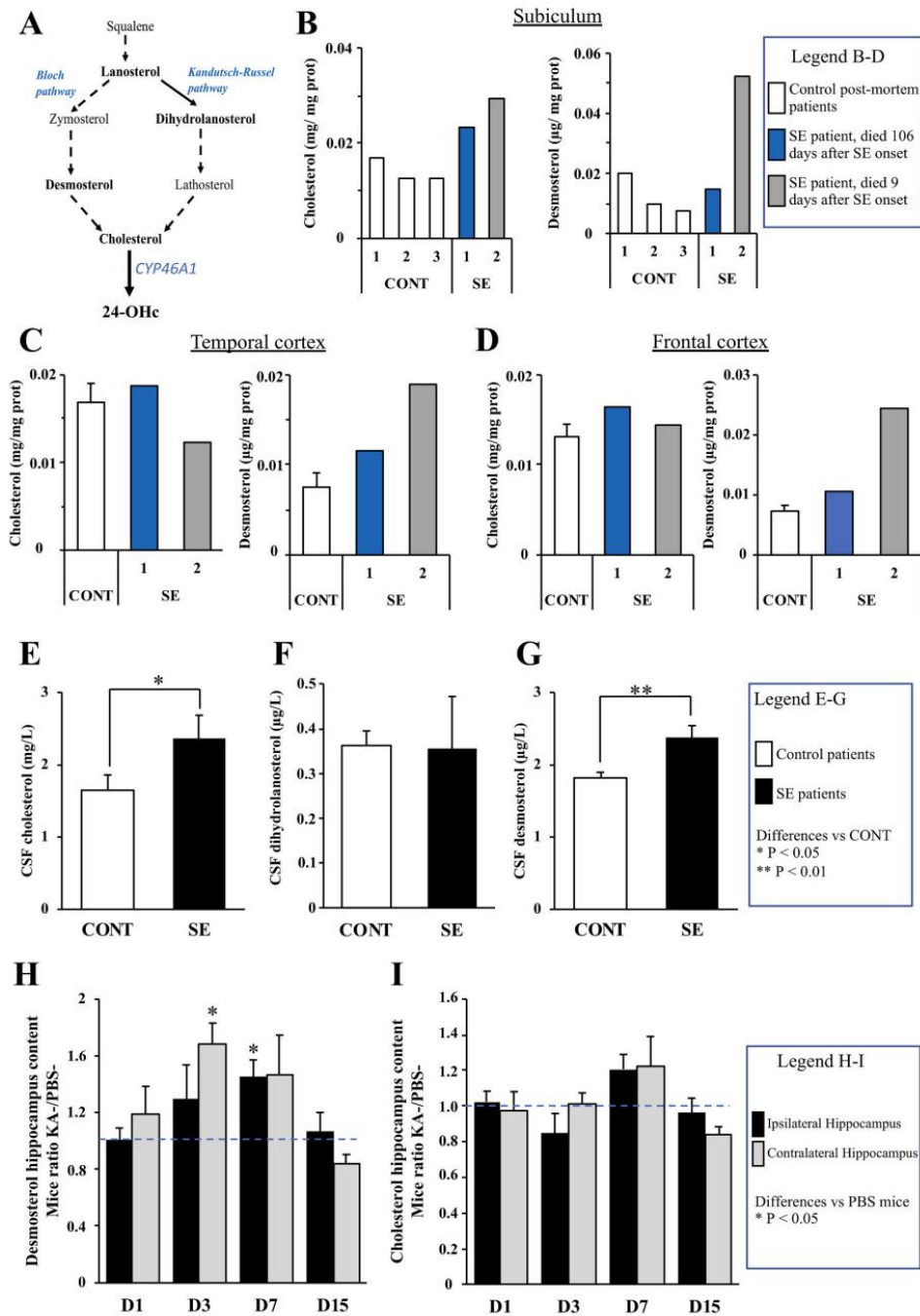
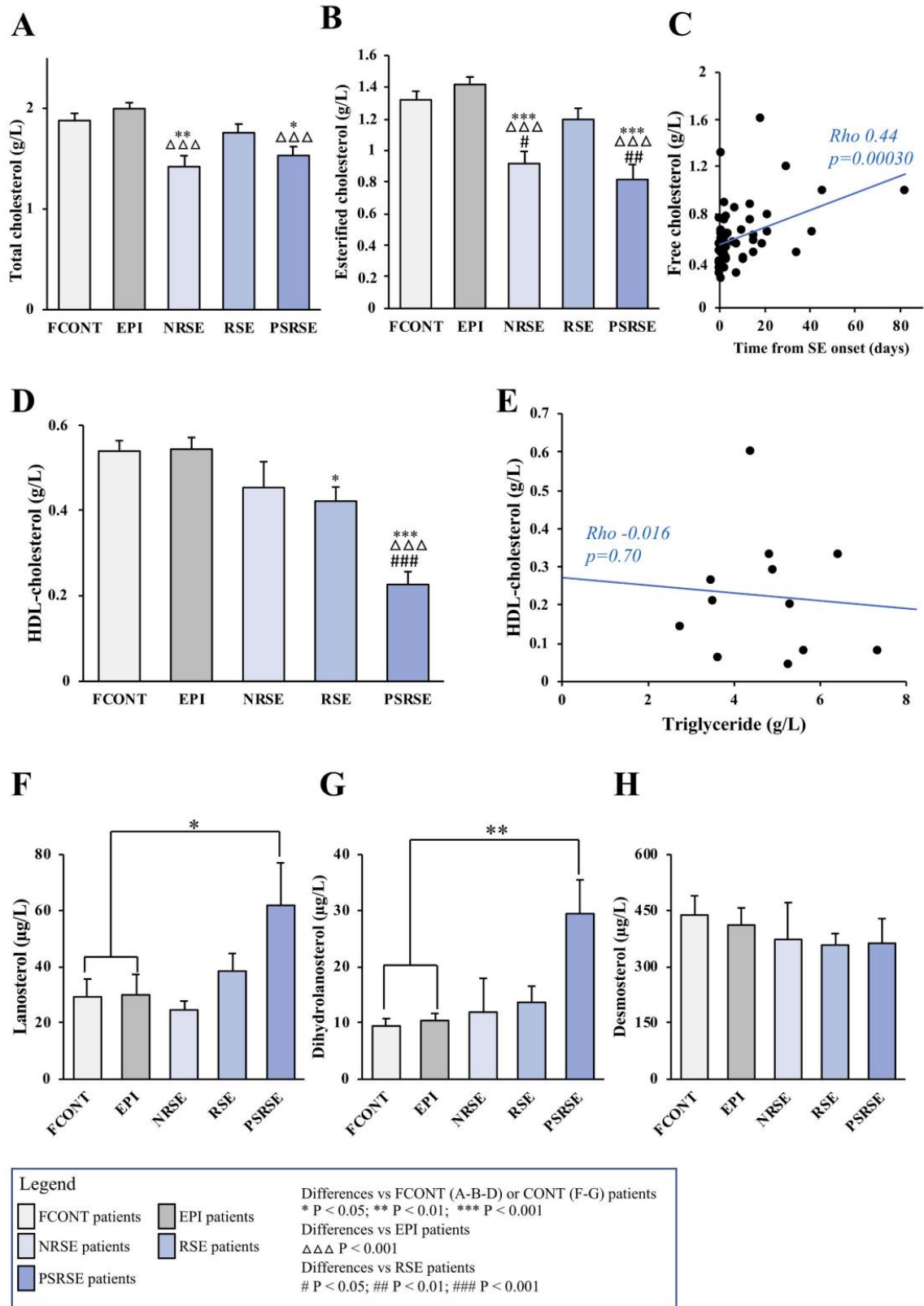


Fig. 4. Status epilepticus induces an abnormal increase in brain cholesterol synthesis.

(A) Schematic representation of the two enzymatic pathways for the conversion of squalene to cholesterol: Bloch and Kandutsch-Russel pathways, respectively shown on the left and on the right side. Sterols in bold were measured by UPLC-MS/MS. (B, C and D) Cholesterol and desmosterol levels were measured respectively in subiculum homogenates from CONT (n = 3) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (B), in homogenates of lateral temporal cortex from CONT (n = 8) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (C) and in homogenates of frontal cortex from CONT (n = 8) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (D). Data were normalized by the total protein concentration in the extracts. (E-G) Sterols were measured in the CSF of CONT patients and SE patients. (H) Desmosterol levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from KA injected mice at the four time points (n = 6-7 per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each corresponding time points. (I) Cholesterol levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from mice at the four time points after KA injection (n = 6-7 per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each corresponding time points.

All data are represented as mean ± SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test. *P < 0.05; **P < 0.01 for SE patients versus CONT or KA-mice versus PBS-mice.



(caption on next page)

Fig. 5. Status epilepticus induces modifications in peripheral cholesterol homeostasis.

Total cholesterol (A) and esterified cholesterol (B) were measured in the serum of FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients. (C) Free cholesterol levels were correlated with the time between SE onset and blood sampling (days). The degree of correlation was evaluated with the Spearman test ($\rho = 0.44$; $P = 0.00030$). (D–E) HDL-cholesterol levels were measured by enzymatic method (D) and levels were correlated with the triglyceride's concentration, in patients showing a hypertriglyceridemia ($TG > 2.5$ g/L). No correlation was observed using the Spearman test ($\rho = -0.116$; $P = 0.70$) (E). (F–H) Lanosterol, dihydrolanosterol and desmosterol levels were measured in the plasma of FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients. Data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Student t-test and Mann-Whitney test when appropriate. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with FCONT or CONT. $\Delta P < 0.05$; $\Delta\Delta P < 0.01$; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ when compared with EPI. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ when compared with RSE patients.

3.3.4. CYP46A1 expression levels in human post-mortem brain tissues

As we found decreased 24-OHc levels, we studied the expression of the CYP46A1. In CONT post-mortem tissues ($n = 3$), we found CYP46A1 expression in all cell bodies of subiculum pyramidal cells (Fig. 3H). In post-mortem tissues from SE patients ($n = 7$), we did not identify changes in the intensity or the localization of CYP46A1 fluorescence (Fig. 3H).

Then, we analyzed CYP46A1 protein expression levels in humans' frozen post-mortem subiculum (CONT $n = 3$, SE patients $n = 2$), lateral temporal cortex (CONT $n = 8$, SE patients $n = 2$) and frontal cortex (CONT $n = 8$, SE patients $n = 2$). Immunoblots of CYP46A1 showed no significant modifications in CYP46A1 levels in subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex of SE patients when compared with CONT (Fig. 3I).

3.4. SE induces an abnormal increase in brain cholesterol synthesis

As our previous results suggest a functional blockage of the CYP46A1, we then studied the substrate of this enzyme: the cholesterol and its precursors. Cholesterol synthesis from acetyl-CoA requires a lengthy biosynthesis and two parallel pathways: the Bloch pathway—which involves desmosterol synthesis—and the Kandutsch-Russel pathway—which involves dihydrolanosterol synthesis (Fig. 4A).

3.4.1. Sterol levels in human post-mortem brain tissues

We first measured sterol levels in the homogenates of subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex extracts. We found increased cholesterol and desmosterol levels in the subiculum of SE patients when compared with CONT (Fig. 4B). Levels were higher for the patient who had a lower 24-OHc/CYP46A1 ratio (Fig. 3A). In the temporal cortex, we found no modification in cholesterol levels for SE patients when compared with CONT (Fig. 4C). Nevertheless, as observed in the subiculum, we found increased desmosterol levels in SE patients (Fig. 4C). Similar results were obtained in the frontal cortex (Fig. 4D). No modification was found for lanosterol and dihydrolanosterol levels (data not shown).

3.4.2. Sterol levels in human CSF

Sterol levels were then measured in CSF from CONT and SE patients (Fig. 4E–G). CSF cholesterol levels were increased in SE patients when compared with CONT ($P = 0.036$) (Fig. 4E). To identify the synthesis pathway, we measured desmosterol and dihydrolanosterol levels. No modification of dihydrolanosterol levels was found (Fig. 4F), while a significant increase of desmosterol levels was observed for SE patients when compared with CONT ($P = 0.0027$) (Fig. 4G).

3.4.3. Sterol levels in mice KA model hippocampus

Next, sterol levels were measured in ipsilateral and contralateral hippocampi from KA and PBS mice (Fig. 4H–I). We observed a progressive increase in KA/PBS desmosterol ratios with a peak at 3 days (1.68, $P = 0.015$) for the contralateral hippocampus and at 7 days (1.45, $P = 0.025$) for the ipsilateral. We also observed a progressive increase in KA/PBS cholesterol ratio with a peak at 7 days ($P = 0.15$) (Fig. 4I). No modification was found for lanosterol and dihydrolanosterol levels (data not shown).

Altogether these data indicate that SE induces an abnormal increase

of brain cholesterol synthesis through the Bloch pathway.

3.5. SE induces disturbances in peripheral cholesterol homeostasis

3.5.1. Total cholesterol, free cholesterol and esterified cholesterol

SE patients had significantly lower total cholesterol (TC) levels when compared with CONT patients ($P < 0.001$). No difference was found between levels of FCONT and EPI (Fig. 5A). TC levels were lower for NRSE patients and PSRSE patients. Nevertheless, TC decrease hides different trends from the two subtypes of cholesterol: the free or unesterified cholesterol (FC), which is metabolically active, and the esterified cholesterol (EC), an inactive form stored in the liver. SE patients had lower EC levels when compared with CONT patients ($P < 0.001$). Notably, EC levels were lower for NRSE patients and PSRSE patients when compared with FCONT and EPI (Fig. 5B). The cholesterol esterification ratio, obtained as EC/TC, was also lower for SE patients ($P < 0.001$). In contrast, FC levels tend to rise in SE patients, especially for PSRSE patients ($P = 0.055$). We also observed a correlation between serum FC levels and the time between SE onset and blood sampling ($\rho = 0.44$; $P < 0.001$) (Fig. 5C).

3.5.2. Lipoproteins and apolipoproteins

We then studied changes in the lipid complexes. SE patients showed a decrease of HDL-c levels which was even stronger if SE was sustained ($P = 0.020$ for RSE patients versus FCONT; $P < 0.001$ for PSRSE patients versus FCONT and RSE patients) (Fig. 5D). Contrary to HDL-c, triglyceride levels increased in SE patients ($P = 0.0016$ for PSRSE patients versus CONT and $P = 0.019$ for PSRSE patients versus RSE patients). No correlation was observed between HDL-c and triglyceride levels (up to 2.5 g/L) in SE patients, indicating that lower HDL-c levels were not merely related to high triglyceride levels (Fig. 5E). ApoA1 levels were decreased in SE patients when compared with CONT ($P < 0.001$). No significant change was observed for ApoB levels.

3.5.3. Sterol levels in human plasma

The increase of FC levels could be linked to an increase of lanosterol ($P = 0.04$) (Fig. 5F), and dihydrolanosterol ($P = 0.0076$) (Fig. 5G) levels in PSRSE patients when compared with CONT. In contrast to the brain findings, no modification in desmosterol levels was found in plasma of SE patients (Fig. 5H).

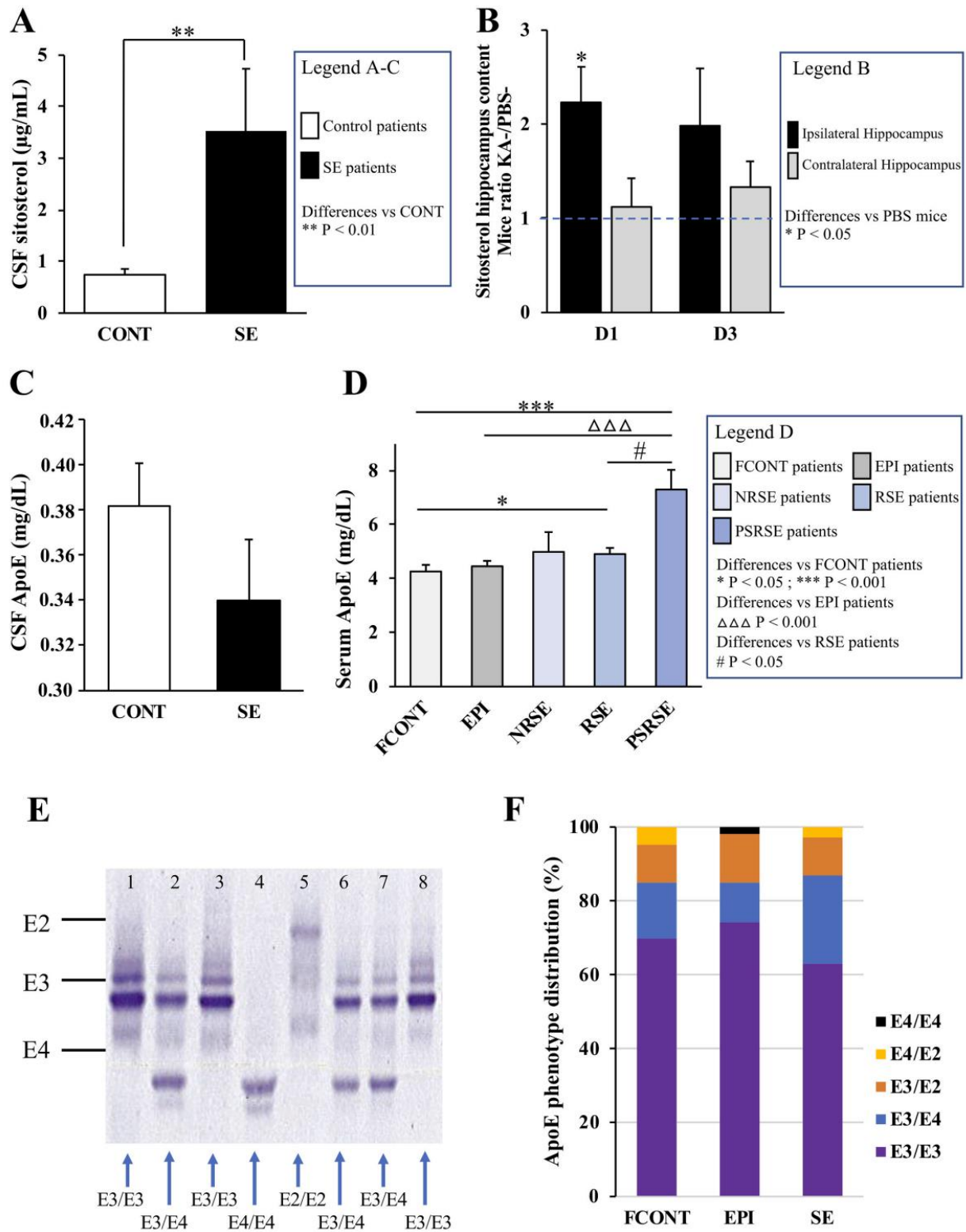
Altogether these data indicate that SE induces an abnormal increase of peripheral cholesterol synthesis through the Kandutsch-Russel pathway and disturbs cholesterol and lipoproteins homeostasis.

3.6. Blood – brain handover in SE

In order to understand relationship between the brain and the peripheral compartments, we further studied several ways of communication between them.

3.6.1. Blood-brain barrier permeability

To study BBB integrity, we measured sitosterol levels in humans and mice. SE patients showed increased CSF sitosterol levels when compared with CONT patients ($P = 0.0019$) (Fig. 6A), and an increased percentage of diffusion through the BBB (i.e. $[\text{Sitosterol}]_{\text{CSF}}/[\text{Sitosterol}]_{\text{CSF+plasma}}$) ($P < 0.001$). Moreover, hippocampus sitosterol levels were doubled, one



(caption on next page)

Fig. 6. Blood – brain handover in status epilepticus

(A) CSF sitosterol levels were measured in SE patients and CONT. (B) Sitosterol levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from KA injected mice at the two first time points ($n = 6-7$ per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each corresponding time points. (C) CSF ApoE levels were measured in CONT and SE patients. (D) Serum ApoE levels were measured in FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients. (E) ApoE phenotype: examples of isoforms of ApoE for eight patients, by isoelectric focusing gel, followed by immunoprecipitation on Hydrigel 18 ApoE isofocusing. Results are indicated below the gel. (F) ApoE phenotype frequencies were determined for all FCONT, EPI and SE patients. Data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with CONT or FCONT. $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ when compared with EPI. # $P < 0.05$ when compared with RSE patients.

day after injection, in KA mice when compared with control animals ($P = 0.029$) (Fig. 6B).

3.6.2. Lipid transport and ApoE

As ApoE is involved in the lipid transport from liver to peripheral compartments and from astrocytes to neurons, we measured its serum and CSF levels in patients. CSF ApoE levels tend to decrease in SE patients when compared with CONT ($P = 0.15$) (Fig. 6C). SE patients showed significantly higher serum ApoE levels when compared with CONT ($P = 0.0016$). We observed increased serum ApoE levels with SE duration (Fig. 6D). In addition, we observed a trend to an increase of hippocampal ApoE+ cells 7 days after KA injection (data not shown). Altogether these data suggest an increase of ApoE brain levels.

We further phenotyped ApoE in SE patients and CONT patients (Fig. 6E). The E3/E3 phenotype was the most common both in SE patients (63%) and CONT (73%) (Fig. 6F). We did not observe any difference between phenotype frequencies in both groups.

4. Discussion and conclusions

The availability of metabolites measurable in brain, blood or CSF may facilitate the understanding of cellular changes that occur during SE and the implementation of further prospective therapeutic studies. Even if several fluid biomarkers were proposed in SE, none have yet been validated for clinical use (Hanin et al., 2020).

Disturbances in brain cholesterol homeostasis were reported in several neurological disorders such as Alzheimer's disease (Djelti et al., 2015; Martins et al., 2009) or Huntington's disease (Boussicault et al., 2016) and suggested in SE animal models (Chali et al., 2019; Heverin et al., 2012; Kim et al., 2010; Ong et al., 2010). Nevertheless, findings were conflicting and brain cholesterol homeostasis has never been explored in SE patients. We therefore aimed to evaluate more accurately brain cholesterol homeostasis disturbances induced by SE in both patients and animal model.

4.1. CYP46A1 expression is maintained but 24-OHc levels decrease during SE

We did not observe a decrease of CYP46A1 expression in the brain of patients with SE (Fig. 3H–I). Nevertheless, in lines with previous studies conducted on neurodegenerative diseases, we observed two-step changes of 24-OHc levels—an initial decrease (Leoni et al., 2008; Solomon et al., 2009), followed by an increase (Lütjohann et al., 2000).

Indeed, the 24-OHc/CYP46A1 ratio was lower than that of controls in subiculum for the patient who died early (9 days) after SE onset (Fig. 3A). We observed decreased 24-OHc levels in mouse hippocampi, 1 and 3 days after KA injection (Fig. 3G), as well as in plasma from patients who were enrolled shortly after SE onset (Fig. 3D–F). SE may induce a CYP46A1 functional inhibition, possibly related to (i) a dysfunction of the CYP46A1 intracellular transfer between endoplasmic reticulum and membranes (Sodero et al., 2012), (ii) an increased requirement for brain cholesterol after injury or (iii) a protective mechanism against 24-OHc neurotoxicity (Noguchi et al., 2015, 2014; Paul et al., 2013; Yamana et al., 2011). Decreased 24-OHc production could induce an increased production of 25-OHc, via an alternative way of hydroxylation. Increased levels of 25-OHc are involved in inflammation pathways (Pokharel et al., 2019) and may participate to SE excitotoxicity. No

difference of 24-OHc levels was found in CSF. Measurement of 24-OHc in CSF was previously shown to give less accurate findings: the CSF compartment may accumulate compounds and reflect an averaged production and release, and repeated measures are difficult to obtain (Leoni and Caccia, 2011).

The secondary increase in 24-OHc levels was reported to result from neuronal loss and a wide release of molecules from the brain into the blood (Leoni and Caccia, 2011; Lütjohann et al., 2000). We showed an increase of the subiculum 24-OHc/CYP46A1 ratio for the patient who presented with hippocampal atrophy at brain examination, highlighting a focal neuronal death (Fig. 3A). No increase was shown in both cortex (Fig. 3B–C), possibly explained by the lack of cortical atrophy. We also reported increased 24-OHc levels for SE patients who were enrolled later after SE onset (Fig. 3D–F). These patients presented with SE for several days; therefore, we may hypothesize that neuronal death had already begun.

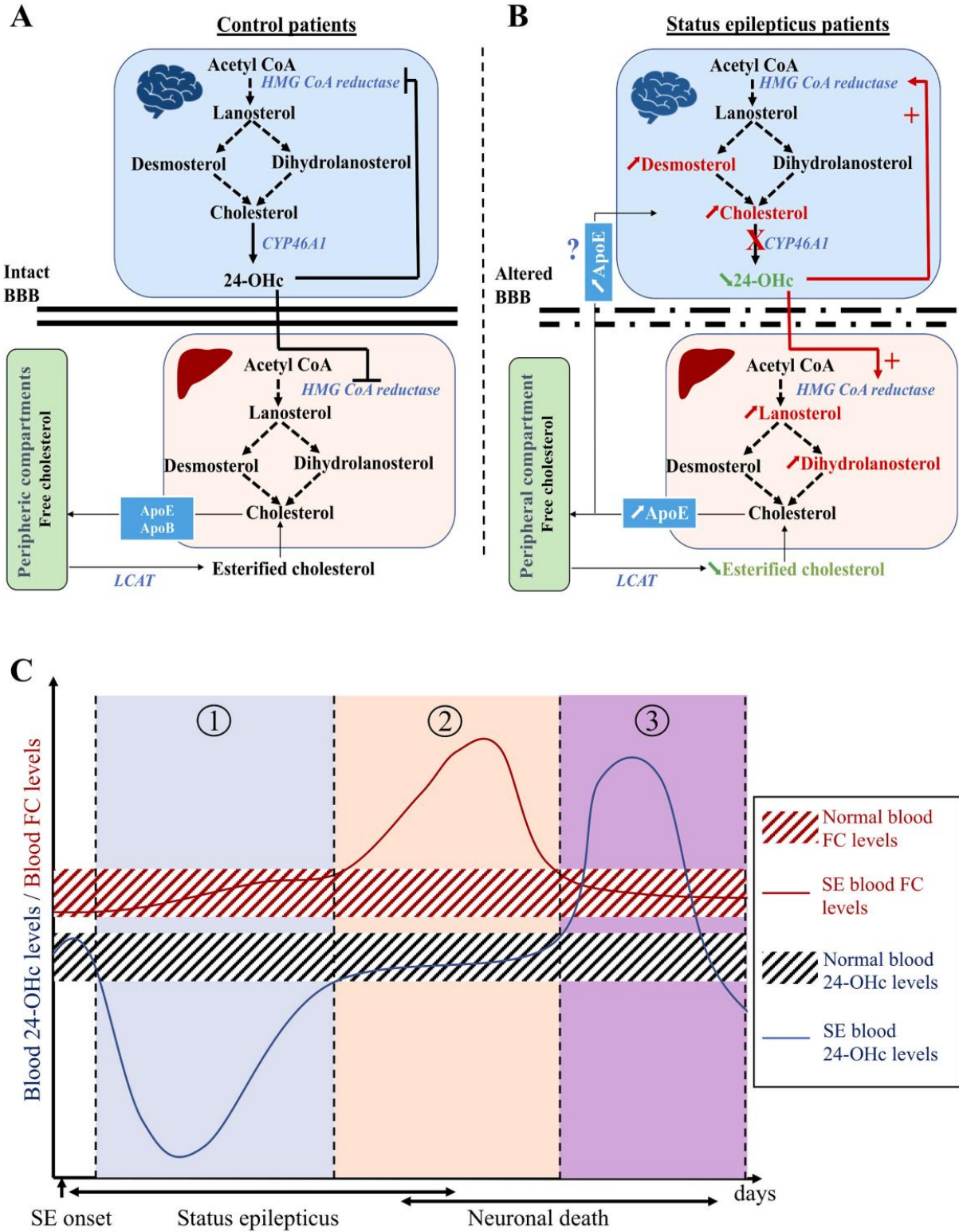
This two-stage evolution of 24-OHc emphasizes the need of a precise timing of blood sampling, referred to SE onset to correctly interpret this variable (Fig. 7). We can identify three periods: (1) first hours/days after SE onset, 24-OHc levels decrease; (2) several days after, 24-OHc levels normalize; (3) in patients and/or animals with sustained SE, suffering from secondary neuronal death, 24-OHc is finally released from the brain into the blood.

4.2. 24-OHc decreased levels are followed by an abnormal increase of cholesterol synthesis

The cholesterol synthesis and the 24-OHc production are closely related (Fig. 7). Accordingly, we showed that decreased 24-OHc levels were associated with increased cholesterol levels.

Furthermore, we showed that increased cholesterol levels did not merely result from the blockage of the CYP46A1 enzymatic activity, but also resulted from an increase of the cholesterol synthesis. Desmosterol and cholesterol levels were higher in the subiculum of the patient who had the lowest 24-OHc/CYP46A1 ratio (Fig. 4B). Increased cholesterol synthesis could reflect the lack of a negative feedback mechanism triggered by 24-OHc on the cholesterol synthesis enzymes (Boussicault et al., 2016; Chali et al., 2019; Leoni and Caccia, 2013). The activation of cholesterol enzymes by transcription-translation occurred after several days, which could explain why only PSRSE patients presented with higher FC levels (Fig. 5C, period 2 Fig. 7C). A too early blood sampling does not measure the increase in the cholesterol synthesis (period 1 Fig. 7C).

Two alternative pathways for cholesterol synthesis exist downstream of lanosterol: the Bloch and the Kandutsch-Russel pathway (Mitsche et al., 2015). Interestingly, we observed an increase of the cholesterol synthesis through two different pathways according to the compartment: (i) in brain, an increase of desmosterol levels both in human and mouse brains and in human CSF, through the Bloch pathway (Fig. 4); and (ii) in the peripheral compartment, an increase of lanosterol and dihydrolanosterol levels in human plasma, through the Kandutsch-Russel pathway (Fig. 5F–G). Adult neurons essentially rely on astrocytes for cholesterol synthesis, which could explain the increase in the brain Bloch pathway activity. Altogether these data suggest that SE induces an abnormal increase of cholesterol synthesis in brain and in peripheral compartment.



(caption on next page)

Fig. 7. Cholesterol homeostasis is modified in status epilepticus.

(A) Schema of cholesterol homeostasis regulation by the CYP46A1 in normal situation. 24-OHc controls the synthesis of cholesterol both in the brain and in the liver. Lipids synthesized in the liver are transported thanks to ApoE and ApoB to the peripheral compartments to be stored and used for biosynthesis. Free cholesterol must be esterified by LCAT enzyme to go back to the liver. (B) Cholesterol homeostasis is dysregulated in SE. Due to CYP46A1 inhibition, an increase of cholesterol synthesis occurs in the brain via the Bloch pathway stimulation and in the peripheral compartment via the Kandutsch-Russel pathway stimulation. The increase of serum apolipoprotein E (ApoE) could allow the transport of lipids from the liver into the brain via an altered blood-brain barrier. (C) Proposed time-evolution of free cholesterol (FC) and 24-OHc levels after SE. We distinguish three periods: (1) during the first hours/days after SE onset, we found a decrease of 24-OHc levels, probably related to the transitory CYP46A1 inhibition, and normal FC levels; (2) several days after SE onset, we showed increased FC levels due to the lack of negative feedback mechanism triggered by 24-OHc on the cholesterol synthesis enzymes and normalization of 24-OHc levels; (3) in case of sustained SE, patients or animals suffered from neuronal death which induces an increase of 24-OHc release.

4.3. Disturbances in peripheral cholesterol homeostasis and lipid transport

When low-density lipoprotein (LDL) particles are overloaded in the blood stream, lipids synthesized in the liver are transported thanks to ApoE/ApoB to the peripheral compartments. In contrast, high-density lipoprotein (HDL) particles transport cholesterol back to the liver after esterification by LCAT enzyme (Zhang and Liu, 2015). Brain transcripts for esterification enzymes increased persistently after SE onset in mice (Chali et al., 2019). However, we observed a decrease of serum EC and cholesterol esterification ratio in patients, which may result in a default to eliminate FC stored in peripheral compartments (Fig. 5B).

After an injury, increased mobilization of cholesterol may be required for repair, growth and maintenance of myelin and neurons membranes (Wang et al., 2010). We observed increased sitosterol levels both in mouse hippocampi and human CSF. These data suggest that BBB is altered after SE and so, a cholesterol blood-brain handover could happen. We showed that PSRSE patients presented with the highest serum ApoE and ApoB levels, the lowest EC levels and the highest sitosterol CSF levels. We can speculate that the non-esterified cholesterol could be transported by apolipoproteins to the brain through an altered BBB (Fig. 7).

Altogether, these data may suggest that cholesterol may be actively concentrated after SE. This may first be beneficial for the restoration of lipid membranes. On the other hand, in case of sustained SE, the excess of cholesterol may be excitotoxic for neuronal cells, as shown by the complete blockage of the CYP46A1 (Chali et al., 2015). The cholesterol accumulation could result in an increase of membrane viscosity and a decrease of neurotransmitter receptors mobility out of synapses, thereby increasing excitotoxicity and focal neuronal death. It may explain the neurologic sequels observed in SE patients and promote the use of cholesterol-lowering drugs that have previously shown their capability to reduce the association of NMDA receptor to lipid rafts in neuronal cultures, thereby decreasing the neurotoxicity (Ponce et al., 2008). Excitotoxicity could also be related to a direct regulation of numerous voltage-dependent and ligand-gated ion channels by cholesterol (Korinek et al., 2015; Paul et al., 2013).

In summary, our findings reveal disturbances in cholesterol homeostasis, similar in humans and in mouse model of SE, both in brain and in peripheral compartments (summarized in Fig. 7A–B). The accumulation of cholesterol was previously shown to be responsible for neuronal death in animal models and *in vitro*. In this study, we demonstrated that SE induces an increase of the cholesterol synthesis both in humans and mice. Nevertheless, the prognosis significance of the increase of cholesterol synthesis remain to be explored in SE patients. If we demonstrate that disturbances of cholesterol homeostasis are associated with higher morbidity, the deleterious increase of brain cholesterol synthesis could be targeted by statins. Simvastatin has the highest BBB permeability (Sierra et al., 2011; Xie et al., 2011). Some studies conducted in rodents suggested a neuroprotective effect of simvastatin (Ponce et al., 2008; Xie et al., 2011; Zacco et al., 2003). Nonetheless, mechanisms underlying the neuroprotective effect of simvastatin are unknown (Omar et al., 2017; Quintana-Pájaro et al., 2018), and other studies did not report any effect (Funck et al., 2011; Trivedi et al., 2018).

Our study paves the way for research on statins as therapeutic intervention, in order to prevent the excitotoxicity and possibly

subsequent neurological sequels of SE patients.

There are some limitations for this study: it was conducted in a single center, with various SE etiologies and treatments. Lumbar puncture was not performed for all patients and CSF was obtained more commonly for the patients with the most severe disease. Due to the smaller number of patients, we were not able to perform pairwise comparisons for CSF, and statistical analysis for the post-mortem samples. The interpretation of human post-mortem findings is limited by the small number of patients.

Nonetheless, the strengths of our study were the translational approach showing similar results for humans and KA mice, and the detailed analysis of lipid homeostasis by complementary methods. In addition, it was seemingly the first study demonstrating disturbances of cholesterol homeostasis in SE patients.

Funding sources

This work received support from the “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111) and from the Fondation Assitance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES- Marie Laure PLV Merchandising).

All animal work was conducted at the PHENO-ICMice facility. The Core is supported by 2 “Investissements d’avenir” (ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS) and the “Fondation pour la Recherche Médicale”.

Study Group

Aurélien Hanin^a, Paul Baudin^a, Sophie Demeret^b, Delphine Roussel^a, Sarah Lecas^a, Elisa Teyssou^a, Maria Damiano^c, David Luis^a, Virginie Lambrecq^{a,c,d}, Valerio Frazzini^{a,c}, Maxens Decavèle^{e,f}, Isabelle Plu^{d,g}, Dominique Bonnefont-Rousselot^{h,i}, Randa Bittar^{h,j}, Foudil Lamari^h, Vincent Navarro^{a,c,d,k}, Morgane Faure^f, Bastien Herlin^c, Pierre Jaquet^b, Clémence Marois^b, Nicolas Mezouar^c, Benjamin Rohaut^{a,b,d}, Nicolas Weiss^b, Mark Williams (Department of Neurology, Yale School of Medicine, New Haven, United States).

Declaration of competing interest

Aurélien Hanin reports no disclosure.
 Paul Baudin reports no disclosure.
 Sophie Demeret reports no disclosure.
 Delphine Roussel reports no disclosure.
 Sarah Lecas reports no disclosure.
 Elisa Teyssou reports no disclosure.
 Maria Damiano reports no disclosure.
 David Luis reports no disclosure.
 Virginie Lambrecq reports no disclosure.
 Valerio Frazzini reports no disclosure.
 Maxens Decavèle reports no disclosure.
 Isabelle Plu reports no disclosure.
 Dominique Bonnefont-Rousselot reports no disclosure.
 Randa Bittar reports no disclosure.
 Foudil Lamari reports no disclosure.
 Vincent Navarro reports personal fees from UCB pharma, EISAI, GW Pharma and Liva Nova outside the submitted work.

Acknowledgements

The authors thank all the technical staff from the Histomics facility and from the PHENO-ICMice facility (Paris Brain Institute).

References

- Bittar, R., Carrié, A., Nouadje, G., Cherfils, C., Fesél-Fouquier, V., Barbot-Trystram, L., Giral, P., Bonnefont-Rousselot, D., 2020. Evaluation of a semi-automatic isoelectric focusing method for apolipoprotein E phenotyping. *Pract. Lab. Med.* 18, e00150 <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00150>.
- Björkhem, I., Meaney, S., 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b>.
- Björkhem, I., Lütjohann, D., Diczfalussy, U., Ståhle, L., Ahlberg, G., Wahren, J., 1998. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* 39, 1594–1600.
- Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A., Planques, A., Heck, N., Moumné, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pagès, C., Galvan, L., Pigué, F., Aubourg, P., Cartier, N., Caboche, J., Betuing, S., 2016. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139, 953–970. <https://doi.org/10.1093/brain/awv384>.
- Chali, F., Djelti, F., Eugene, E., Valderama, M., Marquer, C., Aubourg, P., Duyckaerts, C., Miles, R., Cartier, N., Navarro, V., 2015. Inhibiting cholesterol degradation induces neuronal sclerosis and epileptic activity in mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 41, 1345–1355. <https://doi.org/10.1111/ejn.12911>.
- Chali, F., Millor, G., Marty, S., Morin-Brureau, M., Le Duigou, C., Savary, E., Blugeon, C., Jourden, L., Miles, R., 2019. Lipid markers and related transcripts during excitotoxic neurodegeneration in kainate-treated mice. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/ejn.14375>.
- Cuschieri, S., 2019. The STROBE guidelines. *Saudi J Anaesth* 13, S31–S34. https://doi.org/10.4103/sja.SJA_543_18.
- de Freitas, R.M., do Nascimento, K.G., Ferreira, P.M.P., Jordán, J., 2010. Neurochemical changes on oxidative stress in rat hippocampus during acute phase of pilocarpine-induced seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.09.015>.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2004. Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>.
- Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bièche, I., Marquer, C., Chali, F., Ayricrix, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M.-C., Laprevote, O., Vidaud, M., Duyckaerts, C., Miles, R., Aubourg, P., Cartier, N., 2015. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain* 138, 2383–2398. <https://doi.org/10.1093/brain/awv166>.
- Funck, V.R., de Oliveira, C.V., Pereira, L.M., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F.F., Ferreira, J., Guerra, G.P., Furian, A.F., Oliveira, Maurício Schneider, Mallmann, C.A., de Mello, C.F., Oliveira, Mauro Schneider, 2011. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 52, 2094–2104. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03261.x>.
- Hanin, A., Lambrecq, V., Denis, J.A., Imbert-Bismut, F., Rucheton, B., Lamari, F., Bonnefont-Rousselot, D., Demeret, S., Navarro, V., 2020. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia* 61, 6–18. <https://doi.org/10.1111/epi.16405>.
- Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalussy, U., Winblad, B., Björkhem, I., 2004. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 45, 186–193. <https://doi.org/10.1194/jlr.M3000320-JLR200>.
- Heverin, M., Engel, T., Meaney, S., Jimenez-Mateos, E.M., Al-Saudi, R., Henshall, D.C., 2012. Bi-lateral changes to hippocampal cholesterol levels during epileptogenesis and in chronic epilepsy following focal-onset status epilepticus in mice. *Brain Res.* 1480, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.018>.
- Hirsch, L.J., Gaspard, N., van Baalen, A., Nabbut, R., Demeret, S., Loddenkemper, T., Navarro, V., Specchio, N., Lagae, L., Rossetti, A.O., Hocker, S., Gofton, T.E., Abend, N.S., Gilmore, E.J., Hahn, C., Khosravani, H., Rosenow, F., Trinka, E., 2018. Proposed consensus definitions for new-onset refractory status epilepticus (NORSE), febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES), and related conditions. *Epilepsia* 59, 739–744. <https://doi.org/10.1111/epi.14016>.
- Kim, J.-H., Jittiwat, J., Ong, W.-Y., Farooqui, A.A., Jenner, A.M., 2010. Changes in cholesterol biosynthetic and transport pathways after excitotoxicity. *J. Neurochem.* 112, 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06449.x>.
- Korinek, M., Vyklicky, V., Borovska, J., Lichnerova, K., Kaniakova, M., Krausova, B., Krusek, J., Balik, A., Smejkalova, T., Horak, M., Vyklicky, L., 2015. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *J. Physiol. Lond.* 593, 2279–2293. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.288209>.
- Le Duigou, C., Boullieret, V., Miles, R., 2008. Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *J. Physiol. Lond.* 586, 4891–4904. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156281>.
- Leoni, V., Caccia, C., 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 164, 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002>.
- Leoni, V., Caccia, C., 2013. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* 95, 595–612. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.025>.
- Leoni, V., Mariotti, C., Tabrizi, S.J., Valenza, M., Wild, E.J., Henley, S.M.D., Hobbs, N.Z., Mandelli, M.L., Grisoli, M., Björkhem, I., Cattaneo, E., Di Donato, S., 2008. Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease. *Brain* 131, 2851–2859. <https://doi.org/10.1093/brain/awn212>.
- Levitani, I., Singh, D.K., Rosenhouse-Dantsker, A., 2014. Cholesterol binding to ion channels. *Front. Physiol.* 5, 65. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00065>.
- Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., Heun, R., 2000. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 41, 195–198.
- Marelli, C., Lamari, F., Rainteau, D., Lafourcade, A., Banneau, G., Humbert, L., Monin, M.-L., Petit, E., Debs, R., Castelnuovo, G., Ollagnon, E., Lavie, J., Pilliod, J., Couprie, I., Babin, P.J., Guissart, C., Benyounes, I., Ullmann, U., Lesca, G., Thauvin-Robinet, C., Labauge, P., Odent, S., Ewencyk, C., Wolf, C., Stevanin, G., Hajage, D., Durr, A., Goizet, C., Mochel, F., 2018. Plasma oxysterols: biomarkers for diagnosis and treatment in spastic paraplegia type 5. *Brain* 141, 72–84. <https://doi.org/10.1093/brain/awx297>.
- Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J., Martins, R.N., 2009. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 111, 1275–1308. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06408.x>.
- Mitsche, M.A., McDonald, J.G., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2015. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue- and cell-type specific pathways. *Elife* 4, e07999. <https://doi.org/10.7554/eLife.07999>.
- Noguchi, N., Saito, Y., Urano, Y., 2014. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 692–696. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.010>.
- Noguchi, N., Urano, Y., Takabe, W., Saito, Y., 2015. New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 87, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.036>.
- Omar, A.S., Hanoura, S., Al-Janubi, H.M., Mahfouz, A., 2017. Statins in critical care: to give or not to give? *Minerva Anestesiol.* 83, 502–511. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.16.11493-2>.
- Ong, W.-Y., Kim, J.-H., He, X., Chen, P., Farooqui, A.A., Jenner, A.M., 2010. Changes in brain cholesterol metabolome after excitotoxicity. *Mol. Neurobiol.* 41, 299–313. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8099-3>.
- Paul, S.M., Doherty, J.J., Robichaud, A.J., Belfort, G.M., Chow, B.Y., Hammond, R.S., Crawford, D.C., Linsenbardt, A.J., Shu, H.-J., Izumi, Y., Mennenick, S.J., Zorumski, C. F., 2013. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.* 33, 17290–17300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2619-13.2013>.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13, 139–143.
- Pokharel, S.M., Shil, N.K., Ge, J.B., Colburn, Z.T., Tsai, S.-Y., Segovia, J.A., Chang, T.-H., Bandyopadhyay, S., Natesan, S., Jones, J.C.R., Bose, S., 2019. Integrin activation by the lipid molecule 25-hydroxycholesterol induces a proinflammatory response. *Nat. Commun.* 10, 1482. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09453-x>.
- Ponce, J., de la Ossa, N.P., Hurtado, O., Millan, M., Arenillas, J.F., Dávalos, A., Gasull, T., 2008. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke* 39, 1269–1275. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.498923>.
- Quintana-Pájaro, L.D.J., Ramos-Villegas, Y., Cortecero-Sabalza, E., Joaquim, A.F., Agrawal, A., Narvaez-Rojas, A.R., Moscote-Salazar, L.R., 2018. The effect of statins in epilepsy: a systematic review. *J. Neurosci. Rural Pract.* 9, 478–486. https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp_110_18.
- Ramirez, D.M.O., Andersson, S., Russell, D.W., 2008. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 507, 1676–1693. <https://doi.org/10.1002/cne.21605>.
- Rossetti, A.O., Lowenstein, D.H., 2011. Management of refractory status epilepticus in adults: still more questions than answers. *Lancet Neurol.* 10, 922–930. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70187-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70187-9).
- Rossetti, A.O., Logroscino, G., Bromfield, E.B., 2006. A clinical score for prognosis of status epilepticus in adults. *Neurology* 66, 1736–1738. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223352.71621.97>.
- Saeed, A.A., Genové, G., Li, T., Hülshorst, F., Bethsholtz, C., Björkhem, I., Lütjohann, D., 2015. Increased flux of the plant sterols campesterol and sitosterol across a disrupted blood brain barrier. *Steroids* 99, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.005>.
- Sierra, S., Ramos, M.C., Molina, P., Esteo, C., Vázquez, J.A., Burgos, J.S., 2011. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J. Alzheimers Dis.* 23, 307–318. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101179>.
- Sodero, A.O., Vriens, J., Ghosh, D., Stegner, D., Brachet, A., Pallotto, M., Sassoè-Pognetto, M., Brouwers, J.F., Helms, J.B., Nieswandt, B., Voets, T., Dotti, C.G., 2012. Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. *EMBO J.* 31, 1764–1773. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.31>.
- Solomon, A., Leoni, V., Kivipelto, M., Besga, A., Oksengård, A.R., Julin, P., Svensson, L., Wahlund, L.-O., Andreassen, N., Winblad, B., Soininen, H., Björkhem, I., 2009. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 462, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.073>.

- Trinka, E., Kälviäinen, R., 2017. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure* 44, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.001>.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015. A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523. <https://doi.org/10.1111/epi.13121>.
- Trivedi, L.U., Alvarez, C.A., Mansi, I.A., 2018. Association of statin therapy with risk of epilepsy in 2 propensity score-matched cohorts. *Ann. Pharmacother.* 52, 546–553. <https://doi.org/10.1177/1060028018756650>.
- Wang, L., Han, Y., Chen, D., Xiao, Z., Xi, Z., Xiao, F., Wang, X., 2010. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E concentration decreases after seizure. *Seizure* 19, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2009.12.001>.
- Xie, C., Sun, J., Qiao, W., Lu, D., Wei, L., Na, M., Song, Y., Hou, X., Lin, Z., 2011. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 6, e24966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024966>.
- Yamanaka, K., Saito, Y., Yamamori, T., Urano, Y., Noguchi, N., 2011. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J. Biol. Chem.* 286, 24666–24673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236273>.
- Zacco, A., Togo, J., Spence, K., Ellis, A., Lloyd, D., Furlong, S., Piser, T., 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J. Neurosci.* 23, 11104–11111.
- Zhang, J., Liu, Q., 2015. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 6, 254–264. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3>.

V. RÉFÉRENCES

- Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med.* nov 1998;4(11):1321-4.
- Altwegg-Boussac T, Chavez M, Mahon S, Charpier S. Excitability and responsiveness of rat barrel cortex neurons in the presence and absence of spontaneous synaptic activity in vivo. *J Physiol (Lond).* 15 août 2014;592(16):3577-95.
- Altwegg-Boussac T, Schramm AE, Ballesterio J, Grosselin F, Chavez M, Lecas S, et al. Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain.* 1 sept 2017;140(9):2381-98.
- Ariño H, Armangué T, Petit-Pedrol M, Sabater L, Martinez-Hernandez E, Hara M, et al. Anti-LGI1-associated cognitive impairment: Presentation and long-term outcome. *Neurology.* 23 août 2016;87(8):759-65.
- Armangué T, Spatola M, Vlăgea A, Mattozzi S, Cárceles-Cordon M, Martínez-Heras E, et al. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurol.* sept 2018;17(9):760-72.
- Baulac S, Ishida S, Mashimo T, Boillot M, Fumoto N, Kuwamura M, et al. A rat model for LGI1-related epilepsies. *Human Molecular Genetics.* 15 août 2012;21(16):3546-57.
- Bekkers JM, Delaney AJ. Modulation of Excitability by α -Dendrotoxin-Sensitive Potassium Channels in Neocortical Pyramidal Neurons. *J Neurosci.* 1 sept 2001;21(17):6553-60.
- de Bellescize J, Boutry N, Chabrol E, André-Obadia N, Arzimanoglou A, Leguern E, et al. A novel three base-pair LGI1 deletion leading to loss of function in a family with autosomal dominant lateral temporal epilepsy and migraine-like episodes. *Epilepsy Research.* juill 2009;85(1):118-22.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* avr 2010;51(4):676-85.
- Bernal F, Graus F, Pifarré A, Saiz A, Benyahia B, Ribalta T. Immunohistochemical analysis of anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* mai 2002;103(5):509-15.
- Besleaga R, Montesinos-Rongen M, Perez-Tur J, Siebert R, Deckert M. Expression of the LGI1 gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression. *Virchows Archiv.* 1 oct 2003;443(4):561-4.
- Bien CG, Bien CI, Dogan Onugoren M, De Simoni D, Eigler V, Haensch C-A, et al. Routine diagnostics for neural antibodies, clinical correlates, treatment and functional outcome. *J Neurol.* 2020;267(7):2101-14.
- Bien CG, Vincent A, Barnett MH, Becker AJ, Blümcke I, Graus F, et al. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis. *Brain.* mai 2012;135(Pt 5):1622-38.

- Binks S, Varley J, Lee W, Makuch M, Elliott K, Gelfand JM, et al. Distinct HLA associations of LGI1 and CASPR2-antibody diseases. *Brain*. 1 août 2018;141(8):2263-71.
- Binks SNM, Veldsman M, Easton A, Leite MI, Okai D, Husain M, et al. Residual Fatigue and Cognitive Deficits in Patients After Leucine-Rich Glioma-Inactivated 1 Antibody Encephalitis. *JAMA Neurol*. 1 mai 2021;78(5):617.
- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan L-L, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader LA. Structure and Function of Kv4-Family Transient Potassium Channels. *Physiological Reviews*. 1 juill 2004;84(3):803-33.
- Bisulli F, Naldi I, Baldassari S, Magini P, Licchetta L, Castegnaro G, et al. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: A new locus on chromosome 19q13.11-q13.31. *Epilepsia*. juin 2014;55(6):841-8.
- Blinder T, Lewerenz J. Cerebrospinal Fluid Findings in Patients With Autoimmune Encephalitis—A Systematic Analysis. *Front Neurol*. 25 juill 2019;10:804.
- Blumenthal DT, Salzman KL, Digre KB, Jensen RL, Dunson WA, Dalmau J. Early pathologic findings and long-term improvement in anti-Ma2-associated encephalitis. *Neurology*. 11 juill 2006;67(1):146-9.
- Boillot M, Baulac S. Genetic models of focal epilepsies. *J Neurosci Methods*. 15 févr 2016;260:132-43.
- Boillot M, Huneau C, Marsan E, Lehongre K, Navarro V, Ishida S, et al. Glutamatergic neuron-targeted loss of LGI1 epilepsy gene results in seizures. *Brain*. nov 2014;137(11):2984-96.
- Boillot M, Lee C-Y, Allene C, Leguern E, Baulac S, Rouach N. LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. *Sci Rep*. avr 2016;6(1):21769.
- Brew HM, Gittelmann JX, Silverstein RS, Hanks TD, Demas VP, Robinson LC, et al. Seizures and Reduced Life Span in Mice Lacking the Potassium Channel Subunit Kv1.2, but Hypoexcitability and Enlarged Kv1 Currents in Auditory Neurons. *Journal of Neurophysiology*. sept 2007;98(3):1501-25.
- Brophy GM, Bell R, Claassen J, Alldredge B, Bleck TP, Glauser T, et al. Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. *Neurocrit Care*. août 2012;17(1):3-23.
- Brüggemann N. Contemporary functional neuroanatomy and pathophysiology of dystonia. *J Neural Transm (Vienna)*. avr 2021;128(4):499-508.
- de Bruijn MAAM, van Sonderen A, van Coevorden-Hameete MH, Bastiaansen AEM, Schreurs MWJ, Rouhl RPW, et al. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABA_B R encephalitis. *Neurology*. 7 mai 2019;92(19):e2185-96.
- Carreño M, Bien CG, Asadi-Pooya AA, Sperling M, Marusic P, Elisak M, et al. Epilepsy surgery in drug resistant temporal lobe epilepsy associated with neuronal antibodies. *Epilepsy Research*. janv 2017;129:101-5.

- Celicanin M, Blaabjerg M, Maersk-Møller C, Beniczky S, Marner L, Thomsen C, et al. Autoimmune encephalitis associated with voltage-gated potassium channels-complex and leucine-rich glioma-inactivated 1 antibodies - a national cohort study. *Eur J Neurol*. août 2017;24(8):999-1005.
- Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, Picard F, Couarch P, Berkovic SF, et al. Absence of mutations in the LGI1 receptor ADAM22 gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsy Research*. août 2007;76(1):41-8.
- Chabrol E, Navarro V, Provenzano G, Cohen I, Dinocourt C, Rivaud-Péchoix S, et al. Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice. *Brain*. sept 2010;133(9):2749-62.
- Chen H, Koubeissi MZ. Electroencephalography in Epilepsy Evaluation: CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology. *avril 2019*;25(2):431-53.
- Chen L, Zhu L, Lu D, Dai S, Han Y, Wu Z, et al. Association between autoimmune encephalitis and epilepsy: Systematic review and meta-analysis. *Seizure*. 1 oct 2021a;91:346-59.
- Chen W, Wang M, Gao L, Huang Z, Lin Y, Xue Q, et al. Neurofunctional outcomes in patients with anti-leucine-rich glioma inactivated 1 encephalitis. *Acta Neurol Scand*. 27 juill 2021b;.
- Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK. A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene*. déc 1998;17(22):2873-81.
- Cho S-J, Byun D, Nam T-S, Choi S-Y, Lee B-G, Kim M-K, et al. Zebrafish as an animal model in epilepsy studies with multichannel EEG recordings. *Sci Rep*. 8 juin 2017;7(1):3099.
- Clark S, Antell A, Kaufman K. New antiepileptic medication linked to blue discoloration of the skin and eyes. *Ther Adv Drug Saf*. févr 2015;6(1):15-9.
- Cousyn L, Lambrecq V, Houot M, Shor N, Nguyen-Michel V-H, Frazzini V, et al. Seizures in autoimmune encephalitis: specific features from a systematic comparative study. *Epileptic Disorders*. sept 2021;.
- Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud P, Debanne D. Spike-Time Precision and Network Synchrony Are Controlled by the Homeostatic Regulation of the D-Type Potassium Current. *Journal of Neuroscience*. 22 sept 2010;30(38):12885-95.
- Dalmau J. NMDA receptor encephalitis and other antibody-mediated disorders of the synapse. *Neurology*. 6 déc 2016;87(23):2471-82.
- Dalmau J, Armangué T, Planagumà J, Radosevic M, Mannara F, Leypoldt F, et al. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet Neurol*. nov 2019;18(11):1045-57.
- Dalmau J, Geis C, Graus F. Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiological Reviews*. avr 2017;97(2):839-87.

- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* déc 2008;7(12):1091-8.
- Dazzo E, Fanciulli M, Serioli E, Minervini G, Pulitano P, Binelli S, et al. Heterozygous Reelin Mutations Cause Autosomal-Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *The American Journal of Human Genetics.* 4 juin 2015;96(6):992-1000.
- Delk K. Clinical Management of Seizures in Avian Patients. *Journal of Exotic Pet Medicine.* 1 avr 2012;21(2):132-9.
- Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol.* mai 2018;18(5):325-39.
- Depaulis A, David O, Charpier S. The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J Neurosci Methods.* 15 févr 2016;260:159-74.
- Diamond B, Huerta PT, Mina-Osorio P, Kowal C, Volpe BT. Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. *Nat Rev Immunol.* juin 2009;9(6):449-56.
- Dodson PD, Forsythe ID. Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends in Neurosciences.* avr 2004;27(4):210-7.
- Duan T, Verkman AS. Experimental animal models of aquaporin-4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders: progress and shortcomings. *Brain Pathol.* janv 2020;30(1):13-25.
- Dubey D, Britton J, McKeon A, Gadoth A, Zekeridou A, Lopez Chiriboga SA, et al. Randomized Placebo-Controlled Trial of Intravenous Immunoglobulin in Autoimmune LGI1/CASPR2 Epilepsy. *Ann Neurol.* févr 2020;87(2):313-23.
- Dubey D, Pittock SJ, Kelly CR, McKeon A, Lopez-Chiriboga AS, Lennon VA, et al. Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis: Autoimmune Encephalitis. *Ann Neurol.* janv 2018a;83(1):166-77.
- Dubey D, Toledano M, McKeon A. Clinical presentation of autoimmune and viral encephalitides: Current Opinion in Critical Care. avr 2018b;24(2):80-90.
- Dutra LA, Abrantes F, Toso FF, Pedroso JL, Barsottini OGP, Hoftberger R. Autoimmune encephalitis: a review of diagnosis and treatment. *Arq Neuropsiquiatr.* janv 2018;76(1):41-9.
- Edwards D, Handsley M, Pennington C. The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine.* oct 2008;29(5):258-89.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* 17 nov 2000;290(5495):1364-8.
- Estrada K, Whelan CW, Zhao F, Bronson P, Handsaker RE, Sun C, et al. A whole-genome sequence study identifies genetic risk factors for neuromyelitis optica. *Nat Commun.* 16 mai 2018;9(1):1929.

- Feyissa AM, Lamb C, Pittock SJ, Gadoth A, McKeon A, Klein CJ, et al. Antiepileptic drug therapy in autoimmune epilepsy associated with antibodies targeting the leucine-rich glioma-inactivated protein 1. *Epilepsia Open*. sept 2018;3(3):348-56.
- Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 17 janv 2017;88(3):296-303.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. avr 2014;55(4):475-82.
- Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. avr 2017;58(4):531-42.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. avr 2005;46(4):470-2.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*. 18 janv 2001;409(6818):341-6.
- Franke C, Ferse C, Kreye J, Reincke SM, Sanchez-Sendin E, Rocco A, et al. High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in COVID-19 patients with neurological symptoms. *Brain Behav Immun*. mars 2021;93:415-9.
- Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*. 22 sept 2006;313(5794):1792-5.
- Fukata Y, Chen X, Chiken S, Hirano Y, Yamagata A, Inahashi H, et al. LGI1–ADAM22–MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proc Natl Acad Sci USA*. 19 janv 2021;118(3):e2022580118.
- Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, et al. Disruption of LGI1–linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 févr 2010;107(8):3799-804.
- Furlan S, Roncaroli F, Forner F, Vitiello L, Calabria E, Piquer-Sirerol S, et al. The LGI1/Epitempin gene encodes two protein isoforms differentially expressed in human brain. *J Neurochem*. août 2006;98(3):985-91.
- Gabellini Nadia, Masola V, Quartesan S, Oselladore B, Nobile C, Michelucci R, et al. Increased expression of LGI1 gene triggers growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*. juin 2006;207(3):711-21.
- Gadoth A, Pittock SJ, Dubey D, McKeon A, Britton JW, Schmeling JE, et al. Expanded phenotypes and outcomes among 256 LGI1/CASPR2-IgG-positive patients. *Ann Neurol*. juill 2017;82(1):79-92.
- Gaig C, Graus F, Compta Y, Högl B, Bataller L, Brüggemann N, et al. Clinical manifestations of the anti-IgLON5 disease. *Neurology*. 2 mai 2017;88(18):1736-43.

- Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry*. 7 juin 1994;33(22):6834-9.
- Geis C, Planagumà J, Carreño M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Invest*. 1 mars 2019;129(3):926-40.
- Gelpi E, Höftberger R, Graus F, Ling H, Holton JL, Dawson T, et al. Neuropathological criteria of anti-IgLON5-related tauopathy. *Acta Neuropathol*. oct 2016;132(4):531-43.
- Ghimire P, Khanal UP, Gajurel BP, Karn R, Rajbhandari R, Paudel S, et al. Anti-LGI1, anti-GABABR, and Anti-CASPR2 encephalitides in Asia: A systematic review. *Brain and Behavior* [Internet]. oct 2020 [cité 5 mai 2021];10(10). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/brb3.1793>
- Gödde NJ, D'Abaco GM, Paradiso L, Novak U. Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 protein family members. *J Cell Sci*. 15 août 2006;119(Pt 16):3296-305.
- Goldberg EM, Clark BD, Zagha E, Nahmani M, Erisir A, Rudy B. K⁺ Channels at the Axon Initial Segment Dampen Near-Threshold Excitability of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons. *Neuron*. mai 2008;58(3):387-400.
- Gómez T, Bolaños A, López-García JA, Nicolau MC, Rial RV. A case report of spontaneous electrographic epilepsy in reptiles (*Gallotia galloti*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1 janv 1990;97(2):257-8.
- González-Burgos I, Velázquez-Zamora DA, Beas-Zárate C. Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. *Int J Dev Neurosci*. déc 2009;27(8):741-5.
- Goodfellow JA, Mackay GA. Autoimmune encephalitis. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. 2019;49(4):287-94.
- Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. sept 2019;16(9):535-48.
- Graus F, Escudero D, Oleaga L, Bruna J, Villarejo-Galende A, Ballabriga J, et al. Syndrome and outcome of antibody-negative limbic encephalitis. *Eur J Neurol*. août 2018;25(8):1011-6.
- Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *The Lancet Neurology*. avr 2016;15(4):391-404.
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Diagnosis and significance of antibody titers in anti-NMDA receptor encephalitis, a retrospective study. *Lancet Neurol*. févr 2014;13(2):167-77.
- Gu W, Brodtkorb E, Piepoli T, Finocchiaro G, Steinlein OK. LGI1: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics*. mai 2005;6(2):59-66.

- Gu W, Wevers A, Schröder H, Grzeschik K-H, Derst C, Brodtkorb E, et al. The LGI1 gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins. *FEBS Letters*. 22 mai 2002;519(1-3):71-6.
- Guan D, Lee JCF, Higgs MH, Spain WJ, Foehring RC. Functional roles of Kv1 channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. mars 2007;97(3):1931-40.
- Guan D, Lee JCF, Tkatch T, Surmeier DJ, Armstrong WE, Foehring RC. Expression and biophysical properties of Kv1 channels in supragranular neocortical pyramidal neurones. *J Physiol*. 1 mars 2006;571(Pt 2):371-89.
- Guan D, Pathak D, Foehring RC. Functional roles of Kv1-mediated currents in genetically identified subtypes of pyramidal neurons in layer 5 of mouse somatosensory cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1 août 2018;120(2):394-408.
- Gunthorpe MJ, Large CH, Sankar R. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy: Retigabine (Ezogabine) Mechanism of Action. *Epilepsia*. mars 2012;53(3):412-24.
- Hang H, Zhang J, Chen D, Lu J, Shi J. Clinical Characteristics of Cognitive Impairment and 1-Year Outcome in Patients With Anti-LGI1 Antibody Encephalitis. *Front Neurol*. 21 août 2020;11:852.
- Harutyunyan G, Hauer L, Dünser MW, Karamyan A, Moser T, Pikija S, et al. Autoimmune Encephalitis at the Neurological Intensive Care Unit: Etiologies, Reasons for Admission and Survival. *Neurocrit Care*. août 2017;27(1):82-9.
- Harvey AL, Robertson B. Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. *CMC*. 1 déc 2004;11(23):3065-72.
- Head K, Gong S, Joseph S, Wang C, Burkhardt T, Rossi MR, et al. Defining the expression pattern of the LGI1 gene in BAC transgenic mice. *Mamm Genome*. 24 juill 2007;18(5):328-37.
- Henley JM, Nair JD, Seager R, Yucel BP, Woodhall G, Henley BS, et al. Kainate and AMPA receptors in epilepsy: Cell biology, signalling pathways and possible crosstalk. *Neuropharmacology*. 1 sept 2021;195:108569.
- Herranz-Pérez V, Olucha-Bordonau FE, Morante-Redolat JM, Pérez-Tur J. Regional distribution of the leucine-rich glioma inactivated (LGI) gene family transcripts in the adult mouse brain. *Brain Research*. janv 2010;1307:177-94.
- Higgs MH, Spain WJ. Kv1 channels control spike threshold dynamics and spike timing in cortical pyramidal neurones: Kv1 channels control threshold dynamics. *The Journal of Physiology*. nov 2011;589(21):5125-42.
- Hivert B, Marien L, Agbam KN, Faivre-Sarrailh C. ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *J Cell Sci*. 16 janv 2019;132(2).

- Höftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, Dome B, Rózsás A, Hegedus B, et al. Encephalitis and GABAB receptor antibodies: novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*. 22 oct 2013;81(17):1500-6.
- Hotka M, Kubista H. The paroxysmal depolarization shift in epilepsy research. *Int J Biochem Cell Biol*. févr 2019;107:77-81.
- Husari KS, Dubey D. Autoimmune Epilepsy. *Neurotherapeutics*. juill 2019;16(3):685-702.
- Ilyas-Feldmann M, Prüß H, Holtkamp M. Long-term seizure outcome and antiseizure medication use in autoimmune encephalitis. *Seizure*. mars 2021;86:138-43.
- Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. 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*. sept 2010;133(9):2734-48.
- Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, et al. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Annals of Neurology*. mai 2011;69(5):892-900.
- Irani SR, Stagg CJ, Schott JM, Rosenthal CR, Schneider SA, Pettingill P, et al. Faciobrachial dystonic seizures: the influence of immunotherapy on seizure control and prevention of cognitive impairment in a broadening phenotype. *Brain*. oct 2013;136(10):3151-62.
- Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Boneschi FM, et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet*. mars 2002;30(3):335-41.
- Kalamangalam GP, Tandon N. Stereo-EEG Implantation Strategy. *J Clin Neurophysiol*. déc 2016;33(6):483-9.
- Keime-Guibert F, Graus F, Fleury A, René R, Honnorat J, Broet P, et al. Treatment of paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal antibodies (Anti-Hu, anti-Yo) with a combination of immunoglobulins, cyclophosphamide, and methylprednisolone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. avr 2000;68(4):479-82.
- Kim T-J, Lee S-T, Moon J, Sunwoo J-S, Byun J-I, Lim J-A, et al. Anti-LGI1 encephalitis is associated with unique HLA subtypes: HLA Subtypes in Anti-LGI1 Encephalitis. *Annals of Neurology*. févr 2017;81(2):183-92.
- Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*. déc 2001;11(6):725-32.
- Kole MJ, Qian J, Waase MP, Klassen TL, Chen TT, Augustine GJ, et al. Selective Loss of Presynaptic Potassium Channel Clusters at the Cerebellar Basket Cell Terminal Pinceau in Adam11 Mutants Reveals Their Role in Ephaptic Control of Purkinje Cell Firing. *Journal of Neuroscience*. 12 août 2015;35(32):11433-44.
- Koneczny I. A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol*. 2018;9:97.

- Kornau H, Kreye J, Stumpf A, Fukata Y, Parthier D, Sammons RP, et al. Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGI1 Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *Annals of Neurology*. mars 2020;87(3):405-18.
- Krex D, Hauses M, Appelt H, Mohr B, Ehninger G, Schackert H, et al. Physical and functional characterization of the human LGI1 gene and its possible role in glioma development. *Acta Neuropathol*. mars 2002;103(3):255-66.
- Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, et al. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain*. oct 2016;139(Pt 10):2641-52.
- Kunapuli P, Chitta KS, Cowell JK. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene*. juin 2003;22(26):3985-91.
- Kunapuli P, Kasyapa CS, Hawthorn L, Cowell JK. LGI1, a Putative Tumor Metastasis Suppressor Gene, Controls in Vitro Invasiveness and Expression of Matrix Metalloproteinases in Glioma Cells through the ERK1/2 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. mai 2004;279(22):23151-7.
- Kusuzawa S, Honda T, Fukata Y, Fukata M, Kanatani S, Tanaka DH, et al. Leucine-rich glioma inactivated 1 (Lgi1), an epilepsy-related secreted protein, has a nuclear localization signal and localizes to both the cytoplasm and the nucleus of the caudal ganglionic eminence neurons: Nuclear translocation of Lgi1. *European Journal of Neuroscience*. août 2012;36(3):2284-92.
- Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies: Definition of Drug Resistant Epilepsy. *Epilepsia*. 3 nov 2009;51(6):1069-77.
- Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *The Lancet Neurology*. août 2010;9(8):776-85.
- Lancaster E, Burnor E, Zhang J, Lancaster E. ADAM23 is a negative regulator of Kv1.1/Kv1.4 potassium currents. *Neuroscience Letters*. juin 2019;704:159-63.
- Landa J, Guasp M, Míguez-Cabello F, Guimarães J, Mishima T, Oda F, et al. Encephalitis with Autoantibodies against the Glutamate Kainate Receptors GluK2. *Ann Neurol*. juill 2021;90(1):101-17.
- Langlois M, Polack P-O, Bernard H, David O, Charpier S, Depaulis A, et al. Involvement of the thalamic parafascicular nucleus in mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 8 déc 2010;30(49):16523-35.
- Leach JP, Mohanraj R, Borland W. Alcohol and drugs in epilepsy: pathophysiology, presentation, possibilities, and prevention. *Epilepsia*. sept 2012;53 Suppl 4:48-57.
- Lebrun-Julien F, Bachmann L, Norrmén C, Trötz Müller M, Köfeler H, Rüegg MA, et al. Balanced mTORC1 activity in oligodendrocytes is required for accurate CNS myelination. *J Neurosci*. 18 juin 2014;34(25):8432-48.

- Leonardi E, Andreatza S, Vanin S, Busolin G, Nobile C, Tosatto SCE. A Computational Model of the LGI1 Protein Suggests a Common Binding Site for ADAM Proteins. Langowski J, éditeur. PLoS ONE. 29 mars 2011;6(3):e18142.
- Levite M. Autoimmune epilepsy. *Nat Immunol.* juin 2002;3(6):500.
- Li K-X, Lu Y-M, Xu Z-H, Zhang J, Zhu J-M, Zhang J-M, et al. Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat Neurosci.* févr 2012;15(2):267-73.
- Li T-R, Zhang Y-D, Wang Q, Shao X-Q, Lyu D-Y, Lv R-J. Clinical Characteristics and Long-Term Prognosis of Anti-LGI1 Encephalitis: A Single-Center Cohort Study in Beijing, China. *Front Neurol.* 2021;12:674368.
- Lin N, Liu Q, Chen J, Jin L, Huang Y, Lu Q, et al. Long-term seizure outcomes in patients with anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 encephalitis. *Epilepsy Behav.* 3 juill 2021;122:108159.
- Linnoila J, Pulli B, Armangué T, Planagumà J, Narsimhan R, Schob S, et al. Mouse model of anti-NMDA receptor post-herpes simplex encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* mars 2019;6(2):e529.
- Linnoila JJ, Binnicker MJ, Majed M, Klein CJ, McKeon A. CSF herpes virus and autoantibody profiles in the evaluation of encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* août 2016;3(4):e245.
- Liu H, Shim AHR, He X. Structural Characterization of the Ectodomain of a Disintegrin and Metalloproteinase-22 (ADAM22), a Neural Adhesion Receptor Instead of Metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry.* oct 2009;284(42):29077-86.
- Liu X, Han Y, Yang L, Wang B, Shao S, Feng Y, et al. The exploration of the spectrum of motor manifestations of anti-LGI1 encephalitis beyond FBDS. *Seizure.* mars 2020;76:22-7.
- Locke CJ, Caldwell KA, Caldwell GA. The Nematode, *Caenorhabditis elegans*, as an Emerging Model for Investigating Epilepsy. In: Baraban SC, éditeur. *Animal Models of Epilepsy: Methods and Innovations* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cité 18 août 2021]. p. 1-25. (Neuromethods). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-263-6_1
- Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA. The LGI1–ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28 juill 2015;112(30):E4129-37.
- Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* déc 2000;1(3):173-80.
- Maffie JK, Dvoretzkova E, Bougis PE, Martin-Eauclaire M-F, Rudy B. Dipeptidyl-peptidase-like-proteins confer high sensitivity to the scorpion toxin AmmTX3 to Kv4-mediated A-type K⁺ channels. *J Physiol.* 15 mai 2013;591(10):2419-27.
- Mankarious S, Lee M, Fischer S, Pyun KH, Ochs HD, Oxelius VA, et al. The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are

- receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med.* nov 1988;112(5):634-40.
- Michelucci R, Pasini E, Malacrida S, Striano P, Bonaventura CD, Pulitano P, et al. Low penetrance of autosomal dominant lateral temporal epilepsy in Italian families without *LGII* mutations. *Epilepsia.* juill 2013;54(7):1288-97.
- Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, Feo MR de, Binelli S, Bisulli F, et al. Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: Clinical Spectrum, New Epitempin Mutations, and Genetic Heterogeneity in Seven European Families: FAMILIAL LATERAL TEMPORAL EPILEPSY. *Epilepsia.* 22 sept 2003;44(10):1289-97.
- Morante-Redolat JM. Mutations in the *LGII*/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Human Molecular Genetics.* 1 mai 2002;11(9):1119-28.
- Mueller SH, Färber A, Prüss H, Melzer N, Golombeck KS, Kümpfel T, et al. Genetic predisposition in anti-*LGII* and anti-NMDA receptor encephalitis: GWAS Autoimmune Encephalitis. *Ann Neurol.* avr 2018;83(4):863-9.
- Muñiz-Castrillo S, Haesebaert J, Thomas L, Vogrig A, Pinto A-L, Picard G, et al. Clinical and Prognostic Value of Immunogenetic Characteristics in Anti-*LGII* Encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* mai 2021;8(3):e974.
- Navarro V, Kas A, Apartis E, Chami L, Rogemond V, Levy P, et al. Motor cortex and hippocampus are the two main cortical targets in *LGII*-antibody encephalitis. *Brain.* avr 2016;139(4):1079-93.
- van der Neut Kolfshoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 14 sept 2007;317(5844):1554-7.
- Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia.* mai 2010;51(5):883-90.
- Nobile C, Michelucci R, Andreazza S, Pasini E, Tosatto SCE, Striano P. *LGII* mutations in autosomal dominant and sporadic lateral temporal epilepsy. *Hum Mutat.* avr 2009;30(4):530-6.
- Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, et al. Autoantibodies to Epilepsy-Related *LGII* in Limbic Encephalitis Neutralize *LGII*-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience.* 13 nov 2013;33(46):18161-74.
- Ong M-S, Kohane IS, Cai T, Gorman MP, Mandl KD. Population-level evidence for an autoimmune etiology of epilepsy. *JAMA Neurol.* mai 2014;71(5):569-74.
- Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen J-M. FieldTrip: Open Source Software for Advanced Analysis of MEG, EEG, and Invasive Electrophysiological Data. *Computational Intelligence and Neuroscience.* 2011;2011:1-9.

- von Ossowski L, Tossavainen H, von Ossowski I, Cai C, Aitio O, Fredriksson K, et al. Peptide binding and NMR analysis of the interaction between SAP97 PDZ2 and GluR-A: potential involvement of a disulfide bond. *Biochemistry*. 2 mai 2006;45(17):5567-75.
- Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, et al. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet*. mai 1995;10(1):56-60.
- Ovsepian SV, LeBerre M, Steuber V, O'Leary VB, Leibold C, Oliver Dolly J. Distinctive role of KV1.1 subunit in the biology and functions of low threshold K⁺ channels with implications for neurological disease. *Pharmacology & Therapeutics*. mars 2016;159:93-101.
- Ovsepian SV, Steuber V, Le Berre M, O'Hara L, O'Leary VB, Dolly JO. A defined heteromeric K_v 1 channel stabilizes the intrinsic pacemaking and regulates the output of deep cerebellar nuclear neurons to thalamic targets: K_v 1 channel governs cerebellar output to thalamus. *The Journal of Physiology*. 1 avr 2013;591(7):1771-91.
- Owuor K, Harel NY, Englot DJ, Hisama F, Blumenfeld H, Strittmatter SM. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. *Molecular and Cellular Neuroscience*. nov 2009;42(4):448-57.
- Pakozdy A, Patzl M, Zimmermann L, Jokinen TS, Glantschnigg U, Kelemen A, et al. LGI Proteins and Epilepsy in Human and Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. juill 2015;29(4):997-1005.
- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, et al. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry*. oct 2019;24(10):1489-501.
- Paxinos G, Watson CR. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. 1986;
- Peng X, Hughes EG, Moscato EH, Parsons TD, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular plasticity induced by anti- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor encephalitis antibodies. *Ann Neurol*. mars 2015;77(3):381-98.
- Petit-Pedrol M, Sell J, Planagumà J, Mannara F, Radosevic M, Haselmann H, et al. LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain* [Internet]. 20 oct 2018 [cité 5 mai 2021]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/brain/advance-article/doi/10.1093/brain/awy253/5140106>
- Piepoli T, Jakupoglu C, Gu W, Lualdi E, Suarez-Merino B, Poliani PL, et al. Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro-Oncology*. 1 avr 2006;8(2):96-108.
- Planagumà J, Leyboldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain*. janv 2015;138(1):94-109.
- Platt MP, Agalliu D, Cutforth T. Hello from the Other Side: How Autoantibodies Circumvent the Blood-Brain Barrier in Autoimmune Encephalitis. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:442.

- Potschka H, Fischer A, Löscher W, Patterson N, Bhatti S, Berendt M, et al. International veterinary epilepsy task force consensus proposal: outcome of therapeutic interventions in canine and feline epilepsy. *BMC Veterinary Research*. 28 août 2015;11(1):177.
- Pratt KG, Khakhalin AS. Modeling human neurodevelopmental disorders in the *Xenopus* tadpole: from mechanisms to therapeutic targets. *Dis Model Mech*. sept 2013;6(5):1057-65.
- Prince DA. The depolarization shift in « epileptic » neurons. *Exp Neurol*. août 1968;21(4):467-85.
- Prüss H. Autoantibodies in neurological disease. *Nat Rev Immunol*. mai 2021;
- Prüss H, Finke C, Höltje M, Hofmann J, Klingbeil C, Probst C, et al. N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. *Ann Neurol*. déc 2012;72(6):902-11.
- Qiao S, Wu H, Liu L, Wang M, Zhang R, Han T, et al. Clinical Features and Long-Term Outcomes of Anti-Leucine-Rich Glioma-Inactivated 1 Encephalitis: A Multi-Center Study. *NDT*. janv 2021a;Volume 17:203-12.
- Qiao S, Wu H-K, Liu L-L, Zhang R-R, Wang M-L, Han T, et al. Characteristics and Prognosis of Autoimmune Encephalitis in the East of China: A Multi-Center Study. *Front Neurol*. 2021b;12:642078.
- Ramanathan S, Al-Diwani A, Waters P, Irani SR. The autoantibody-mediated encephalitides: from clinical observations to molecular pathogenesis. *Journal of Neurology*. mai 2021a;268(5):1689-707.
- Ramanathan S, Tseng M, Davies AJ, Uy CE, Paneva S, Mgbachi VC, et al. LGI1- versus CASPR2-antibody neuropathic pain: clinical and biological comparisons. *Ann Neurol*. 9 août 2021b;.
- Ramberger M, Berretta A, Tan JMM, Sun B, Michael S, Yeo T, et al. Distinctive binding properties of human monoclonal LGI1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain*. 1 juin 2020;143(6):1731-45.
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. mai 2009;10(5):514-23.
- Ribeiro PAO, Sbragia L, Gilioli R, Langone F, Conte FF, Lopes-Cendes I. Expression Profile of *Lgi1* Gene in Mouse Brain During Development. *J Mol Neurosci*. juill 2008;35(3):323-9.
- Rosanoff MJ, Ottman R. Penetrance of LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology*. 19 août 2008;71(8):567-71.
- Sagane K, Hayakawa K, Kai J, Hirohashi T, Takahashi E, Miyamoto N, et al. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neuroscience*. 6 mai 2005;6(1):33.

- Sagane K, Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23 k. 1999;8.
- Saint-Martin M, Pieters A, Déchelotte B, Malleval C, Pinatel D, Pascual O, et al. Impact of anti-CASPR2 autoantibodies from patients with autoimmune encephalitis on CASPR2/TAG-1 interaction and Kv1 expression. *J Autoimmun.* sept 2019;103:102284.
- Saras A, Wu VV, Brawer HJ, Tanouye MA. Investigation of Seizure-Susceptibility in a *Drosophila melanogaster* Model of Human Epilepsy with Optogenetic Stimulation. *Genetics.* 1 août 2017;206(4):1739-46.
- Savtchenko LP, Rusakov DA. The optimal height of the synaptic cleft. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 févr 2007;104(6):1823-8.
- Scheel H. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Human Molecular Genetics.* 15 juill 2002;11(15):1757-62.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* avr 2017;58(4):512-21.
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Bredt DS, Nicoll RA. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 oct 2002;99(21):13902-7.
- Schubert J, Brämer D, Huttner HB, Gerner ST, Fuhrer H, Melzer N, et al. Management and prognostic markers in patients with autoimmune encephalitis requiring ICU treatment. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* janv 2019;6(1):e514.
- Schulte U, Thumfart J-O, Klöcker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, et al. The epilepsy-linked *Lgi1* protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by *Kvbeta1*. *Neuron.* 2 mars 2006;49(5):697-706.
- Seagar M, Russier M, Caillard O, Maulet Y, Fronzaroli-Molinieres L, De San Feliciano M, et al. *LGI1* tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 18 juill 2017;114(29):7719-24.
- Sell J, Haselmann H, Hallermann S, Hust M, Geis C. Autoimmune encephalitis: novel therapeutic targets at the preclinical level. *Expert Opin Ther Targets.* janv 2021;25(1):37-47.
- Senechal KR, Thaller C, Noebels JL. ADPEAF mutations reduce levels of secreted *LGI1*, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Human Molecular Genetics.* 15 juin 2005;14(12):1613-20.
- Shan W, Yang H, Wang Q. Neuronal Surface Antibody-Medicated Autoimmune Encephalitis (Limbic Encephalitis) in China: A Multiple-Center, Retrospective Study. *Front Immunol.* 2021;12:621599.
- Shen C, Fang G, Yang F, Cai M, Zheng Y, Fang W, et al. Seizures and risk of epilepsy in anti-NMDAR, anti-LGI1, and anti-GABABR encephalitis. *Ann Clin Transl Neurol.* août 2020;7(8):1392-9.

- Shu Y, Qiu W, Zheng J, Sun X, Yin J, Yang X, et al. HLA class II allele DRB1*16:02 is associated with anti-NMDAR encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. juin 2019;90(6):652-8.
- Silva J, Qin H, Cowell JK. Selective inactivation of LGI1 in neuronal precursor cells leads to cortical dysplasia in mice. *genesis*. févr 2019;57(2):e23268.
- Silva J, Sharma S, Cowell JK. Homozygous Deletion of the LGI1 Gene in Mice Leads to Developmental Abnormalities Resulting in Cortical Dysplasia: Loss of LGI1 Leads to Cortical Dysplasia. *Brain Pathology*. sept 2015;25(5):587-97.
- Silva J, Sharma S, Hughes B, Yu YE, Cowell JK. Homozygous inactivation of the *LGII* gene results in hypomyelination in the peripheral and central nervous systems: Hypomyelination in *LGII* Null Mice. *J Neurosci Res*. 15 nov 2010;88(15):3328-36.
- Silva J, Wang G, Cowell JK. The temporal and spatial expression pattern of the LGI1 epilepsy predisposition gene during mouse embryonic cranial development. *BMC Neurosci*. 2011;12(1):43.
- Singh A, Trevick S. The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurol Clin*. nov 2016;34(4):837-47.
- Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Pérez V, Favell K, Barker PA, et al. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Human Molecular Genetics*. 1 déc 2006;15(23):3436-45.
- Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, et al. Deletion of the KV1.1 Potassium Channel Causes Epilepsy in Mice. *Neuron*. avr 1998;20(4):809-19.
- Smedfors G, Olson L, Karlsson TE. A Nogo-Like Signaling Perspective from Birth to Adulthood and in Old Age: Brain Expression Patterns of Ligands, Receptors and Modulators. *Front Mol Neurosci*. 19 févr 2018;11:42.
- Smith KM, Dubey D, Liebo GB, Flanagan EP, Britton JW. Clinical Course and Features of Seizures Associated With LGI1-Antibody Encephalitis. *Neurology*. 7 juill 2021;10.1212/WNL.0000000000012465.
- Somerville RPT, Chernova O, Liu S, Shoshan Y, Cowell JK. Identification of the promoter, genomic structure, and mouse ortholog of LGI1. *Mammalian Genome*. août 2000;11(8):622-7.
- van Sonderen A, Roelen DL, Stoop JA, Verdijk RM, Haasnoot GW, Thijs RD, et al. Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4: Anti-LGI1 Encephalitis. *Ann Neurol*. févr 2017;81(2):193-8.
- van Sonderen A, Schreurs MWJ, de Bruijn MAAM, Boukhrissi S, Nagtzaam MMP, Hulsenboom ESP, et al. The relevance of VGKC positivity in the absence of LGI1 and Caspr2 antibodies. *Neurology*. 3 mai 2016a;86(18):1692-9.
- van Sonderen A, Thijs RD, Coenders EC, Jiskoot LC, Sanchez E, de Bruijn MAAM, et al. Anti-LGI1 encephalitis: Clinical syndrome and long-term follow-up. *Neurology*. 4 oct 2016b;87(14):1449-56.

- Staub E, Pérez-Tur J, Siebert R, Nobile C, Moschonas NK, Deloukas P, et al. The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends in Biochemical Sciences*. sept 2002;27(9):441-4.
- Steriade C, Britton J, Dale RC, Gadoth A, Irani SR, Linnoila J, et al. Acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis and autoimmune-associated epilepsy: Conceptual definitions. *Epilepsia*. juill 2020;61(7):1341-51.
- Striano P, Busolin G, Santulli L, Leonardi E, Coppola A, Vitiello L, et al. Familial temporal lobe epilepsy with psychic auras associated with a novel LGI1 mutation. *Neurology*. 29 mars 2011;76(13):1173-6.
- Sun B, Ramberger M, O'Connor KC, Bashford-Rogers RJM, Irani SR. The B cell immunobiology that underlies CNS autoantibody-mediated diseases. *Nat Rev Neurol*. sept 2020;16(9):481-92.
- Tan T, Watts SW, Davis RP. Drug Delivery: Enabling Technology for Drug Discovery and Development. *iPRECIO Micro Infusion Pump: Programmable, Refillable, and Implantable*. *Front Pharmacol*. 2011;2:44.
- Taraschenko O, Fox HS, Pittock SJ, Zekeridou A, Gafurova M, Eldridge E, et al. A mouse model of seizures in anti-*N*-methyl-*D*-aspartate receptor encephalitis. *Epilepsia*. mars 2019;60(3):452-63.
- Thomas R, Favell K, Morante-Redolat J, Pool M, Kent C, Wright M, et al. LGI1 Is a Nogo Receptor 1 Ligand that Antagonizes Myelin-Based Growth Inhibition. *Journal of Neuroscience*. 12 mai 2010;30(19):6607-12.
- Thomas RA, Gibon J, Chen CXQ, Chierzi S, Soubannier VG, Baulac S, et al. The Nogo Receptor Ligand LGI1 Regulates Synapse Number and Synaptic Activity in Hippocampal and Cortical Neurons. *eNeuro*. juill 2018;5(4):ENEURO.0185-18.2018.
- Thompson J, Bi M, Murchison AG, Makuch M, Bien CG, Chu K, et al. The importance of early immunotherapy in patients with faciobrachial dystonic seizures. *Brain*. 1 févr 2018;141(2):348-56.
- Timofeev I, Grenier F, Steriade M. Contribution of Intrinsic Neuronal Factors in the Generation of Cortically Driven Electrographic Seizures. *Journal of Neurophysiology*. 1 août 2004;92(2):1133-43.
- Trimmer JS. Subcellular Localization of K⁺ Channels in Mammalian Brain Neurons: Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron*. janv 2015;85(2):238-56.
- Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol*. déc 2009;118(6):737-43.
- Varghese N, Lauritano A, Tagliatalata M, Tzingounis AV. KCNQ3 is the principal target of retigabine in CA1 and subicular excitatory neurons. *Journal of Neurophysiology*. 1 avr 2021;125(4):1440-9.

- Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Loring AS, Sejvar J, Bitnun A, et al. Case Definitions, Diagnostic Algorithms, and Priorities in Encephalitis: Consensus Statement of the International Encephalitis Consortium. *Clinical Infectious Diseases*. 15 oct 2013;57(8):1114-28.
- Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux P-M, Blümcke I, Sander JW, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol*. févr 2016;131(2):211-34.
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520.
- Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar B, Detert N, et al. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain*. mars 2004;127(3):701-12.
- Wang FC, Bell N, Reid P, Smith LA, McIntosh P, Robertson B, et al. Identification of residues in dendrotoxin K responsible for its discrimination between neuronal K⁺ channels containing Kv1.1 and 1.2 alpha subunits. *Eur J Biochem*. juill 1999;263(1):222-9.
- Wennberg R, Steriade C, Chen R, Andrade D. Frontal infraslow activity marks the motor spasms of anti-LGI1 encephalitis. *Clinical Neurophysiology*. janv 2018;129(1):59-68.
- Werner C, Pauli M, Doose S, Weishaupt A, Haselmann H, Grünwald B, et al. Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition. *Brain*. févr 2016;139(Pt 2):365-79.
- Wills ZP, Mandel-Brehm C, Mardinly AR, McCord AE, Giger RJ, Greenberg ME. The nogo receptor family restricts synapse number in the developing hippocampus. *Neuron*. 9 févr 2012;73(3):466-81.
- Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Probing the extracellular diffusion of antibodies in brain using in vivo integrative optical imaging and ex vivo fluorescence imaging. *Journal of Controlled Release*. janv 2015;197:78-86.
- Würdemann T, Kersten M, Tokay T, Guli X, Kober M, Rohde M, et al. Stereotactic injection of cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis into rat dentate gyrus impairs NMDA receptor function. *Brain Research*. févr 2016;1633:10-8.
- Xie Y-J, Zhou L, Jiang N, Zhang N, Zou N, Zhou L, et al. Essential roles of leucine-rich glioma inactivated 1 in the development of embryonic and postnatal cerebellum. *Sci Rep*. juill 2015;5(1):7827.
- Xie Y-J, Zhou L, Wang Y, Jiang N-W, Cao S, Shao C-Y, et al. Leucine-Rich Glioma Inactivated 1 Promotes Oligodendrocyte Differentiation and Myelination via TSC-mTOR Signaling. *Front Mol Neurosci*. 6 juill 2018;11:231.
- Yamagata A, Fukai S. Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1–ADAM22. *Cell Mol Life Sci*. janv 2020;77(2):267-74.
- Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, Shigematsu H, Sato Y, Goto-Ito S, et al. Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nat Commun*. déc 2018;9(1):1546.

- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 5 sept 2002;419(6902):35-42.
- Yger P, Spampinato GL, Esposito E, Lefebvre B, Deny S, Gardella C, et al. A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with ground truth recordings in vitro and in vivo. *Elife*. 2018;7:e34518.
- Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, et al. Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat Med*. janv 2015;21(1):19-26.
- Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Masaki K, Sato S, et al. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. janv 2013;84(1):29-34.
- Yu YE, Wen L, Silva J, Li Z, Head K, Sossey-Alaoui K, et al. *Lgi1* null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability. *Human Molecular Genetics*. 1 mai 2010;19(9):1702-11.
- Zhang T-Y, Cai M-T, Zheng Y, Lai Q-L, Shen C-H, Qiao S, et al. Anti-Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor Encephalitis: A Review. *Front Immunol*. 21 mai 2021;12:652820.
- Zhao Q, Sun L, Zhao D, Chen Y, Li M, Lu Y, et al. Clinical features of anti-leucine-rich glioma-inactivated 1 encephalitis in northeast China. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. avr 2021;203:106542.
- Zhou L, Zhou L, Su L, Cao S-L, Xie Y-J, Wang N, et al. Celecoxib Ameliorates Seizure Susceptibility in Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *J Neurosci*. 28 mars 2018;38(13):3346-57.

RÉSUMÉ

L'épilepsie est une maladie fréquente, qui touche plus de 50 millions de personnes dans le monde, et dont les causes et les pronostics sont très variés. Certaines épilepsies sont causées par des encéphalites auto-immunes (EAI), qui exposent à des séquelles neurologiques graves en l'absence de l'instauration précoce d'une immunothérapie. En 2010, la protéine *Leucine-riche, glioma inactivated 1* (LGI1) a été identifiée comme la cible d'auto-anticorps dans un sous-groupe d'EAI, dont les principaux symptômes sont des crises d'épilepsie. Les EAI associées aux anticorps anti-LGI1 s'expriment par des crises motrices toniques dystoniques (TDS), pathognomoniques et atypiques, et des crises limbiques communes aux autres encéphalites. Les mécanismes à l'origine des crises sont mal connus. Plusieurs études ont montré un rôle pathogène direct des anticorps anti-LGI1, par une altération de l'expression et de la fonction des canaux Kv1 et des récepteurs AMPA. Toutefois, le lien entre ces perturbations et les crises d'épilepsie n'a jamais été établi.

L'objectif de ma thèse a été de déterminer si les auto-anticorps anti-LGI1 étaient responsables des crises d'épilepsie chez les patients, et par quels mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Pour cela, mon travail s'est décliné en 3 axes.

1/ J'ai d'abord étudié le rôle des auto-anticorps anti-LGI1 dans la genèse des crises, *via* des injections *in vivo* chez le rongeur. J'ai purifié les anticorps à partir de sérum de patients LGI1 et de patients contrôles. Puis j'ai réalisé des injections aiguës ou chroniques, de LCR de patients ou d'IgG sériques purifiées, chez la souris et le rat. Les enregistrements électrophysiologiques, par des électrodes EEG de surface ou des électrodes intracrâniennes dans le site d'injection, n'ont pas permis de mettre en évidence d'activité épileptique.

2/ Compte tenu de l'absence de crises induites par le transfert passif *in vivo* d'anticorps, ce qui a été confirmé depuis par deux autres équipes de recherche, je me suis tourné vers une autre stratégie, pour inhiber les canaux Kv1 sans utiliser d'auto-anticorps. *Via* des injections *in vivo* de dendrotoxine-K (DTX), un inhibiteur spécifique de Kv1.1, dans le cortex moteur primaire de rats adultes, j'ai cherché à reproduire de manière indirecte les perturbations observées jusqu'alors *in vitro* induites par les anticorps anti-LGI1. Cette approche a permis de reproduire chez le rat les TDS pathognomoniques de l'EAI à anticorps anti-LGI1. J'ai pu retrouver des caractéristiques cliniques et EEG communes, en comparant les données de ce modèle animal à celles d'une cohorte de 12 patients ayant eu des TDS enregistrées lors de cessions EEG-EMG-vidéo. J'ai pu également montrer que les TDS des rats pouvaient être bloquées par la rétigabine, un médicament antiépileptique potentialisant les canaux K^+ dépendant du voltage.

3/ Le nouveau modèle de TDS induites par DTX m'a permis d'explorer les mécanismes neuronaux sous-tendant les TDS. Ma stratégie a consisté à réaliser des enregistrements neuronaux extracellulaires et intracellulaires *in vivo* chez le rat sédaté, après injection de DTX. Cela m'a permis de décrire les activités neuronales associées aux TDS, et de mettre en évidence un scénario neuronal qui pourrait expliquer la fréquence élevée de ces crises et leur survenue régulière.

Mon travail de thèse a montré le rôle central de la perturbation de Kv1.1 dans l'émergence des TDS et suggère que la potentialisation de courants K^+ neuronaux pourrait être une stratégie efficace comme traitement des crises dans la prise en charge précoce de l'EAI à anticorps anti-LGI1. Le nouveau modèle animal *in vivo* pourrait aider au développement de futures recherches pour mieux caractériser les mécanismes de l'ictogénèse dans cette EAI fréquente.