



HAL
open science

Le rôle de la protéine LGI1 dans la régulation du réseau neuronal dans l'hippocampe

Elodie Fels

► **To cite this version:**

Elodie Fels. Le rôle de la protéine LGI1 dans la régulation du réseau neuronal dans l'hippocampe. Neurosciences. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1315 . tel-03771827

HAL Id: tel-03771827

<https://theses.hal.science/tel-03771827>

Submitted on 7 Sep 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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1315

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 476
Neurosciences et Cognition (NSCo)

Spécialité de doctorat : Neurosciences
Discipline : Neuroimmunologie

Soutenue publiquement le 10/12/2021, par :
Elodie Fels

Le rôle de la protéine LGI1 dans la régulation du réseau neuronal dans l'hippocampe

Devant le jury composé de :

Baulac, Stéphanie

Directrice de Recherche, INSERM

Présidente du jury

Charrier, Cécile
Faivre-Sarrailh, Catherine
Honorat, Jérôme

Chargée de Recherche INSERM
Directrice de Recherche CNRS
PU-PH, Hospices Civils de Lyon

Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur

Pascual, Olivier

Chargé de Recherche INSERM

Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

A mes parents et mes grand-parents

Remerciements :

Je tiens avant tout à remercier les membres de mon jury les docteurs Cécile Charrier, Catherine Faivre-Sarrailh et Stéphanie Baulac pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre temps et votre investissement.

Je remercie le professeur Sylvain Rheims et le docteur Christophe Heinrich d'avoir accepté d'être les membres de mon comité de suivi de thèse et par conséquent d'avoir pris le temps de m'écouter et de me conseiller afin de mener à bien mon projet.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je remercie le professeur Jérôme Honnorat pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail de thèse au sein de son équipe de recherche. Merci pour le temps que vous avez accordé à mon travail et pour vos conseils.

J'adresse un très grand merci à mon directeur de thèse Olivier Pascual. Merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir confié ce projet de thèse. Merci pour ton temps, pour tes conseils, et ton accompagnement. J'ai appris beaucoup de choses durant ces 5 dernières années et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai croisées et qui m'ont permises d'en arriver là où j'en suis. Je pense plus particulièrement aux chercheurs et chercheuses qui m'ont accueilli au cours de stages au sein de leur laboratoire pour me transmettre leurs connaissances et qui m'ont également transmis leur passion.

Je tiens évidemment à remercier toutes les personnes de l'équipe Synatac pour tous ces moments passés avec vous et toutes ces discussions enrichissantes. Merci à Claire pour toutes tes questions et ta disponibilité, à Nelly et Véronique pour votre bienveillance, à Roger pour tes conseils, à Naura pour ton humour et ton savoir en culture cellulaire, à Sergio et Alberto pour vos lumières précieuses sur les encéphalites limbiques, à Do pour ta bonne volonté à aider et tes connaissances en biochimie et biologie moléculaire. Merci aux personnes avec qui j'ai partagé le même bureau, à Fabrice et Clémentine pour ces discussions, à Céline pour ton aide et pour m'avoir formé sur la microscopie super-résolution, à Marie-Eve, avec qui j'ai partagé beaucoup de bons moments et qui a été d'une grande aide. Merci aux anciens du labo : Margaux et Benoit, vous avez amplement contribué aux bons souvenirs que j'ai de ces dernières années. Merci aux membres de l'association YRIN avec qui ça a été un vrai plaisir d'organiser congrès et évènements. J'ai rencontré des personnes formidables dans le bureau de cette association !

Merci à mes collègues doctorantes. Kassandre, Mélisse, Sarah et Priscille pour tous les bons moments que nous avons passés toutes ensemble et pour votre soutien ! Un merci particulier pour Sarah qui a eu la grande gentillesse de prendre le temps de relire mon manuscrit pour y corriger les fautes d'orthographe.

Bien évidemment, merci Pauline. Malgré ton 1^{er} degré et les nombreuses blagues incomprises, tu as toujours été présente et tu as été d'un soutien infailible. Tu m'as aidé avec beaucoup de bonne volonté. Merci infiniment pour ton écoute et tes conseils. Tu es devenue une vraie amie sans qui cette thèse n'aurait pas été pareil...

Merci aux copines de la danse, particulièrement Mathilde, Alexandra et Morgane, vous avez pleinement contribué à ma santé mentale durant des périodes parfois plus difficiles que d'autres.

Merci à mes amis Lucie, Axel, Pauline, Manon F, Félicie, Céline, Thomas, Baptiste, Alice et Manon V. Merci pour tout, pour votre présence, votre soutien, vos conseils et pour ces moments passés avec vous qui ont fait beaucoup.

Un grand merci à toi Laurent. Je ne sais pas s'il y a des mots justes pour expliquer à quel point ton soutien et ton aide ont été précieux. Tu as été un vrai pilier. Merci pour le temps que tu as passé à m'aider et à relire mon manuscrit. Merci pour tout...

Enfin merci à ma famille. Merci à ma sœur Audrey, ton aide en statistiques n'a peut-être pas été grand-chose pour toi mais pour moi c'était beaucoup. Merci à mes grands-parents d'avoir toujours été fiers de moi et de m'avoir soutenu. Merci à mes parents de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même pour réussir et de m'avoir enseigné des valeurs de travail et d'investissement. Merci d'avoir cru en moi. J'espère vous rendre fière par ce travail.

Résumé :

La protéine LGI1 est une protéine neuronale sécrétée, exprimée dans le système nerveux central, principalement au niveau de l'hippocampe. Des perturbations de la fonction de la protéine LGI1 ont été identifiées dans deux pathologies caractérisées par des crises d'épilepsie : une forme héréditaire d'épilepsie du lobe temporal autosomique dominante (ADLTE) provoquée par des mutations dans le gène *LGII*, et des encéphalites limbiques (EL) auto-immunes caractérisées par des troubles neurologiques dus à la présence d'auto-anticorps anti-LGI1 dans le sérum et/ou dans le liquide céphalo-rachidien des patients. Afin de comprendre comment l'altération de la protéine LGI1 génère des crises d'épilepsie, des études se sont intéressées à la fonction de la protéine LGI1 dans la régulation du réseau neuronal. Ces études ont mis en évidence que la protéine LGI1 joue un rôle primordial au niveau des synapses excitatrices, en formant un complexe trans-synaptique avec ses partenaires transmembranaires ADAM22 et ADAM23. Par la formation de ce complexe, la protéine LGI1 régule l'expression des récepteurs AMPA (R-AMPA) qui sont impliqués dans la transmission synaptique. De manière surprenante, il a été montré que la perturbation de la protéine LGI1 réduit l'expression des R-AMPA à la surface des synapses excitatrices. Cependant, ce résultat est en contradiction avec l'apparition des crises d'épilepsie qui sont générées en raison d'une hyperexcitabilité du réseau neuronal. Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse a été de comprendre comment une réduction de l'expression des R-AMPA conduit au déclenchement de crises d'épilepsie lorsque la protéine LGI1 est altérée. Pour expliquer cela, nous avons émis l'hypothèse que la réduction de l'expression des R-AMPA affecterait principalement les synapses excitatrices présentes sur les neurones inhibiteurs. La réduction de l'activité inhibitrice résultante favoriserait l'hyperexcitabilité du réseau neuronal. Pour tester cela, nous avons analysé les effets d'un blocage de la protéine LGI1 par des anticorps (ac) anti-LGI1 provenant du sérum de patients

atteints d'EL. Grâce à un modèle de souris infusée avec les ac anti-LGI1, nous observons, par une étude réalisée en microscopie super-résolution STORM, que la perturbation de la protéine LGI1 réduit l'expression des R-AMPA à la surface des neurones excitateurs et inhibiteurs dans le gyrus denté de l'hippocampe. Par électrophysiologie, nous avons enregistré les potentiels de champs locaux dans la région CA1 dans des tranches aiguës d'hippocampe de souris infusées avec les ac anti-LGI1. Nous montrons que le blocage de la protéine LGI1 augmente l'hyperexcitabilité du réseau neuronal. De plus, nous observons, par pharmacologie, que les ac anti-LGI1 perturbent l'activité du réseau inhibiteur qui ne parvient plus à contrôler l'excitabilité neuronale. L'ensemble de nos résultats indique que la diminution de l'expression des R-AMPA dans le gyrus denté de l'hippocampe, par les ac anti-LGI1, réduit plus drastiquement l'activité du réseau inhibiteur. Ainsi, mes résultats suggèrent que la perturbation du réseau inhibiteur dans le gyrus denté serait un mécanisme impliqué dans la génération des crises d'épilepsie chez les patients atteints d'EL à ac anti-LGI1.

Abstract :

LGI1 is a neuronal secreted protein expressed in the central nervous system, mainly in the hippocampus. Dysfunctions of LGI1 protein have been identified in two pathologies: an inherited form of autosomal dominant temporal lobe epilepsy (ADLTE) caused by mutations in *LGI1* gene, and in a subtype of auto-immune limbic encephalitis (LE) characterized by neurological disorders due to the presence of LGI1 auto-antibodies in the serum and the cerebrospinal fluid of patients. To understand how the alteration of LGI1 protein leads to epileptic seizures, studies investigated LGI1 function in the regulation of the neuronal network. It was shown that LGI1 protein acts at excitatory synapses by forming a trans-synaptic complex with its transmembrane partners ADAM22 and ADAM23. Through this complex, LGI1 protein regulate the expression of AMPA-receptors (AMPA-R) involved in synaptic transmission.

Surprisingly, it was shown that the impairment of LGI1 protein reduces the expression of AMPA-R at the surface of excitatory synapses. Nevertheless, this result is in contradiction with the epileptic seizures generated because of a hyperexcitability of the neuronal network. Thus, the goal of my thesis project was to understand how a reduction of AMPA-R expression leads to epileptic seizures when LGI1 protein is disturbed. To explain this, we suggested that the reduction of the expression of AMPA-R would mainly occur at excitatory synapses on inhibitory neurons. This would decrease the inhibitory neuronal activity in favour of a hyperexcitability of the neuronal network. To investigate this, we studied the effects of a blockage of LGI1 protein by LGI1 antibodies (abs) purified from the serum of patients with LGI1 LE. Using an infused mouse model with LGI1 abs, we observed, by super-resolution microscopy STORM, that LGI1 abs reduced the expression of AMPA-R on excitatory and inhibitory neurons in the dentate gyrus of the hippocampus. By electrophysiology, we show that the blockage of LGI1 protein increases the hyperexcitability of the neuronal network. Moreover, we observed, by pharmacology, that LGI1 abs altered the inhibitory network activity that failed to control the neuronal excitability. Altogether, our results indicate that the reduction of AMPA-R expression in the dentate gyrus of the hippocampus, by LGI1 abs, reduce more drastically the activity of the inhibitory network. Thus, my results suggest that the alteration of the inhibitory network would be a mechanism involved in the trigger of epileptic seizures in patients with LGI1 LE.

Table des matières

Introduction	15
Chapitre I : Les encéphalites limbiques à anticorps anti-LGI1	15
1) Les encéphalites auto-immunes	15
2) Les encéphalites limbiques	17
a) Les EL à auto-ac dirigés contre des protéines intracellulaires	19
b) Les EL à auto-ac dirigées contre des protéines membranaires ou synaptiques.	21
c) Caractérisation clinique et diagnostic des encéphalites limbiques.	22
3) Caractérisation des encéphalites limbiques à auto-anticorps anti-LGI1	24
a) Définition	24
b) Sémiologie des EL LGI1 :	25
c) Traitement des EL LGI1 :	27
4) Etiologie des encéphalites limbiques à auto-anticorps anti-LGI1	28
a) Le système de l'antigène des leucocytes humains (HLA)	28
i. Le CMH classe I	29
ii. Le CMH classe II	31
b) Origine génétique des EL LGI1	33
5) Caractérisation des auto-ac anti-LGI1 :	34
a) Les différents isotypes d'Ig	35
b) Les sous-types d'IgG	36
c) Cause des EL LGI1 et origine des anticorps	38
6) Conclusion du chapitre 1	38
Chapitre II. L'hippocampe	41
1) Généralités	41
2) Anatomie	44
a) Le cortex entorhinal et le subiculum	44
b) Le gyrus denté	44
c) La corne d'Ammon (CA)	46
i. CA3	46
ii. CA2	47
iii. CA1	49
3) La connectivité de la formation hippocampique	50
a) Réseau intrinsèque de la formation hippocampique	50
b) Réseau extrinsèque de la formation hippocampique	51
4) Fonctions	53

a) Mémoire et apprentissage	53
b) Orientation spatiale	57
c) Neurogenèse adulte	58
5) La synapse	60
a) Généralités	60
b) La transmission synaptique glutamatergique	62
i. Libération des vésicules présynaptiques	62
ii. Le complexe postsynaptique	65
c) Les récepteurs AMPA	67
i. Composition :	67
ii. Les protéines auxiliaires :	68
iii. Modifications post-traductionnelles :	69
iv. Organisation à la membrane :	70
6) Conclusion du chapitre 2	71
Chapitre III : La protéine Leucine-Rich Glioma Inactivated 1 (LGI1)	75
1) Histoire de la protéine LGI1	75
2) Les épilepsies du lobe temporele autosomique dominante	77
a) Généralités de l'épilepsie :	77
b) Les épilepsies du lobe temporal :	78
c) Les épilepsies du lobe temporal autosomiques dominantes :	79
3) Structure et interactions de la protéine LGI1	80
a) La structure de la protéine LGI1	80
b) Les partenaires de la protéine LGI1	81
4) L'expression de la protéine LGI1	83
a) L'expression de la protéine LGI1 au cours du développement	83
b) Le complexe trans-synaptique LGI1-ADAM22/23	84
c) L'expression de LGI1 au niveau du segment initial des axones	86
5) Les fonctions de la protéine LGI1 dans le SNC	87
a) Les modèles d'étude	87
i. Les modèles transgéniques :	87
ii. Le modèle infusé avec les auto-ac anti-LGI1 :	89
b) L'effet de la protéine LGI1 au cours du développement	90
c) L'effet de la protéine LGI1 sur la régulation des canaux potassiques kv1.1	92
i. Caractéristiques des canaux kv1.1 :	92
ii. La régulation des canaux kv1.1 par la protéine LGI1	94

d) L'effet de la protéine LG1 sur la régulation des récepteurs AMPA	98
6) Conclusion du chapitre 3	101
Contexte scientifique	104
Matériels et Méthodes	105
Résultats	119
Partie I : Validation de l'utilisation des IgG purifiées à partir d'échantillons de sérum. ...	119
1) Validation des purifications des IgG à partir des échantillons de sérum.....	119
2) Détermination de la concentration d'utilisation des IgG purifiées.....	122
Partie II : Fonctionnement du réseau neuronal en présence IgG LGI1	124
1) Quel est l'effet des IgG LG1 sur le réseau neuronal dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe ?.....	124
a) L'expression des R-AMPA sur les neurones <i>in vitro</i> est-elle modulée par les IgG LGI1 ?	124
b) Les IgG LGI1 modulent-elles l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs <i>in vitro</i> ?	126
c) Les IgG LGI1 induisent-elle une modification fonctionnelle sur l'excitabilité du réseau neuronal <i>in vitro</i> ?	128
2) Les IgG LGI1 modulent-elles l'expression des R-AMPA dans l'hippocampe de souris ?	130
a) Les IgG LGI1 ont-elles un effet sur l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs ?	130
b) Les IgG LGI1 ont-elles des effets sur l'expression des R-AMPA sur les neurones excitateurs ?	137
3) Quel est l'effet des IgG sur la régulation de l'activité du réseau neuronal dans l'hippocampe ?	144
a) Les IgG LGI1 ont-elles un effet sur l'excitabilité neuronale dans l'hippocampe ?	144
i. L'hyperexcitabilité dans l'hippocampe est-elle modulée par les IgG LGI1 ? .	144
ii. Comment l'hyperexcitabilité du réseau neuronal est-elle modulée par les IgG LGI1 ?	146
iii. L'augmentation de l'hyperexcitabilité neuronale par les IgG LGI1 est-elle due à un effet sur les canaux kv1.1 ?	148
b) L'effet des IgG LGI1 sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal passe-t-il par la perturbation du réseau inhibiteur ?	151
Partie III : L'expression des protéines ADAM22 et ADAM23 partenaires de la protéine LGI1 à la surface des synapses.....	153
Discussion	156
1) La régulation de l'expression des R-AMPA par la protéine LGI1	157

2) L'effet des IgG LGI1 sur l'expression des R-AMPA est localisé dans le gyrus denté	158
3) Le déséquilibre du réseau neuronal par les IgG LGI1	160
4) L'expression synaptique de la protéine ADAM22	162
5) Le modèle <i>in vitro</i> : un modèle inadapté ?	164
6) Les effets hétérogènes des IgG LGI1 des différents patients	166
7) L'utilisation des IgG provenant du sérum constitue-t-elle une limite ?	169
Conclusion générale :.....	171
Références	173
Annexes	200

Abréviations :

4-AP : 4-aminopyridine

(m)EPSC : courant post synaptique excitateurs (miniature)

(m)LGI1 : *leucine-rich glioma inactivated protein 1* (muté)

Ac : anticorps

ADAM: *A disintegrin and Metalloprotease*

ADLTE : épilepsie du lobe temporal autosomique dominante

ADPEAF : épilepsie partielle du lobe temporal avec des déficiences auditives

AIS : segment initial des axones

ARNm : acide ribonucléique messenger

BHE : barrière hématoencéphalique

CA : corne d'Ammon

CamKII: Calcium/calmoduline kinase II

Caspr2: *contactin-associated protein-like 2*

Ca_v : canaux calcique voltage-dépendant

CCK: cholécystokinine

CE(M)(L) : cortex entorhinal (médian) (latéral)

CH : chaîne lourde constante

CL : chaîne légère constante

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Courbe IO : courbe input-output

(s)CPSE : courant postsynaptique excitateur spontanée

CSN : cellule souche neuronale

DTX : dendrotoxine

EAI : encéphalite auto-immune

EEG : électroencéphalogramme

EGC : éminence ganglionnaire caudale

EL : encéphalite limbique

ELT : épilepsie du lobe temporal

EPTP : épitempine

FBDS : crise facio-brachiale dystonique

FLAIR : *fluid attenuated inversion recovery*

GAD-RT : souris gad2-rosa tomato

GD : gyrus denté

GFAP : protéine d'acide fibrillaire gliales

HIPP: *Hilar perforant path-associated cell*

HLA : antigène des leucocytes humains ou « *human leukocyte antigene* »

IgG : immunoglobuline G

IRM : imagerie par résonance magnétique

IVIG : infiltration intraveineuse d'immunoglobulines

KO: knock-out

LB : lymphocyte B

LCR : liquide céphalo-rachidien

LRR : *leucine-rich-repeat*

LT : lymphocyte T

LTD : dépression à long-terme ou *long-term depression*

LTM: lobe temporal median

LTP: potentialisation à long-terme ou *long-term potential*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MOOP: *molecular layer perforant path-associated cell*

MPT : modification post-traductionnelles

NTs : neurotransmetteurs

OE LGI1 : LGI1 surexprimé

PCL : potentiels de champs locaux

PKA: protéine kinase A

PKC: protéine kinase C

PNS : syndromes paranéoplasiques

PPF : facilitation à court-terme ou *paired-pulse facilitation*

PSD : densité postsynaptique ou *postsynaptic density*

PTZ: pentylènetétrazole

RE : réticulum endoplasmique

R-NMDA : récepteurs N-Méthyl-D-Acétyl

s.l.m: stratum lacunosom moleculare

s.l: stratum lucidum

s.o : stratum oriens

s.p : stratum pyramidale

s.r: stratum radiatum

SGZ : zone sous-granulaire

SLCL : cancer des poumons à petites cellules

SNAP : *soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor*

SNARE : récepteurs SNAP

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

SP : signal peptide

STORM : *stochastic optical reconstruction microscopy*

TARP : protéine régulatrice des récepteurs AMPA

TCR : récepteur des cellules T

TTX : tétrodoxine

VGKC : complexe de canaux potassiques voltage-dépendants

VH : chaîne lourde variable

VL : chaîne légère variable

WT: wild type

ZA : zone active

Introduction

Chapitre I : Les encéphalites limbiques à anticorps anti-LGI1

1) Les encéphalites auto-immunes

L'encéphalite est une maladie neurologique caractérisée par une inflammation de l'encéphale. Il existe différents types d'encéphalites : 42% des cas d'encéphalites sont causés par une infection à un virus, majoritairement le virus de l'herpès (Tunkel et al., 2008; Granerod et al., 2010; Venkatesan et al., 2013), 37% des cas d'encéphalites ont une origine inconnue (Granerod et al., 2010), et 21% des encéphalites sont dues à une réaction auto-immune (figure 1.1) (Granerod et al., 2010; Bloch & Glaser, 2015).

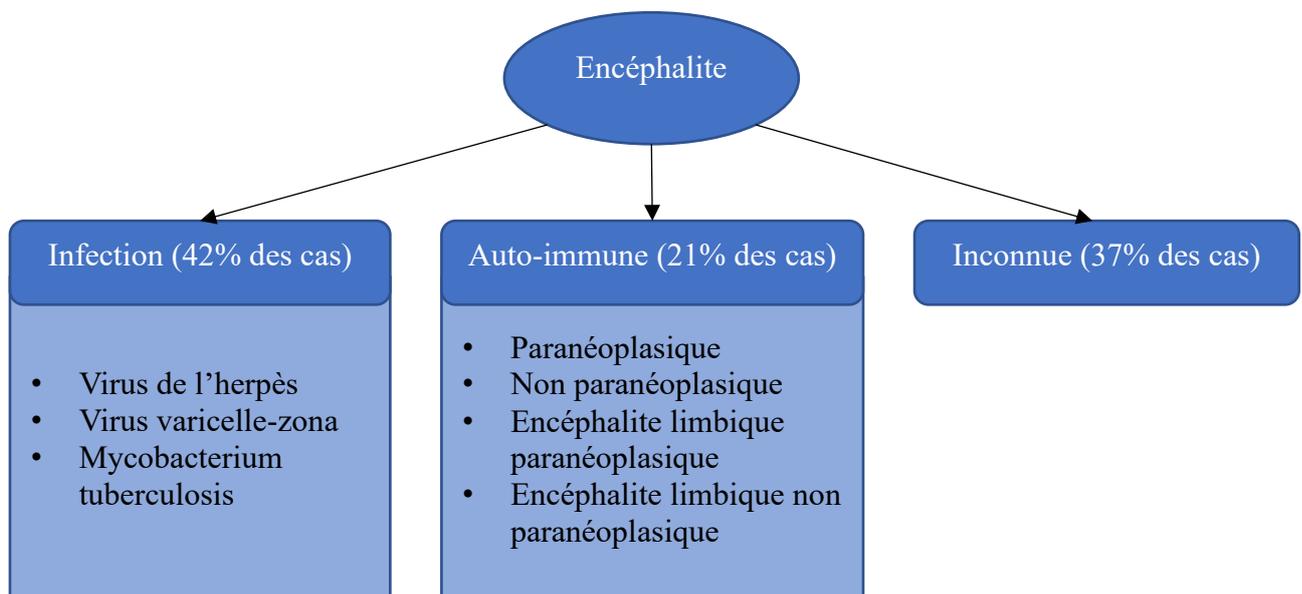


Figure 1.1 Les causes des encéphalites (adapté de Granerod et al., 2010). Dans 42% des cas, les encéphalites ont une origine infectieuse telle qu'une infection en réponse au virus de l'herpès (liste non exhaustive). Dans 21% des cas, la cause des encéphalites est auto-immune (liste non exhaustive), et dans 37% des cas la cause est inconnue.

L'auto-immunité se produit lorsque le système immunitaire déclenche une réaction immunitaire contre des tissus sains engendrant la production d'auto-anticorps (ac) dirigés contre un épitope endogène (Nicholson, 2016). Ainsi, les encéphalites auto-immunes (EAI) regroupent l'ensemble des maladies neurologiques dues à la présence d'auto-ac dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et/ou le sérum des patients, qui sont dirigés contre des protéines neuronales (figure 1.2) (Hermetter et al., 2018). Cliniquement, les EAI sont caractérisées par une mise en place rapide de troubles de la mémoire à court-terme, des crises d'épilepsie, des troubles psychiatriques et des altérations visibles en imagerie par résonance magnétique (IRM) (Lancaster, 2016). La forme la plus répandue d'EAI est l'encéphalite à auto-ac anti-récepteurs NMDA (R-NMDA) fréquemment associée à un cancer (Hébert et al., 2020) (fig 1.2B). Les EAI peuvent être divisées en deux catégories : les encéphalites à syndromes paranéoplasiques qui sont associées à un cancer et dont les auto-ac sont très fréquemment dirigés contre une protéine neuronale intracellulaire, et les encéphalites non paranéoplasiques qui ne sont pas associées à un cancer et dont les auto-ac sont généralement dirigés contre une protéine neuronale membranaire ou synaptique. Il existe un sous-type d'EAI qui affecte les structures du lobe temporal médian, particulièrement du système limbique, appelée encéphalite limbique (EL). Les EL peuvent également être paranéoplasiques ou non paranéoplasiques.

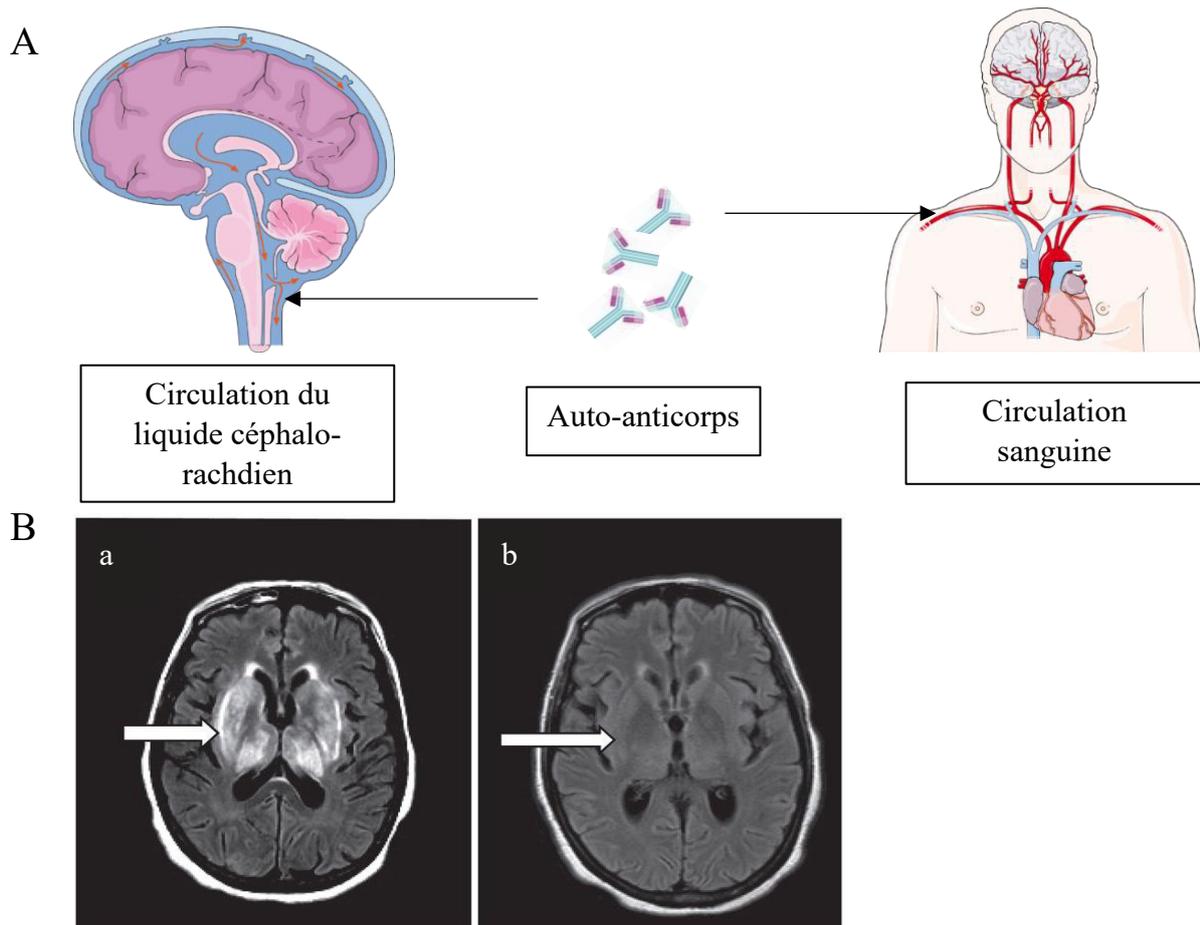


Figure 1.2. Les encéphalites auto-immunes. Les encéphalites auto-immunes sont caractérisées par la présence d'auto-ac dans le LCR et/ou le sérum des patients (A). Exemple d'une encéphalite à auto-ac anti-récepteurs N-méthyl-D-Acétyle (R-NMDA) en imagerie par résonance magnétique (IRM). Avant traitement, l'IRM met en évidence des hypersignaux bilatéraux et symétriques en séquence de récupération par inversion atténuée par les fluides ou « fluid attenuated inversion recovery » (FLAIR) au niveau des noyaux gris centraux (flèche) (B.a). Après traitement par échange plasmatique, l'IRM montre une diminution presque totale des hypersignaux (flèche) (B.b). (Alsrouji & Memon, 2021).

2) Les encéphalites limbiques

Les encéphalites limbiques (EL) correspondent à des troubles cognitifs, notamment mnésiques, suggérant une implication du système limbique (Corsellis et al., 1968). Le système limbique est un ensemble de structures enfouies à l'intérieur de l'encéphale, principalement composé de l'hippocampe, du gyrus cingulaire, de l'hypothalamus, du fornix et de l'amygdale (figure 1.3). L'interaction complexe des régions limbiques entre elles et avec les régions extra-limbiques,

permet au système limbique d'être le centre de contrôle des émotions et de la mémoire (Catani et al., 2013; Rolls, 2019).

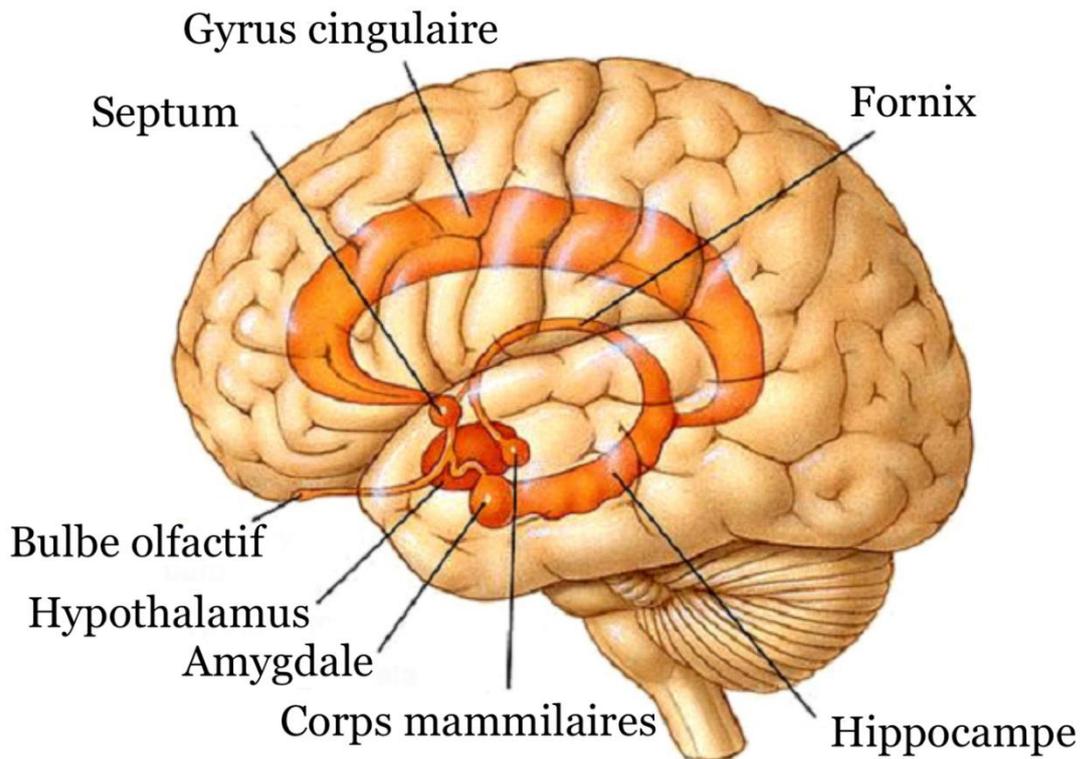


Figure 1.3. Anatomie du système limbique. Le système limbique est un ensemble de structures de l'encéphale qui contrôle les émotions, l'apprentissage, la mémoire et l'olfaction. Le système limbique est notamment composé de l'hippocampe, qui joue un rôle dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage ; du fornix qui fournit les principales voies d'entrée et de sortie de l'hippocampe ; du gyrus cingulaire qui est le messenger entre le système limbique et les voies extra-limbiques ; du septum, une structure qui contrôle les émotions ; des corps mamillaires, une paire de noyaux qui servent de relais d'informations provenant de l'hippocampe et de l'amygdale ; de l'hypothalamus, qui contrôle le système endocrinien ; de l'amygdale, qui joue un rôle dans les comportements de peur et d'anxiété ; et du bulbe olfactif.

Le tableau clinique des EL comprend des troubles de la mémoire associés à des troubles du comportement et de l'humeur, ainsi que des crises d'épilepsie (Didelot & Honnorat, 2009; Lancaster, 2016). Bien que les lésions observées dans les EL suggèrent majoritairement une atteinte du système limbique, l'atteinte des structures extra-limbiques, tels que le cervelet, ou

le cortex frontal, est très courante (Corsellis et al., 1968; Tüzün & Dalmau, 2007). C'est notamment le cas pour les encéphalites limbiques à ac anti-Leucine-Rich Glioma Inactivated protein 1 (LGI1) qui est l'une des formes d'EL les plus répandues.

Les EL peuvent être divisées en 2 groupes en fonction de la localisation de leur cible antigénique : les EL à auto-ac dirigés contre des protéines intracellulaires, et les EL à auto-ac dirigés contre une cible membranaire ou synaptique (Didelot & Honnorat, 2009; Hermetter et al., 2018; Kelley et al., 2017).

a) Les EL à auto-ac dirigés contre des protéines intracellulaires.

La première catégorie d'EL est celle dont les auto-ac sont dirigés contre des cibles neuronales intracellulaires, telles que les auto-ac, anti-Hu (figure 1.5) (Graus, 2001; Kelley et al., 2017), anti-Ma2 (Didelot & Honnorat, 2009; Hermetter et al., 2018; Honnorat et al., 2008), anti-Amphiphysine (Didelot & Honnorat, 2009; Hermetter et al., 2018; Pittock et al., 2005) ou anti-CV2 (Didelot & Honnorat, 2009; Hermetter et al., 2018; Honnorat et al., 2008). Ces EL sont dites « paranéoplasiques » car la présence d'auto-ac est associée à une tumeur à distance, tel que le cancer des poumons à petites cellules (Didelot & Honnorat, 2009; Foster & Caplan, 2009; Vogrig et al., 2020). Les syndromes paranéoplasiques (PNS) sont définis par un ensemble de troubles du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) associés à un cancer, qui peuvent se manifester par des atteintes neurologiques localisées, telle que les EL, ou par une implication plus générale du système nerveux, telle qu'une encéphalomyélite qui touche le SNC et SNP (figure 1.4) (Darnell, 2003; Graus & Dalmau, 2019). Les auto-ac sont produits en raison d'une réaction immunitaire contre la tumeur. Les lymphocytes T (LT) CD4+ reconnaissent une cible antigénique au niveau de la tumeur et activent la différenciation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes, les cellules qui sécrètent les ac. Dans les EL paranéoplasiques, les auto-ac qui circulent dans le sérum passent la barrière hématoencéphalique (BHE) pour se retrouver dans le LCR. Les mécanismes induisant la rupture de la BHE restent inconnus à ce jour. Des études

ont montré qu'en plus du passage des auto-ac dans le LCR, il y a également une infiltration des LT CD8+ cytotoxiques, qui entraînerait la destruction des cellules neuronales (figure 1.4). Dans les EL paranéoplasiques, les auto-ac ne sont pas directement pathogènes mais sont d'excellents biomarqueurs afin d'orienter la recherche d'une tumeur sous-jacente (Hermetter et al., 2018; Iorio et al., 2019; Vogrig et al., 2020).

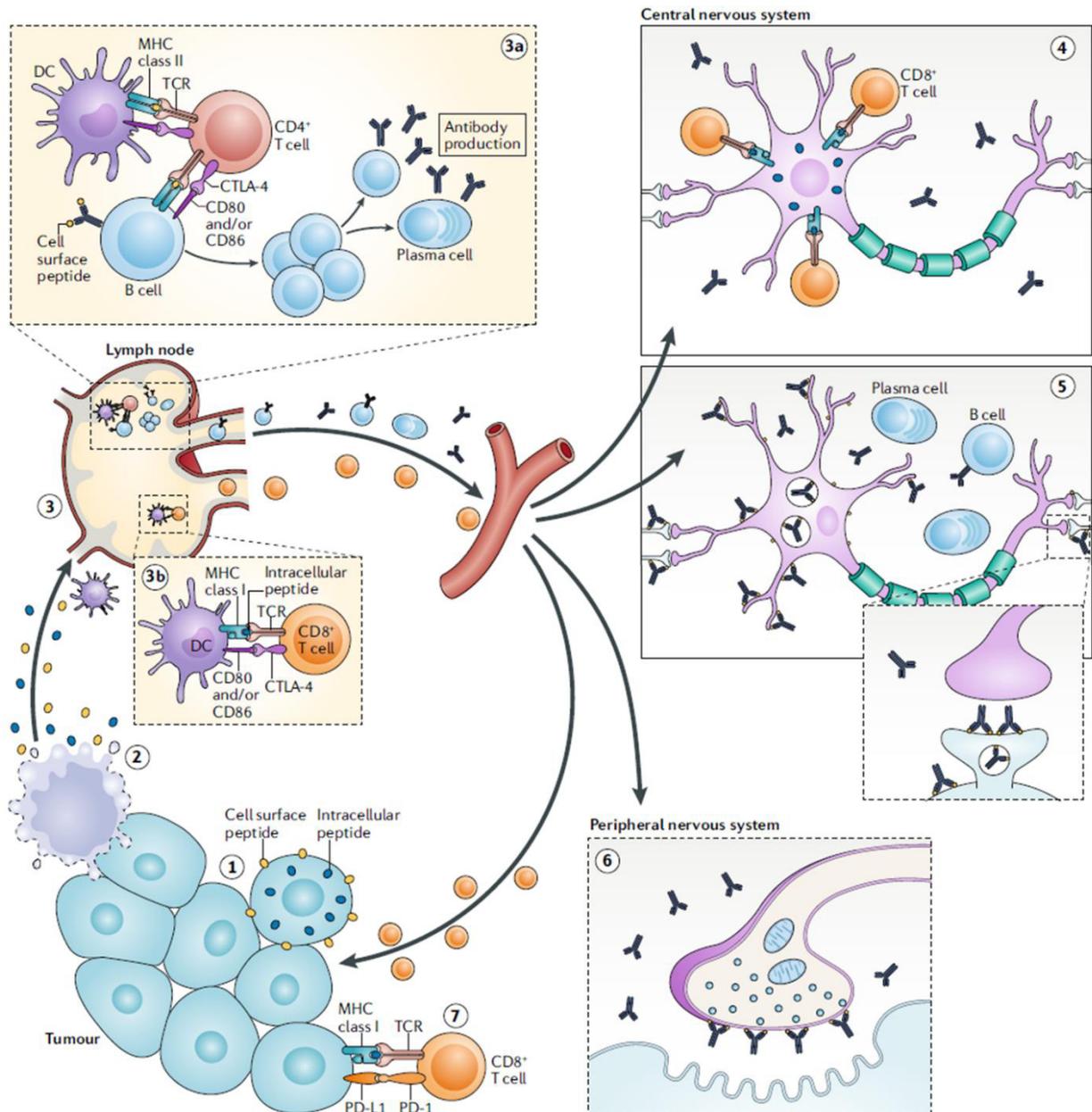


Figure 1.4. Mécanisme d'action des syndromes paranéoplasiques (Graus & Dalmau, 2019). Le système immunitaire s'attaque aux cellules tumorales (1) conduisant à la libération d'antigènes peptidiques intracellulaires et membranaires (2). Les antigènes peptidiques sont

conduits aux ganglions lymphatiques par les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques (DC) (3) qui activent les LT cytotoxiques CD8+ en présentant les antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou MHC) de classe I (3b), ou bien les LT CD4+ « helper » par le CMH classe II (3a). Les LT CD4+ activent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui sécrètent les ac (3a). Les LT cytotoxiques, les LB et les ac sont libérés dans la circulation sanguine et passent la BHE pour se retrouver dans le LCR et accèdent ainsi au système nerveux central. Les ac et les LT agissent contre leurs cibles intracellulaires (4), membranaires ou synaptiques (5). Les anticorps peuvent également cibler des antigènes du système nerveux périphérique (6). Les LT actifs dans les ganglions lymphatiques sont renvoyés sur le site de la tumeur et continuent d'agir sur les cellules tumorales.

b) Les EL à auto-ac dirigées contre des protéines membranaires ou synaptiques.

Dans les EL dites non paranéoplasiques, les auto-ac interagissent directement avec des récepteurs exprimés à la membrane des neurones ou avec des protéines synaptiques libérées dans le milieu extracellulaire (Cianci et al., 2010) (figure 1.5). C'est notamment le cas des encéphalites à ac anti-« Contactin-associated protein-like 2 (Caspr2) » (Irani et al., 2010; Newman et al., 2016) ou anti-LGI1 (Irani et al., 2010; Newman et al., 2016). Chez les patients souffrant d'EL non paranéoplasiques, les ac semblent être directement pathogènes et agissent en modifiant la structure ou la fonction de la protéine cible contrairement aux SPN. Aucune infiltration de LT n'a été observée dans le LCR de ces patients (Vogrig et al., 2020). Ces modifications sont à l'origine des troubles cognitifs observés.

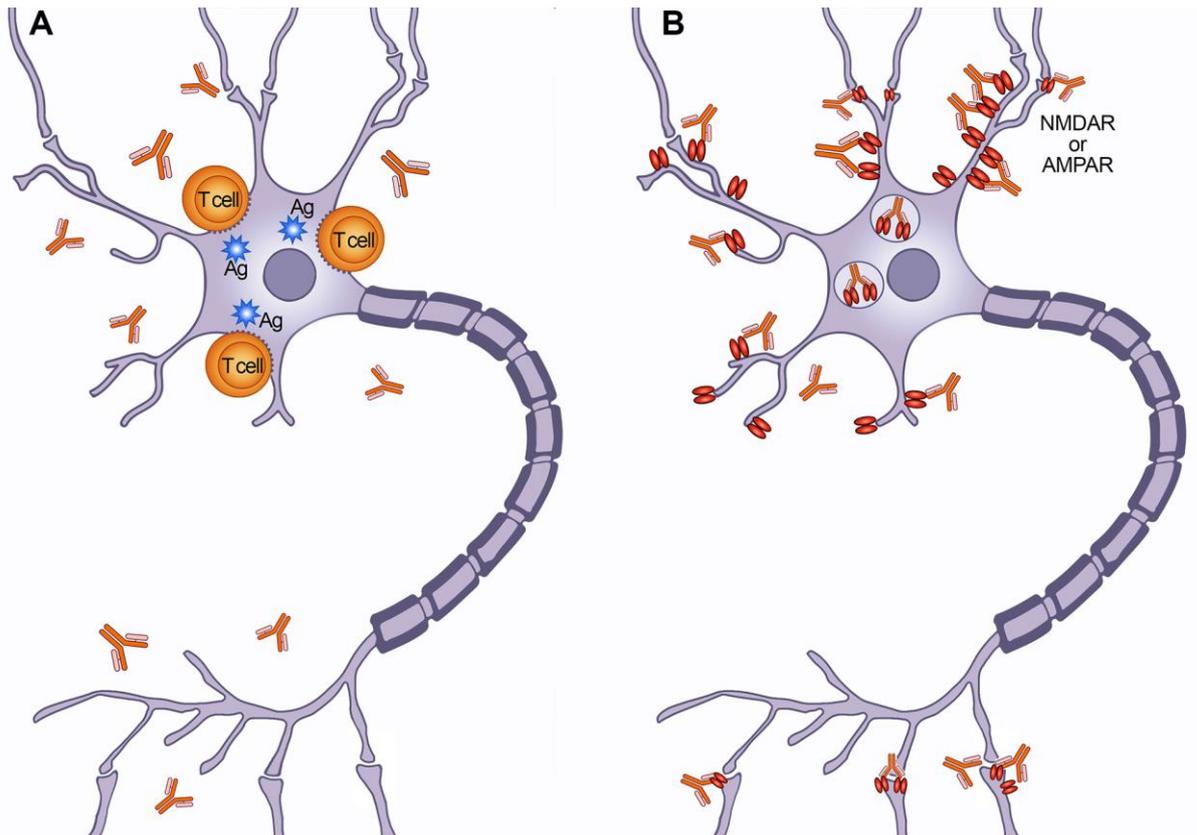


Figure 1.5. Les deux groupes d'EL. Les EL qui ciblent des antigènes intracellulaires (A) sont associés à des tumeurs, ce sont des PNS. Une infiltration des LT cytotoxiques est généralement observée et conduit à une dégénérescence neuronale. Dans les EL qui ciblent des antigènes exprimés à la surface, les ac sont directement pathogènes (B).
 T cell = lymphocyte T, Ag = antigène, NMDAR = récepteurs NMDA, AMPAR = récepteurs AMPA.

c) Caractérisation clinique et diagnostic des encéphalites limbiques.

Les EL sont caractérisées par un spectre clinique large et varié allant des troubles cognitifs légers à des complications plus sévères telles que l'apparition de crises d'épilepsie (tableau 1.1) (Kelley et al., 2017). Les troubles cognitifs décrits dans les EL non paranéoplasiques sont communes à d'autres maladies neurologiques, ce qui rend leur diagnostic difficile. Les EL non paranéoplasiques sont associées à un déclin cognitif rapide dont l'une des premières atteintes est l'installation de sévères troubles de la mémoire à court-terme (Bak et al., 2001; Corsellis et al., 1968). Les patients souffrant d'EL non paranéoplasiques souffrent également de troubles neuropsychiatriques variés tels que de l'anxiété, de la dépression, des changements de

comportement, des psychoses et des crises d'épilepsie (Budhram et al., 2019). Ces troubles s'installent de manière aiguë à subaiguë sur plusieurs semaines (Budhram et al., 2019; Graus et al., 2016). L'identification de ces troubles neuropsychiatriques aide à établir le diagnostic des EL non paranéoplasiques, mais doit être complété par des études plus poussées incluant de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), des électroencéphalogrammes (EEG) et des analyses du LCR (Anderson & Barber, 2008; Budhram et al., 2019; Tüzün & Dalmau, 2007). Les résultats de l'ensemble des tests orientent le diagnostic qui doit être confirmé par la recherche d'auto-ac spécifiques dans le LCR et/ou le sérum des patients (Anderson & Barber, 2008; Budhram et al., 2019; Honnorat, 2010). Le diagnostic des EL non paranéoplasiques se fait après avoir mis en lien la présence d'auto-ac avec son tableau clinique correspondant (tableau 1.1) (Graus et al., 2016). Néanmoins, bien que les connaissances sur les EL aient considérablement augmenté durant ces 15 dernières années, de nombreuses cibles restent encore inconnues.

Anticorps	Tumeurs associées	Symptômes cliniques
Anti-Hu	SCLC	<ul style="list-style-type: none"> • Neuropathie sensorielle • Atteinte cérébelleuse et du tronc cérébral • Neuropathie motrice • Encéphalomyélite multifocale
Anti-Ma2	Testicules	<ul style="list-style-type: none"> • Dysfonction hypothalamique • Dysfonctionnement du tronc cérébral rostral • Parkinsonisme atypique
CRMP-5	SCLC, thymome	<ul style="list-style-type: none"> • Ataxie cérébelleuse • Encéphalomyélite • Parkinsonisme • Rétinopathie • Neuropathie • Uvéite
Amphiphysine	Sein, SCLC	<ul style="list-style-type: none"> • Syndrome de la personne raide • Maladie multifocale
VGKC	Aucune	<ul style="list-style-type: none"> • Troubles du sommeil • Hyponatrémie
Neuropile	SCLC, thymome	<ul style="list-style-type: none"> • Multiple

Tableau 1.1. Tableau clinique de quelques encéphalites limbiques (Anderson & Barber, 2008). SCLC = cancer des poumons à petites cellules ; VGKC = canaux potassiques voltage-dépendants.

3) Caractérisation des encéphalites limbiques à auto-anticorps anti-LGI1

a) Définition

Les EL anti-LGI1 ont été découvertes en 2010 lors d'une étude réalisée par des chercheurs de l'université d'Oxford (Irani et al., 2010). Dans cette étude, les chercheurs ont montré la présence

d'ac dirigés contre les protéines LGI1 ou Caspr2, initialement attribués à des auto-ac dirigés contre le complexe de canaux potassiques voltage-dépendants (VGKC).

L'EL à auto-ac anti-LGI1 (EL LGI1), est une forme d'EL non paranéoplasique. L'EL LGI1 est la 2^{ème} forme d'EAI la plus répandue après les EAI à anticorps anti-R-NMDA. En effet, selon une étude française menée par le centre de référence des syndromes paranéoplasiques de Lyon, réalisée sur 632 patients atteint d'EAI, 16,7% d'entre eux étaient atteints d'EAI anti-NMDA contre 13,3% de patients atteints d'EAI anti-LGI1 (Hébert et al., 2020). Néanmoins, la prévalence de cette maladie reste faible avec environ 1 cas d'EL LGI1 pour 1 million d'habitants par an (van Sonderen, Petit-Pedrol, et al., 2017). Les EL LGI1 touchent majoritairement des hommes âgés de 60 à 65 ans (Ariño et al., 2016; Hébert et al., 2020; Muñiz-Castrillo et al., 2021; van Sonderen, Petit-Pedrol, et al., 2017) pour qui l'installation de la maladie est généralement plus longue que les autres formes d'EL (Irani et al., 2010; M. Lai et al., 2010).

b) Sémiologie des EL LGI1 :

L'installation progressive de la maladie rend le diagnostic des patients atteints d'EL LGI1 difficile, car parfois confondu avec un trouble neurodégénératif. Néanmoins, la crise facio-brachiale dystonique (FBDS) qui affecte la moitié des patients, est propre à l'EL LGI1 facilitant son diagnostic (Irani et al., 2010, 2011; Vogrig et al., 2020). Ces crises FBDS sont fréquentes, généralement très brèves, et sont décrites chez les patients par des mouvements de bras associés à la face et la jambe hémilatérales (figure 1.6) (Irani et al., 2011).



Figure 1.6. Schéma d'une crise facio-brachiale dystonique (FBDS) (Schmerler et al., 2016). Les crises FBDS sont caractérisées par des mouvements d'un bras et du bas du visage hémilatéraux.

Bien que les crises FBDS soient propres aux EL LGI1, d'autres types de crises peuvent survenir chez ces patients. Généralement on retrouve des crises partielles qui trouvent leur origine dans une zone localisée du cerveau, à l'inverse des crises généralisées, définies par des décharges dans l'intégralité du cerveau, et qui sont plus rares chez les patients avec une EL LGI1 (Irani et al., 2011; S. N. M. Binks et al., 2018). Les crises précèdent l'apparition des troubles cognitifs et mnésiques associés aux EL LGI1. En effet, les crises FBDS sont les premiers symptômes à apparaître suivi par des crises d'épilepsie partielles du lobe temporal. Les déficits cognitifs apparaissent ensuite, suivis par des crises tonico-cloniques (Irani et al., 2011; van Sonderen et al., 2017; S. N. M. Binks et al., 2018). Tout comme les autres formes d'EL, les patients atteints d'EL LGI1 souffrent de troubles mnésiques sévères. Ces troubles mnésiques sont accompagnés de désorientation spatiale, d'apathie pouvant mener à un comportement agressif ou encore à des troubles du sommeil (figure 1.7) (Irani et al., 2010, 2011; Ariño et al., 2016; van Sonderen et al., 2017; S. N. M. Binks et al., 2018).

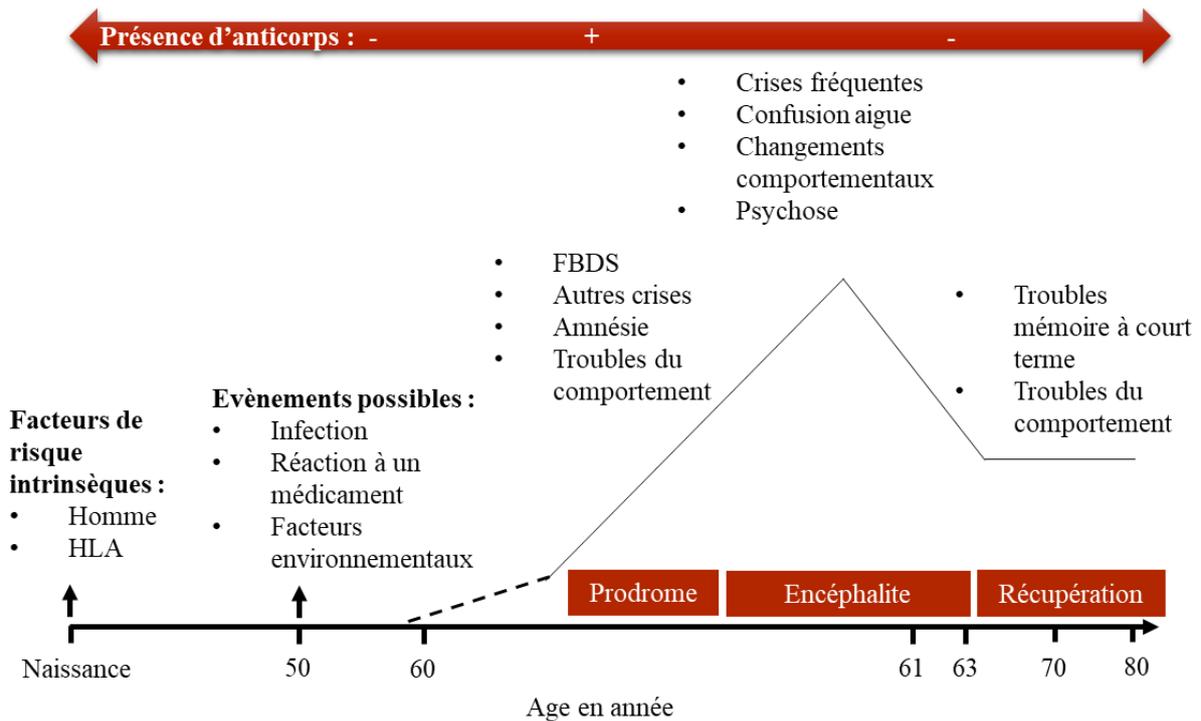


Figure 1.7. Evolution de l'EL LGI1 (S. N. M. Binks et al., 2018). Des facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent favoriser le déclenchement de la maladie qui touche plus fréquemment les hommes âgés d'environ 60 ans. Des troubles cognitifs et des crises d'épilepsie apparaissent de manière évolutive durant la maladie et certains troubles cognitifs persistent après l'élimination des ac anti-LGI1 chez les patients.

HLA = « human leukocyte antigen » ou antigène des leucocytes humains ; FBDS = crise facio-brachiale dystonique.

c) Traitement des EL LGI1 :

L'immunothérapie est le traitement le plus approprié aux EL LGI1 et est généralement efficace (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010; van Sonderen et al., 2017; S. N. M. Binks et al., 2018). Les patients atteints de FBDS sont résistants aux traitements anti-épileptiques mais réagissent bien à la prise de corticostéroïdes (Irani et al., 2011, 2013; van Sonderen et al., 2017; S. N. M. Binks et al., 2018), qui empêche également l'apparition des troubles cognitifs (van Sonderen et al., 2017). Les corticostéroïdes ont un effet immunodépresseur en empêchant les lymphocytes d'attaquer les tissus sains, et en diminuant les substances responsables de l'inflammation. L'injection intraveineuse d'immunoglobulines G (IVIG) semble permettre le contrôle des crises d'épilepsies (Dubey et al., 2018). L'IVIG associée à la prise de

corticostéroïdes conduit à quelques améliorations chez la presque totalité des patients atteints d'EL LGII (Irani et al., 2010; Ariño et al., 2016; van Sonderen et al., 2017; S. N. M. Binks et al., 2018). Le traitement par échange plasmatique a été montré comme efficace pour réduire la concentration d'ac dans le sérum et également dans le LCR sur le court et long terme (Dogan Onugoren et al., 2016). Cette forte réduction des ac chez les patients atteints d'EL LGII permet de réduire considérablement les crises d'épilepsie mais ont des effets plus modérés sur les troubles cognitifs (Dogan Onugoren et al., 2016; S. N. M. Binks et al., 2018). En 2^{ème} ligne, le rituximab et la cyclophosphamide, des traitements immunodépresseurs, sont généralement prescrits (Ariño et al., 2016; Finke et al., 2017). Peu de données permettent de montrer les effets de ces immunodépresseurs, bien que les quelques études réalisées semblent s'accorder sur l'efficacité de ces traitements dans les EL LGII (Renard et al., 2016; Markovic et al., 2020). Néanmoins, malgré les traitements disponibles, environ 75% des patients ont des déficits cognitifs de longue durée (Ariño et al., 2016; van Sonderen et al., 2017; Sola-Valls et al., 2020). Les rechutes sont possibles chez les patients et ont été observées à des taux très variables. Des ac anti-LGII peuvent encore être présents même après une récupération totale (van Sonderen et al., 2017; S. Binks et al., 2018).

4) Etiologie des encéphalites limbiques à auto-anticorps anti-LGII

a) Le système de l'antigène des leucocytes humains (HLA)

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un complexe glycoprotéique transmembranaire exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes qui fixent des peptides antigéniques dans le but de présenter ces peptides aux LT. Chez l'Homme, il est appelé « antigène des leucocytes humains (HLA) ».

Le HLA est codé sur le bras court du chromosome 6 en position 21.3 (6p21.3) où sont codées les 3 classes de HLA : classe I, classe II et classe III (HLA I-III) (figure 1.8). Le HLA-

III est différent des autres classes car sa région génétique ne code pas directement pour des molécules du CMH mais pour des protéines du système du complément, une autre fonction du système immunitaire (Kedzierska & Koutsakos, 2020).

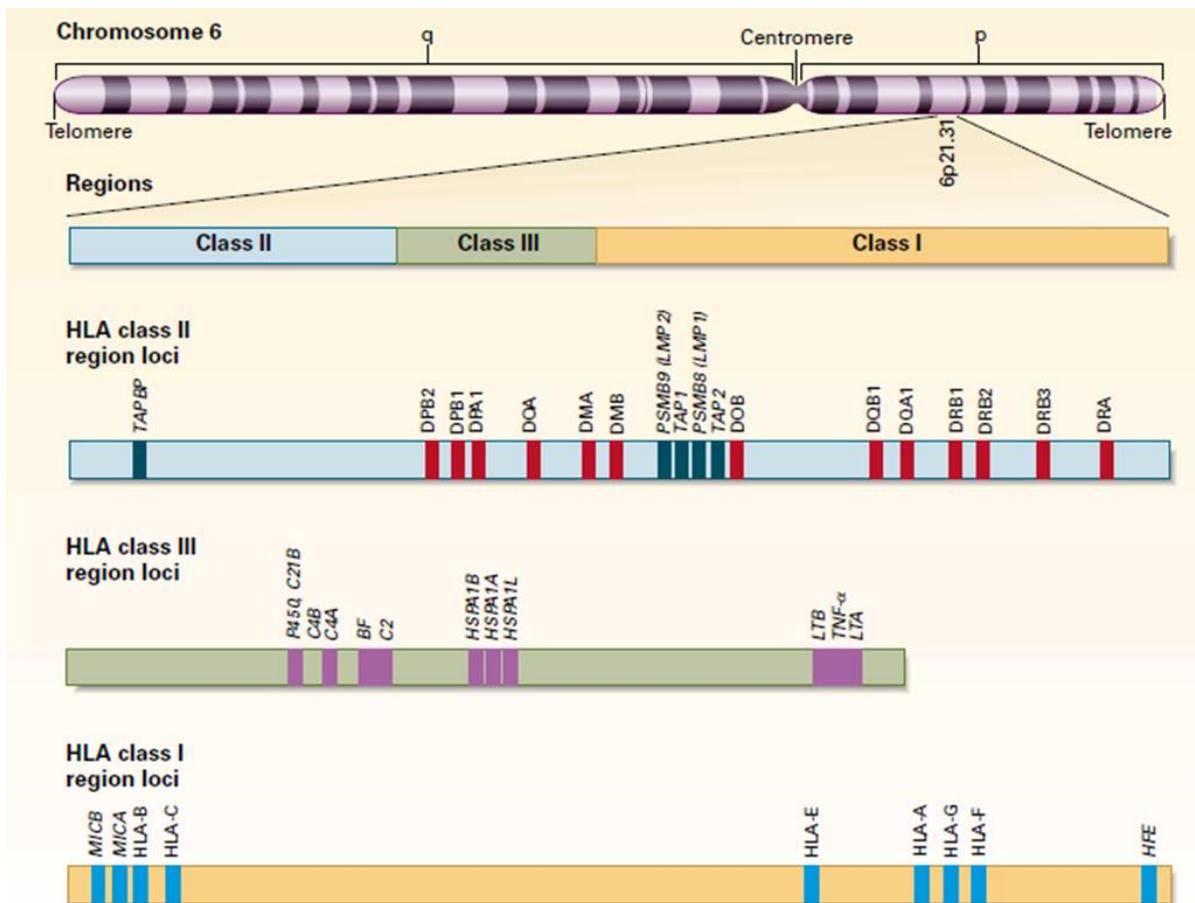


Figure 1.8. Localisation et organisation du HLA sur le chromosome 6 (Klein et Sato 2000). Le HLA est codé sur le chromosome 6 dans la région 6p21.3. Les HLA classe I, II et III y sont codés. De nombreux gènes codant pour différentes parties du CMH et possédant diverses formes alléliques sont codés dans chacune des 3 régions des classes d'HLA.

i. Le CMH classe I

Le complexe CMH I est composé d'une chaîne polypeptidique α comprenant un domaine transmembranaire et 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (figure 1.9). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment la région de liaison du peptide antigénique. Le domaine $\alpha 3$ s'associe avec la chaîne $\beta 2$ microglobuline codée sur le chromosome 15. Le domaine $\alpha 3$ est reconnu par les récepteurs

exprimés à la surface des LT CD8 cytotoxiques appelés « T-cell receptors (TCR) » (figure 1.10). La chaîne polypeptidique α est codée par la région CMH I qui comprend 3 gènes principaux ou « classiques » : *A*, *B* et *C* hautement polymorphiques signifiant que ces gènes disposent d'un très grand nombre d'allèles. Il existe également 3 autres gènes *E*, *F* et *G* ayant une faible diversité polymorphique (figure 1.8). La région de liaison du peptide formé par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, comporte la plus haute polymorphie. Cette polymorphie permet de lier un grand nombre de peptides différents. Une même molécule de CMH I ne lie que certains peptides qui lui sont compatibles (Kedzierska & Koutsakos, 2020; Nicholson, 2016). Ainsi la haute polymorphie des gènes CMH I est nécessaire afin de lier un nombre extrêmement varié de peptides (Milner & Campbell, 1992). Chaque individu possède au maximum 6 molécules de CMH I.

Les CMH I sont présents dans toutes les cellules nucléées et ont pour fonction de présenter un fragment peptidique aux LT CD8 cytotoxiques dans le but de les activer. La liaison des peptides aux CMH I se fait dans le cytosol des cellules. Lors d'une infection virale, les molécules d'interférons activent la formation d'un complexe appelé immunoprotéasome, dont la fonction est de dégrader les protéines virales contenues dans le cytosol des cellules infectées en peptides. Les peptides viraux produits sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) où ils s'associent avec le CMH I. Le complexe CMH I-peptide passe ensuite dans l'appareil de Golgi pour être acheminé à la surface des cellules et sera reconnu par les TCR présents à la surface des LT CD8 (figure 1.10). Cette reconnaissance active la libération de cytokines par les LT CD8 afin d'éliminer directement les cellules infectées (Kedzierska & Koutsakos, 2020).

ii. *Le CMH classe II*

Le CMH II fonctionne différemment du CMH I. Le CMH II est composé d'une chaîne polypeptidique α et d'une chaîne polypeptidique β , toutes les deux composées d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire α_1 et α_2 pour la chaîne α , et β_1 et β_2 pour la chaîne β (figure 1.9). Chaque chaîne α s'hétérodimérise avec une chaîne β . Les domaines α_1 et β_1 s'assemblent pour former le site de liaison de l'antigène, et les domaines α_2 et β_2 s'associent pour permettre la reconnaissance du récepteur TCR sur les LT CD4 auxiliaires (figure 1.10). La liaison aux LT CD4 va déclencher une réaction immunitaire directement contre le pathogène. Chaque chaîne polypeptidique α et β est codée par la région génétique du CMH II comprenant 3 gènes principaux : DR, DP et DQ. Ces régions sont également hautement polymorphiques offrant une fois de plus une diversité génétique très variée entre chaque individu (figure 1.8) (Kedzierska & Koutsakos, 2020; Nicholson, 2016).

Les CMH II sont présents à la surface des cellules spécialisées du système immunitaire, appelées cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques ou les macrophages. Contrairement aux CMH I, les peptides qui se fixent sur le CMH II sont d'origine extracellulaire ou sont dégradés dans les vésicules d'endocytose par les protéases. Les CMH II sont synthétisés dans le RE où ils sont associés à une chaîne invariante qui bloque la fixation sur le CMH II. Le CMH II inactif est transporté dans une vésicule où il s'associe avec le peptide antigénique par échange de haute affinité peptidique avec la chaîne invariante. Le complexe CMH II-peptide est alors libéré à la surface des cellules où il sera reconnu par les LT CD4 dont la fonction est d'activer la réponse immunitaire (figure 1.10). Les LT CD4 peuvent recruter des cellules immunitaires aux sites d'infection, aider aux fonctions effectrices, telles que celles menées par les LT CD8, ou induire une action antivirale directe. Les LT CD4 permettent notamment l'activation des LB (Kedzierska & Koutsakos, 2020).

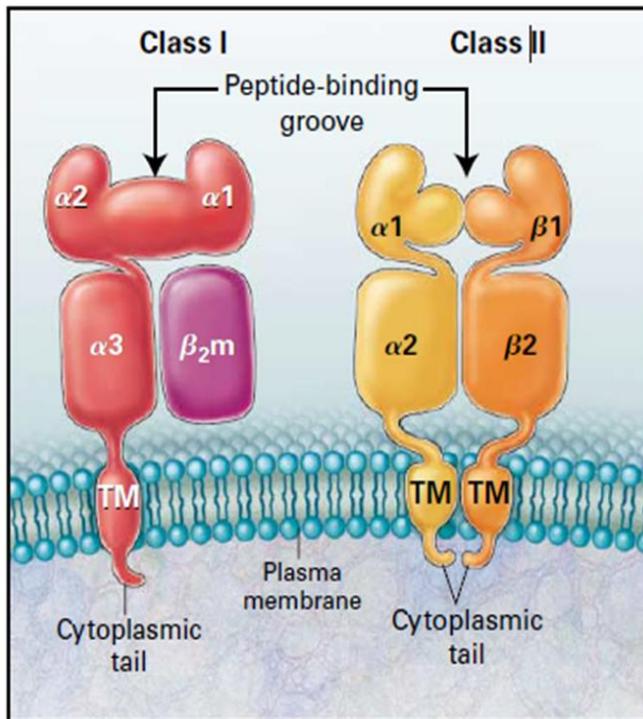


Figure 1.9. Structure des CMH classe I et II (Klein et Sato, 2000). Le CMH I est composé d'une chaîne polypeptidique α divisée en 3 domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, d'une chaîne polypeptidique $\beta 2$ microglobuline, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ constituent le site de liaison antigénique. Le CMH II est composé d'une chaîne α , constituée de 2 domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$; et d'une chaîne polypeptidique β , constituée de 2 domaines $\beta 1$ et $\beta 2$. Les deux chaînes sont composées d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ constituent le site de liaison antigénique.

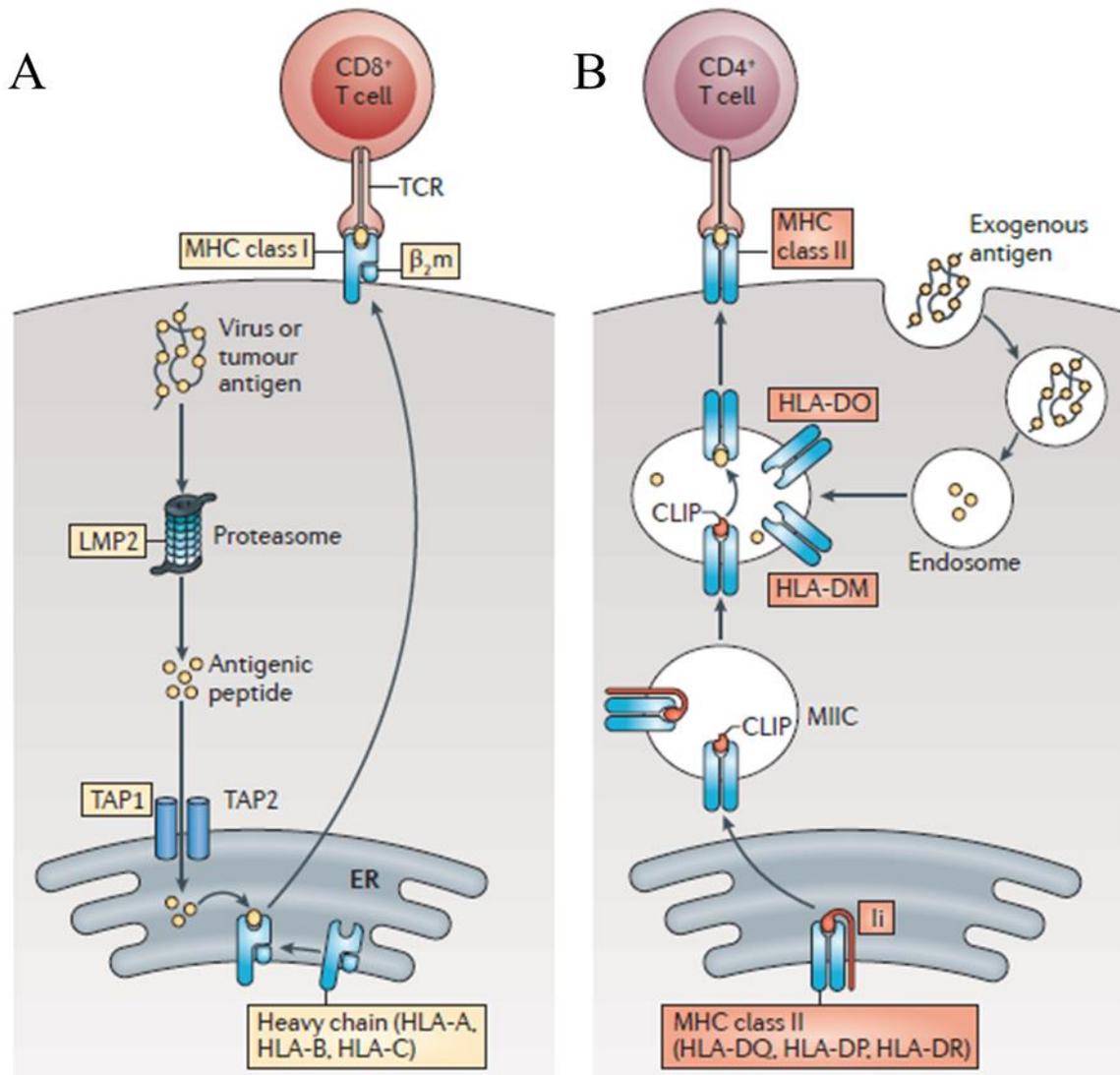


Figure 1.10. Mécanisme de présentation des antigènes par les CMH I et II (Kobayashi & van den Elsen, 2012). Les antigènes intracellulaires générés par l'infection de virus dans une cellule, ou les antigènes tumoraux sont dégradés en peptides par les protéasomes. Les peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) où ils sont fixés sur le CMH I qui les reconnaît. Le complexe CMH I-peptide passe dans l'appareil de Golgi afin d'être transporté à la membrane par une vésicule. La reconnaissance entre le MHC I et le récepteur T (TCR) à la surface des cellules T CD8⁺ cytotoxique permet l'activation de ces cellules T CD8⁺ afin de tuer la cellule infectée (A). Des antigènes extracellulaires sont ingérés par des cellules et transformés en peptides par les voies endolysosomales. Ces peptides se lient au CMH II à la place du « peptide invariant associé au CMH II (CLIP) ». Le complexe CMH II-peptide est libéré à la membrane de la cellule présentatrice d'antigène pour se lier aux lymphocytes T CD4⁺ (B).

b) Origine génétique des EL LGII

Des prédispositions génétiques dans certaines maladies auto-immunes ont été associées au HLA (Sollid et al., 2014). De récentes études, notamment menées sur différents groupes de

patients asiatiques et caucasiens, ont mis en évidence qu'environ 90% des patients atteints d'EL LGI1 sont porteurs de l'haplotype HLA DRB1*07:01 contre 20% dans la population générale (Kim et al., 2017; van Sonderen et al., 2017). Il y a donc une forte association entre l'HLA DRB1*07:01 et les EL LGI1 (Muñiz-Castrillo et al., 2020). En termes de nomenclature, cela signifie que les patients portent au niveau du gène codant les HLA de classe II, sur le locus DR codant pour la chaîne β 1, l'allèle 01 de la série allélique 07.

5) Caractérisation des auto-ac anti-LGI1 :

Les immunoglobulines (Ig) ou plus communément appelés « anticorps » sont des glycoprotéines qui ont pour fonction la reconnaissance spécifique d'un antigène. Les Ig sont synthétisées par les LB différenciés en plasmocytes après un premier contact avec l'antigène. Les Ig sont composées de deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques, reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne légère est composée d'une région variable (VL) et d'une région constante (CL). Chaque chaîne lourde est composée d'une région variable (VH) et de 3 régions constantes (CH1, CH2 et CH3). L'association des régions de la chaîne légère VL et CL avec les domaines variables et constants de la chaîne lourde VH et CH1, forme le fragment Fab qui contient le site de liaison à l'antigène. Les domaines constants de la chaîne lourde CH2 et CH3 constituent le fragment constant. Il existe 2 types de chaînes légères κ ou λ , et 5 types de chaînes lourdes : α , δ , μ , ϵ et γ (figure 1.11). Les Ig sont divisées en sous-classe qu'on appelle des isotypes. L'isotype d'une Ig est déterminé par la composition de sa chaîne lourde : les IgA, les IgD, les IgM, les IgE et les IgG (figure 1.12) (Schroeder & Cavacini, 2010).

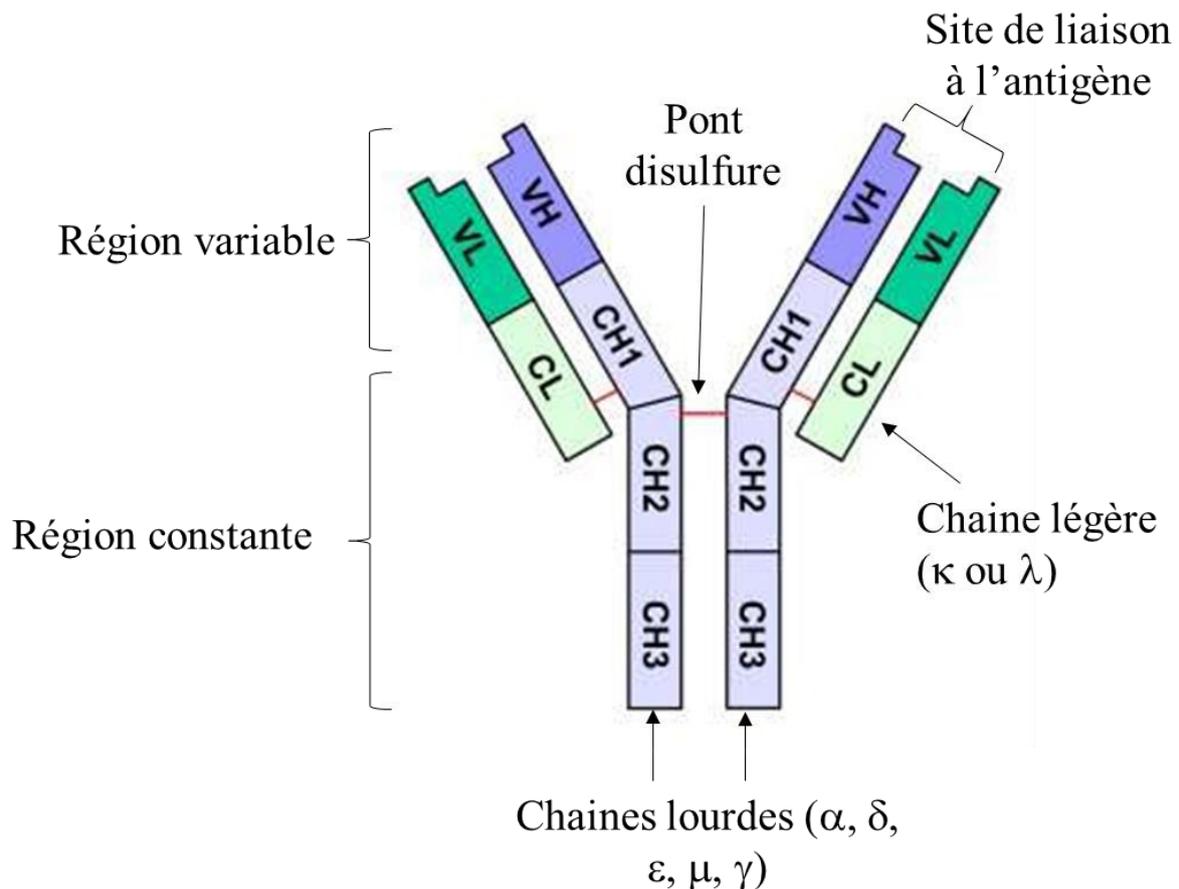


Figure 1.11. Structure d'une immunoglobuline (Ig). Les Ig sont composées de deux chaînes lourdes (α , δ , μ , ϵ et γ) et de deux chaînes légères (κ ou λ) reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne est composée d'une région constante et d'une région variable. Les régions variables forment les sites de liaison aux antigènes.

a) Les différents isotypes d'Ig

Les IgA sont majoritairement présents au niveau des muqueuses où elles sont communément organisées en dimère. Les IgD et les IgM sont présents à la surface des LB où ils agissent comme récepteurs des cellules B. Les IgM ont la particularité d'être organisées en pentamères lorsqu'elles se trouvent sous forme circulante. Les IgE sont présentes exclusivement chez les mammifères et se trouvent en faible quantité dans le plasma. Les IgE sont responsables des réponses inflammatoires à l'origine notamment des réactions allergiques. En interagissant avec les cellules basophiles et les mastocytes, les IgE entraînent la libération de médiateurs inflammatoires, de cytokines et d'enzymes (Nicholson, 2016; Schroeder & Cavacini, 2010).

Les IgG sont les Ig les plus abondantes dans le sérum en représentant 75% des Ig totales contre respectivement 10 et 15% pour les IgM et IgA (Schroeder & Cavacini, 2010). Les IgG participent à la réponse immunitaire adaptative ou secondaire dans laquelle leur rôle est essentiel. En effet, les IgG ont la capacité de se lier à aux pathogènes afin de les neutraliser et ainsi jouent un rôle protecteur au cours d'une infection.

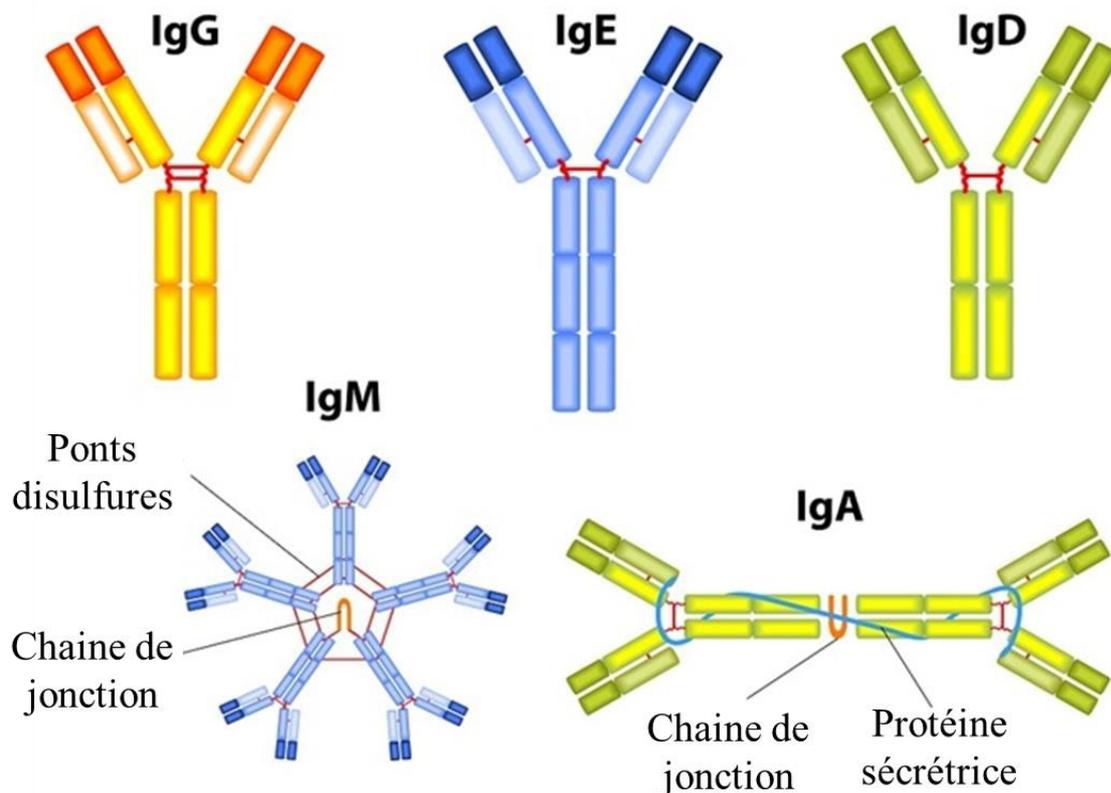


Figure 1.12. Les différents isotypes d'immunoglobulines. Les structures des IgG, IgE et IgD sont monomériques. Les IgM sont majoritairement organisées en pentamère. Les IgA sont majoritairement organisées en dimère.

b) Les sous-types d'IgG

Il existe 4 sous-types d'IgG dont les fonctions diffèrent légèrement : les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Leur séquence en acides aminés est identique à 90% (Schroeder & Cavacini, 2010).

- Les IgG1 sont généralement la sous-classe d'IgG la plus produite lors d'une réponse immunitaire. Les IgG1 ont la capacité d'activer la voie classique du système du complément en liant le C1q (Nicholson, 2016; Schroeder & Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014). Le système du complément est un groupe de protéines intracellulaires qui s'activent en cascade et qui est impliqué dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Cette activation en cascade débute notamment avec le complexe protéique C1 composé de 3 sous-unités incluant la sous-unité C1q. Ce système permet l'élimination des pathogènes (Vidarsson et al., 2014).
- Les IgG2 sont particulièrement réactives aux capsules de polysaccharides des bactéries. Il a été montré qu'une déficience en IgG2 augmente la sensibilité aux infections bactériennes (Shackelford et al., 1990; Jefferis & Kumararatne, 2008). Les IgG2 ont également la capacité d'activer le complément en se liant au C1q (Nicholson, 2016; Schroeder & Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014).
- Les IgG3 sont des anticorps pro-inflammatoire particulièrement efficace dans les fonctions effectrices, c'est-à-dire dans l'activation du système du complément. Leur durée de demi-vie est plus courte que celle des autres sous-classes d'IgG afin de limiter les réponses inflammatoires excessives (Nicholson, 2016; Schroeder & Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014).
- Les IgG4 sont le seul sous-type d'IgG n'ayant pas la capacité d'activer le système du complément. La production d'IgG4 se fait généralement après une exposition prolongée à l'antigène dans un environnement non inflammatoire (Schroeder & Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014; Nicholson, 2016; Perugino & Stone, 2020).

Chez les patients atteints d'EL LGI1, il a été montré que les IgG anti-LGI1 présents dans le sérum et dans le LCR sont principalement des IgG4 (Ariño et al., 2016; Kornau et al., 2020; Muñoz-Castrillo et al., 2021; van Sonderen et al., 2017). Les IgG LGI1 ont la particularité d'être

des ac polyclonaux (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020), c'est-à-dire que pour un même patient l'ensemble des ac ne reconnaissent pas une cible antigénique commune mais que plusieurs ac reconnaissent des parties différentes de la protéine.

c) Cause des EL LGI1 et origine des anticorps

Tout comme la majorité des EL, l'origine des ac anti-LGI1 n'a pas été identifiée. Bien que la protéine LGI1 soit une protéine neuronale, la présence des ac dans le sérum et le LCR des patients reste une des questions à élucider. Néanmoins, 3 hypothèses sont possibles afin d'expliquer l'origine des IgG anti-LGI1 dans le LCR et le sérum : les ac seraient synthétisés dans le sérum et passeraient la BHE pour se retrouver dans le LCR ; ou les ac seraient synthétisés dans le LCR et passeraient ensuite dans le sérum ; ou les ac du sérum et du LCR auraient des origines différentes et seraient synthétisés dans le sérum et dans le LCR sans échange entre les deux compartiments. De récentes études suggèrent une origine différente des LB dans le LCR et dans le sérum, avec une activation intrathécale des LB du LCR due à une exposition chronique des peptides antigéniques de la protéine LGI1 (Kornau et al., 2020; Lehmann-Horn et al., 2020). Néanmoins, le manque d'études et le peu de patients constituant ces études, ne permettent pas, à l'heure actuelle, de conclure sur le lieu de production des ac anti-LGI1.

6) Conclusion du chapitre 1

Dans ce premier chapitre, nous avons vu que les EL LGI1 font parties d'un groupe de maladies auto-immunes rares conduisant à des troubles neurologiques sévères tels que l'apparition de crises d'épilepsie et des troubles de la mémoire. Depuis leur découverte en 2010 (Irani et al., 2010; M. Lai et al., 2010), de plus en plus d'études s'intéressent à cette maladie et aux dysfonctionnements auto-immunitaires qui la caractérise. Bien que la sémiologie de la maladie soit de plus en plus comprise, de nombreuses questions concernant ses origines et ses

mécanismes d'action restent en suspens. Les mécanismes conduisant à la production d'auto-ac dirigés contre une cible neuronale sont encore inconnus, ainsi que les mécanismes induisant la rupture de la BHE et le passage de cellules immunitaires dans le LCR. La rupture de la BHE se retrouve dans d'autres maladies auto-immunes, telle que la sclérose en plaques (Varatharaj & Galea, 2017). Ainsi, l'étude et la compréhension des EL LGI1 peuvent être un véritable outil dans la compréhension des mécanismes d'action de la BHE.

Le diagnostic des EL LGI1 est difficile en raison de la similitude des symptômes avec d'autres maladies neurologiques. Seules les crises FBDS constituent un véritable marqueur précoce de ces maladies mais elles ne sont pas présentes chez tous les patients (Irani et al., 2013; Muñoz-Castrillo et al., 2021). Bien que les crises FBDS soient bien caractérisées et reconnaissables chez les patients (Irani et al., 2013), les mécanismes d'action sous-jacents ces crises et la cause de leur présence uniquement dans les EL LGI1 n'est pas connue. Les immunothérapies bien qu'étant des traitements efficaces pour les EL LGI1, agissent lors des stades précoces de la maladie mais sont moins efficaces sur les troubles neurologiques qui, une fois installés, persistent souvent après les traitements (Ariño et al., 2016; van Sonderen, Petit-Pedrol, et al., 2017; Sola-Valls et al., 2020). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mettre en place un diagnostic précoce des EL LGI1, particulièrement en cas d'absence de crises FBDS, dans le but d'améliorer la prise en charge des patients et d'empêcher l'installation de troubles cognitifs sur le long-terme. De plus, une meilleure compréhension des mécanismes d'action sous-jacents les EL LGI1 permettrait d'améliorer les traitements dans le but de cibler plus spécifiquement les auto-ac anti-LGI1 et de limiter les risques de rechute après traitement. Récemment, les origines génétiques des EL LGI1 associées aux HLA ont été identifiées (Kim et al., 2017; van Sonderen, Roelen, et al., 2017; S. Binks et al., 2018; Muñoz-Castrillo et al., 2020). Cette découverte pourrait nettement améliorer la prise en charge précoce des patients porteurs du HLA DRB1*07:01 qui sont sujets à développer des EL LGI1.

L'apparition progressive des symptômes, débutant par les crises d'épilepsie puis évoluant vers des troubles cognitifs telles que des amnésies, suggèrent que les ac anti-LGI1 ont une action directe sur les crises d'épilepsie et indirecte sur les troubles cognitifs associés. En effet, le contrôle des crises d'épilepsie empêche le développement des troubles cognitifs (van Sonderen, Petit-Pedrol, et al., 2017). Il est admis que les crises d'épilepsie provoquent une mort neuronale et l'apparition de connexions aberrantes qui non seulement favorisent le déclenchement d'une nouvelle crise d'épilepsie, mais également l'apparition de troubles cognitifs tels que ceux observés secondairement chez les patients atteints d'EL LGI1 (Long et al., 2014; Sloviter, 1999; Cui et al., 2020). Des études fondamentales sont nécessaires afin de définir précisément la fonction de la protéine LGI1 dans le SNC et les mécanismes de dérégulation entraînés par la perte de fonction de la protéine LGI1.

Dans ce chapitre, nous avons décrit les EL LGI1 et montré l'implication du système immunitaire dans cette pathologie. Dans le prochain chapitre, nous allons nous intéresser aux structures cérébrales affectées lors des pathologies liées à un dysfonctionnement de la protéine LGI1 comme les EL LGI1 mais également une forme d'épilepsie du lobe temporal. Plus particulièrement, nous allons nous intéresser à l'hippocampe, qui est la principale structure touchée dans ces pathologies, pour comprendre, dans le dernier chapitre, comment les dysfonctionnements de la protéine LGI1 perturbent le fonctionnement du réseau neuronal.

Chapitre II. L'hippocampe

1) Généralités

Au cours du développement, le tube neural se divise en 3 parties sur son côté rostral : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Alors que la partie caudale du tube neural donnera la moelle épinière, les 3 parties rostrales du tube neural se diviseront en 5 parties : le prosencéphale donnera le télencéphale et le diencéphale ; le mésencéphale ne se dédouble pas ; le rhombencéphale donnera le métencéphale et myélocéphale. C'est à partir de ces 5 structures que se formeront les différentes parties de l'encéphale. L'hippocampe dérive du télencéphale (figure 2.1).

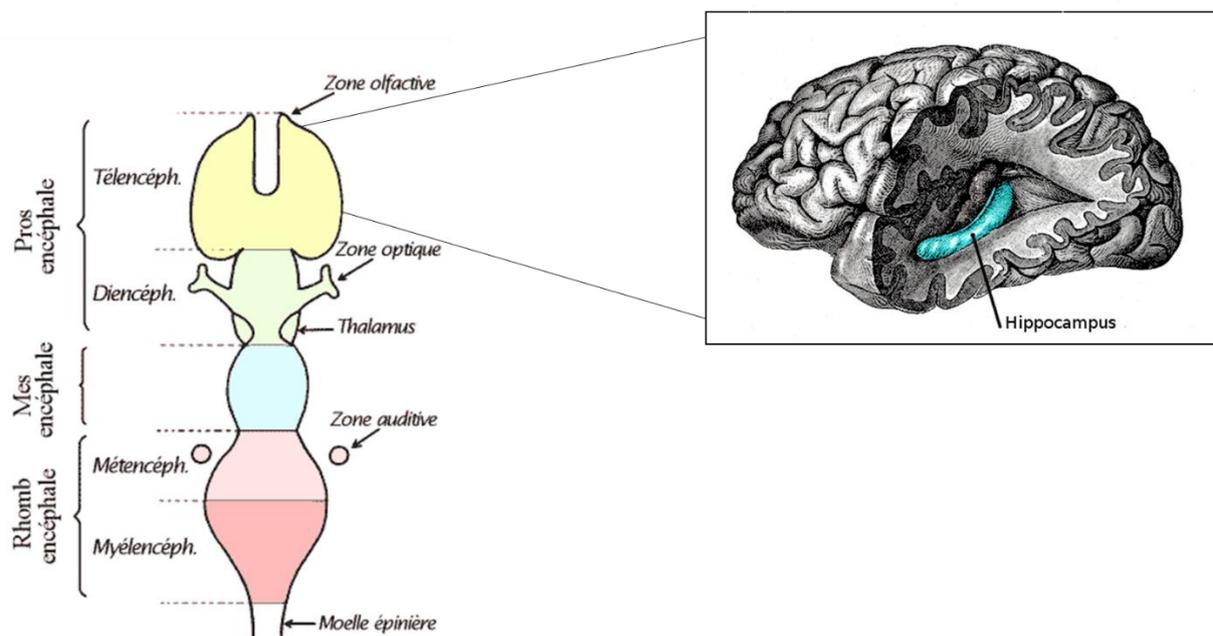


Figure 2.1. Origine de l'hippocampe. Le tube neural se divise en 3 parties : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Ces 3 parties se divisent ensuite en 5 parties : le prosencéphale donne naissance au télencéphale et au diencéphale ; le mésencéphale ne se divise pas ; le rhombencéphale donne naissance au métencéphale et au myélocéphale. La majorité des structures de l'encéphale, dont l'hippocampe, dérive du télencéphale.

L'hippocampe est une structure arquée appartenant au système limbique jouant un rôle critique dans la mémoire déclarative et la navigation spatiale (Lisman et al., 2017; Goode et al., 2020; Moser et al., 2017). Chez les rongeurs, l'hippocampe est une structure large située en dessous du cortex (figure 2.2A). Chez les humains, l'hippocampe est une structure profonde enfouie dans le lobe temporal médian (figure 2.2B). L'organisation interne du circuit de l'hippocampe est bien conservée entre les espèces (figure 2.2). En effet, chez les mammifères l'hippocampe est composé du gyrus denté (GD) et de la corne d'Ammon (CA) qui est divisée en 3 régions : CA3, CA2 et CA1. Une 4^{ème} région CA4 est admise par certains chercheurs mais il n'y a actuellement pas de consensus du fait du peu d'étude existante à son sujet. Certains auteurs la considèrent comme une région de l'hippocampe alors que d'autres considèrent que cette région est composée de cellules mossues qui appartiennent au GD (Schultz and Engelhardt, 2014).

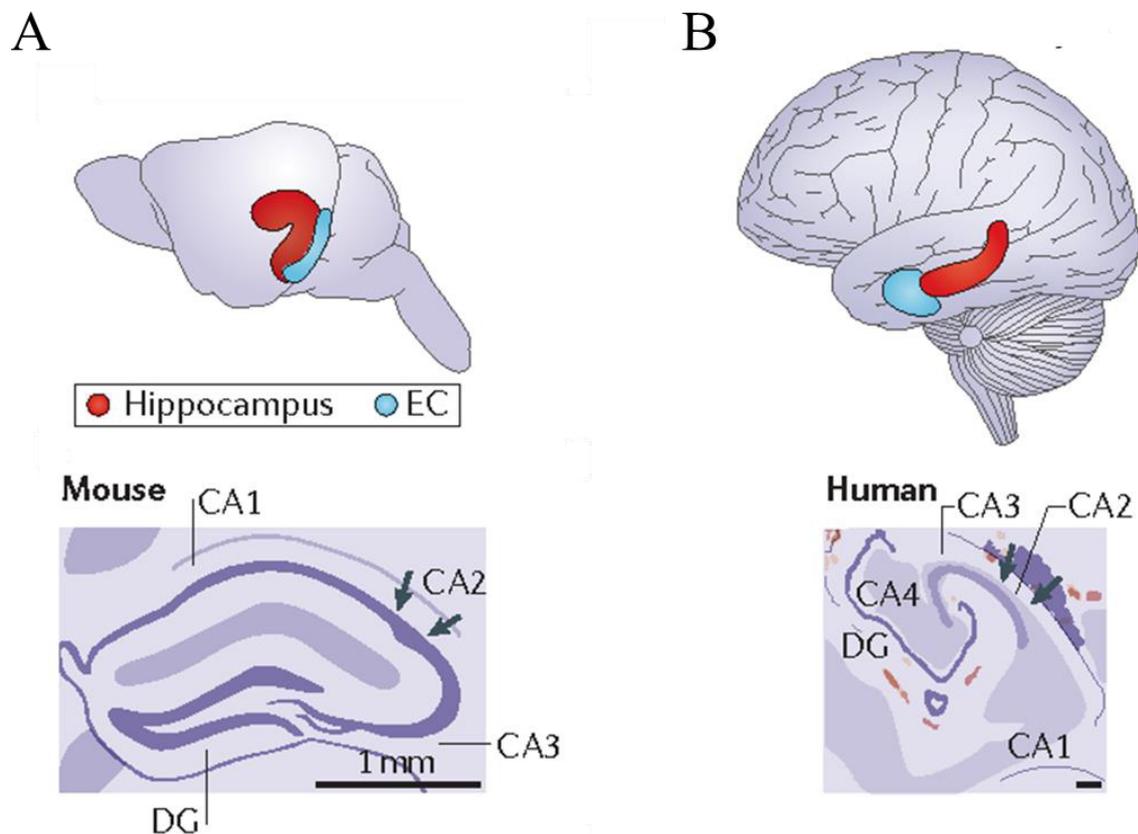


Figure 2.2. L'anatomie de l'hippocampe dans le cerveau d'un rat et d'un humain (adapté de Strange et al., 2014). Dans le cerveau d'un rat, l'hippocampe est une structure orientée selon l'axe dorso-ventral du cerveau. Le cortex entorhinal (CE) est situé sur la partie postérieure de l'hippocampe. L'hippocampe de rat est constitué des couches GD, CA3, CA2 et CA1 (A). Dans le cerveau humain, l'hippocampe est une structure profonde orientée dans l'axe antéro-postérieur du cerveau. Le CE est situé vers la partie antérieure de l'hippocampe. En plus des couches DG, CA3, CA2 et CA1, il existerait une couche CA4 dans l'hippocampe humain (B). EC : cortex entorhinal, DG : gyrus denté.

L'hippocampe est une structure interconnectée à des structures adjacentes, notamment le cortex entorhinal (CE) et la région subiculaire formée du subiculum, du présubiculum et du parasubiculum. La connexion de ces 3 structures compose la formation hippocampique (figure 2.3). Le subiculum et le CE agissent en collaboration avec l'hippocampe dans le contrôle des fonctions cognitives.

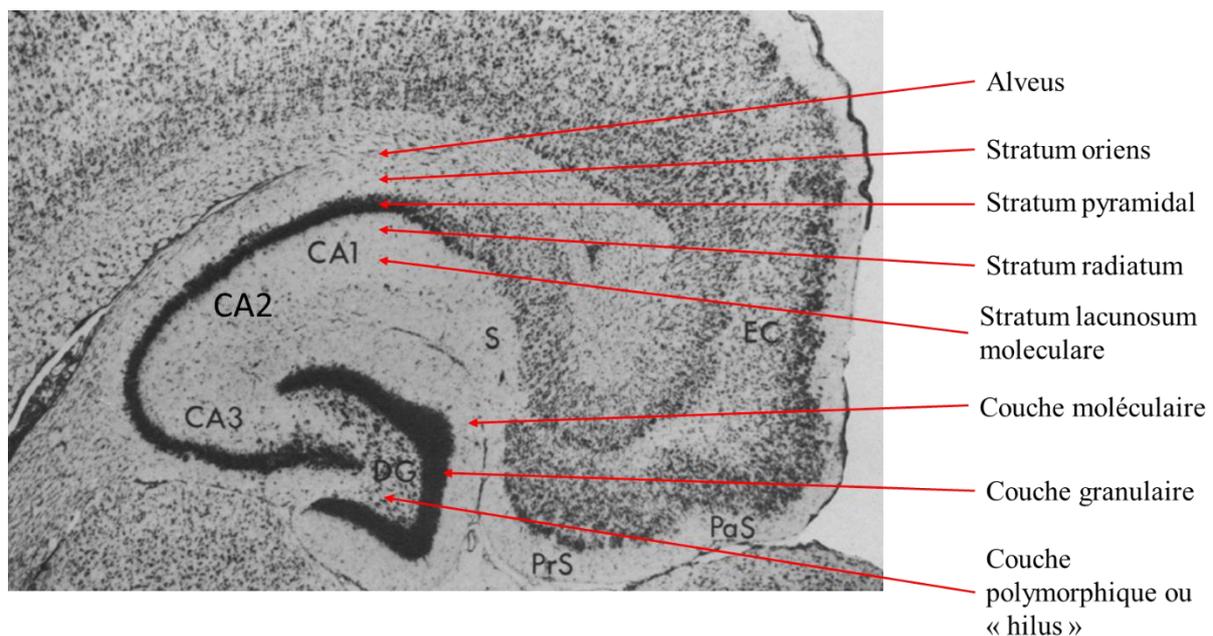


Figure 2.3. Coupe transversale de la formation hippocampique de rat (adapté de Amaral and Witter, 1989). La formation hippocampique est composée de l'hippocampe (DG = gyrus denté, CA= corne d'Ammon), du subiculum (S), du présubiculum (PrS), du parasubiculum (PaS) et du cortex entorhinal (EC). Le GD est divisé en 3 couches : la couche moléculaire, la couche granulaire et la couche polymorphique. La CA est composée de 5 couches : l'alveus, le stratum oriens, le stratum pyramidal, le stratum radiatum et le stratum lacunosum moleculare.

2) Anatomie

a) Le cortex entorhinal et le subiculum

Le subiculum est la principale voie de sortie de l'hippocampe. Le subiculum lie la région CA1 de l'hippocampe et le CE (figure 2.3) (Knierim, 2015). Le subiculum se divise en 2 couches : la couche moléculaire qui contient les dendrites apicales des cellules pyramidales du subiculum ; et la couche pyramidale qui contient les somas des cellules pyramidales. La couche pyramidale se subdivise en 2 sous-couches : la sous couche interne et externe. Le présubiculum et le parasubiculum sont composés chacun d'une seule couche de cellules et sont peu différenciables entre eux (Schultz and Engelhardt, 2014).

Le CE se situe après le subiculum et sert de structure d'entrée et de sortie de la formation hippocampique (figure 2.3). L'hippocampe communique avec d'autres structures, tels que le cortex piriforme et l'amygdale, par le CE. Le CE est composé de 5 couches cellulaires divisées en 2 parties : le CE médian (CEM) qui est associé aux processus cognitifs liés à l'orientation spatiale, et le CE latéral (CEL) qui est associé aux fonctions mnésiques (Canto et al., 2008; Schultz and Engelhardt, 2014).

b) Le gyrus denté

Le GD est une structure en U qui relie le CE et la région CA3. Le GD est organisé en 3 couches : la couche moléculaire, la couche granulaire, et la couche polymorphique (figure 2.3).

La couche moléculaire est située sur la partie externe du GD, au-dessus de la couche granulaire. La couche moléculaire contient principalement les dendrites des cellules granulaires et les axones des cellules qui envoient des afférences sur le GD tels que les neurones du CE (Amaral et al., 2007; Pelkey et al., 2017; Schultz and Engelhardt, 2014). La couche moléculaire contient également quelques interneurons inhibiteurs dont les cellules chandeliers ou axo-axoniques qui sont localisées près de la couche granulaire et qui envoient leur axones dans la couche

granulaire et polymorphique (Amaral et al., 2007; Pelkey et al., 2017) ainsi que les cellules « molecular layer perforant path-associated cell » ou « cellules associées à la voie perforante de la couche moléculaire (MOOP) » (Amaral et al., 2007; Li et al., 2013). Chez l'Homme, on distingue une autre couche appelée « couche polymorphique sous-jacente » qui contient les dendrites basales des cellules granulaires (Schultz and Engelhardt, 2014).

La couche granulaire contient les somas des cellules granulaires qui sont les cellules excitatrices glutamatergiques composant le GD (Schultz and Engelhardt, 2014). En plus des cellules granulaires, résident des interneurons inhibiteurs telles que les cellules en corbeille (Amaral et al., 2007; Pelkey et al., 2017). La couche granulaire contient une sous-couche appelée « zone sous-granulaire » dans laquelle se trouvent des cellules souches qui servent à la neurogenèse à l'âge adulte (Amaral et al., 2007).

La couche polymorphique ou « hilus » est située entre la couche granulaire et la région CA3. La couche polymorphique contient les axones non myélinisés des cellules granulaires appelés « fibres moussues » (figure 2.4). Les fibres moussues ont la particularité de former des synapses dites « en passant » avec les cellules de la couche polymorphique et avec les cellules pyramidales de la couche CA3 (Amaral et al., 2007; Schultz & Engelhardt, 2014). De plus, les fibres moussues sont très ramifiées et innervent ainsi un grand nombre de cellules dont des interneurons. Les interneurons présents dans la couche polymorphique du GD sont des cellules en corbeille. Les cellules en corbeille sont des cellules dont les fibres projettent uniquement sur le GD. La couche polymorphique contient également des cellules fusiformes appelées « hilar perforant path-associated cell (HIPP) » qui envoient des axones dans la couche moléculaire.

c) La corne d'Ammon (CA)

La CA se subdivise en 3 régions : CA3, CA2 et CA1 (figure 2.3). La région CA3 est contactée par les fibres du GD et envoie ses afférences vers la région CA2. La région CA2 contactée par la région CA3 et envoie ses afférences vers la région CA1. La CA est principalement composée des cellules pyramidales qui sont des cellules excitatrices glutamatergiques (Schultz and Engelhardt, 2014). La CA est divisée en 5 couches : la couche la plus externe est l'*alveus*, elle constitue la limite supérieure de l'hippocampe et est composée majoritairement des efférences de l'hippocampe. En dessous de l'*alveus*, se trouve le *stratum oriens* (s.o) qui contient principalement les dendrites basales des cellules pyramidales et des interneurons. Sous le s.o se trouve la couche pyramidale ou *stratum pyramidal* (s.p) qui contient les somas des cellules pyramidales. Le s.p est la couche la plus visible et reconnaissable de l'hippocampe en raison de la forte densité des corps cellulaires qui lui donne un aspect plus foncé que le reste de l'hippocampe (Schultz and Engelhardt, 2014). Dans la partie interne de l'hippocampe, en-dessous du s.p, se trouve le *stratum radiatum* (s.r) qui contient les dendrites basales des cellules pyramidales puis le *stratum lacunosom-moleculare* (s.l.m) contenant les dendrites apicales des cellules pyramidales (Schultz and Engelhardt, 2014). Dans la couche CA3 se trouve une couche supplémentaire localisée entre le s.p et le s.r qui est appelée *stratum lucidum* (s.l) et qui contient les dendrites basales des cellules pyramidales (figure 2.3).

i. CA3

Les neurones pyramidaux sont les principales cellules de la région CA3. En plus des cellules pyramidales, le région CA3 est peuplée d'une faible proportion d'interneurones inhibiteurs, notamment les cellules chandeliers ou axo-axoniques (Pelkey et al., 2017). Les cellules chandeliers envoient leurs dendrites dans toutes les couches de la région CA3, allant de l'*alveus* au s.l.m. Les axones des cellules chandeliers sont présents dans le s.p et dans le s.o (Pelkey et al., 2017; Schultz and Engelhardt, 2014).

ii. CA2

La région CA2 est la région la moins étudiée de l'hippocampe. Il a longtemps été pensé que cette région n'était constituée que des fibres communicantes entre les régions CA3 et CA1. Néanmoins, de nombreuses cellules constituent cette région (figure 2.4).

Dans la région CA2, les axones des cellules pyramidales relient les régions CA3 et CA1 et sont appelés « collatérales de Schaffer ». Les collatérales de Schaffer innervent les cellules pyramidales de la région CA2 dans les couches s.o. et s.r. Les cellules pyramidales qui composent la région CA2 sont compactes et étroites, leurs somas sont ovoïdes, larges et denses (Pang et al., 2019). Les dendrites des cellules pyramidales sont plus courtes que dans les régions CA1 et CA3 et leurs axones s'étendent dans le s.r et le s.o. des régions CA1, CA2 et CA3 (Mercer et al., 2007). Les collatérales de Schaffer activent la région CA1 principalement par la région CA2.

La majorité des interneurons de la région CA2 sont les cellules en corbeille dont l'arborisation dendritique est très étendue et projette vers le s.o, le s.r et le s.l.m et parfois entre dans l'*alveus*. Leurs axones arborisent le s.p et parfois le s.o et le s.r (Mercer et al., 2007). Les interneurons à parvalbumine et les cellules bistratifiées sont également présents dans la région CA2. Les dendrites des cellules bistratifiées s'étendent aux s.o. et s.r sans entrer dans le s.l.m et leurs axones innervent les régions CA1 et CA2 (Mercer et al., 2007). Les cellules en corbeille et bistratifiées de la région CA2 se divisent en 2 catégories : les cellules ayant une morphologie similaire à celles de la région CA1 et qui ont également des propriétés électrophysiologiques comparables ; et celles ayant un arbre dendritique plus large qui s'étend dans les 3 régions de la CA et qui présentent des différences électrophysiologiques (Mercer et al., 2007). Les cellules en corbeille de la région CA2 reçoivent plus d'afférences que les cellules en corbeille de la région CA1 et les cellules bistratifiées, fournissent la principale rétro-inhibition des régions CA1 et CA2 (Mercer et al., 2007). Les interneurons à parvalbumine sont particulièrement

diminués dans les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et la schizophrénie (Benes, 1999; Piskorowski et al., 2016; Pang et al., 2019). Ainsi, la région CA2 suscite de plus en plus d'intérêt à elle-seule, en raison de son rôle important dans les neuropathologies affectant l'hippocampe. En effet, la région CA2 montre une forte résistance aux crises d'épilepsie et à l'hypoxie (Benoy et al., 2018; Pang et al., 2019). De plus, la région CA2 se distingue des autres régions par la différence d'expression de certains gènes (figure 2.4) et par sa résistance à l'induction de la LTP dans la couche s.r. qui reçoit les afférences de la région CA3 (Lein et al., 2005; M. Zhao et al., 2007; Benoy et al., 2018). La LTP peut cependant être induite dans la couche s.l.m. recevant les afférences du CE (Chevalyere & Siegelbaum, 2010). La région CA2 semble être critique dans la formation de la mémoire sociale (Benoy et al., 2018).

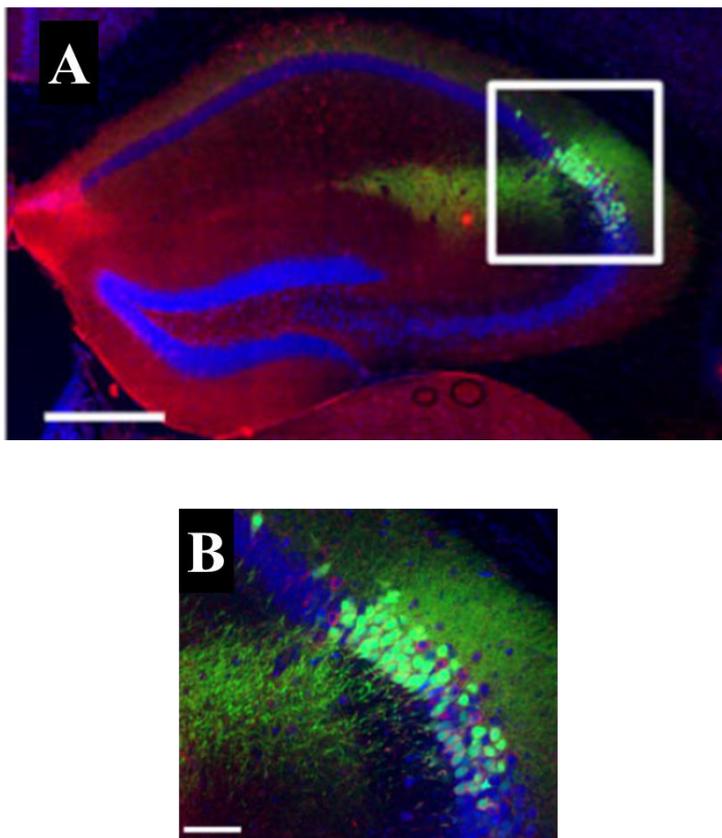


Figure 2.4. Les neurones pyramidaux de la région CA2 expriment des gènes propres à cette région (Hitti & Siegelbaum, 2014). Coupe frontale d'hippocampe de souris *Amigo-Cre* qui expriment la protéine Cre recombinase dans les neurones pyramidaux de la région CA2. Un adénovirus (AAV) exprimant la protéine fluorescente YFP (« yellow fluorescent protein ») sous le contrôle de la Cre recombinase a été injecté. La YFP est exprimée dans les neurones de la région CA2 (A). Grossissement de l'aire encadrée dans l'image A (B).

iii. CA1

La région CA1 est la région dans laquelle les neurones pyramidaux sont les plus denses. En plus des cellules pyramidales se trouvent des interneurones, telles que les cellules chandeliers ou les cellules en corbeille (Pelkey et al., 2017). Les cellules chandeliers représenteraient environ 4% des interneurones du CA1. Le soma des cellules chandeliers se trouve dans les s.o et s.r. et leur axone projette sur le s.o et le s.p. Leur large arborisation leur permet d'étendre leurs dendrites sur toutes les couches allant de l'*alveus* au s.l.m. Les cellules en corbeille à parvalbumine, qui représentent environ 14% des interneurones, ont leur soma dans le s.p. ou le s.o. Les cellules en corbeille projettent largement sur les somas et les dendrites des cellules pyramidales avec plus de 2 500 neurones pyramidaux contactés par une cellule en corbeille (Pelkey et al., 2017). De même, les cellules en corbeille ont leur soma dans le s.p. Les corps cellulaires des cellules bistratifiées se trouvent également dans le s.p et projettent leur axone dans les couches s.o et s.r sur les dendrites des cellules pyramidales. D'autres interneurones moins représentés composent également l'hippocampe, telles que les cellules « ivy » qui se trouvent principalement dans le s.l.m (Pelkey et al., 2017). Enfin, 20% des interneurones projettent sur d'autres interneurones de la région CA1. Leur soma se trouve dans le s.r. , le s.p et le s.o, et leur arbre dendritique s'étend principalement dans la couche s.r alors que leur axone se ramifie dans le s.r.,le s.p. et dans le s.o (Pelkey et al., 2017). Les neurones pyramidaux de la région CA1 sont en partie activés par les afférences des neurones de la région CA2 et pleinement activés par les afférences de la région CA3 à travers la voie classique CE-GD-CA3-CA1 (Bartesaghi et al., 2006).

3) La connectivité de la formation hippocampique

a) Réseau intrinsèque de la formation hippocampique

Le schéma simplifié pour définir l'organisation du réseau intrinsèque de la formation hippocampique est le modèle en boucle trisynaptique. Les neurones du CE envoient des afférences vers les cellules du GD via la voie perforante. Les cellules granulaires du GD projettent à leur tour leurs fibres moussues sur les cellules de la région CA3. Les cellules pyramidales de la région CA3 projettent sur les cellules des régions CA2 et CA1. A leur tour, les cellules pyramidales de la région CA1 envoient des efférences vers le CE et ferment la boucle. En vérité, les connexions internes à la formation hippocampique sont plus complexes et ne suivent pas un schéma unidirectionnel.

Les fibres moussues du GD envoient des projections sur les cellules de la région CA3 et envoient également des projections monosynaptiques vers les cellules de la région CA2 (Kohara et al., 2014). Les neurones pyramidaux de la région CA3 peuvent envoyer des projections sur d'autres neurones de cette même région CA3, notamment les fibres commissurales qui projettent sur les cellules de la région rostrocaudale (Schultz & Engelhardt, 2014). Les cellules pyramidales de la région CA3 envoient directement des afférences vers les cellules des couches profondes de la région CA1 ou indirectement en contactant les cellules de la région CA2 qui projettent ensuite vers les couches superficielles de la région CA1 (Kohara et al., 2014; Schultz and Engelhardt, 2014). Les cellules pyramidales de la région CA1 ne projettent pas sur d'autres cellules de la région CA1 mais elles envoient des efférences vers les cellules du GD et de la région CA3 (figure 2.5) (Knierim, 2015) ainsi que vers les cellules du subiculum qui projettent en retour sur les cellules du CE (Schultz and Engelhardt, 2014).

La couche II du CE envoie des projections sur les cellules du GD et de la région CA3. Les cellules de la couche III du CE projettent sur les cellules de la région CA1. La partie interne de

la région CA1 proche de la région CA2 reçoit des afférences du CEM, alors que la partie externe proche du subiculum reçoit des afférences du CEL. Les couches profondes du CE reçoivent en retour des afférences de la région CA1. Les couches CEM et CEL communiquent entre elles. L'ensemble de ces connexions internes permet un rétrocontrôle de l'hippocampe (Knierim, 2015). Néanmoins, il a récemment été montré que la couche III du CEL hyperpolarise les neurones de la région CA1 (Chevalyere & Siegelbaum, 2010). En effet, la forte activité excitatrice qu'exerce le CE sur la région CA1 est indirecte en passant par la région CA2. La région CA2 reçoit des afférences de la couche II du CEL et projettent à son tour sur la région CA1. Cette boucle excitatrice permet à la région CA1 de maintenir une activité sans afférences en provenance de la région CA3 (figure 2.5) (Chevalyere & Siegelbaum, 2010; Benoy et al., 2018).

b) Réseau extrinsèque de la formation hippocampique

La formation hippocampique communique avec d'autres aires cérébrales notamment des aires du système limbique. Le CE reçoit des afférences des cortex préfrontaux, olfactifs et amygdaliens (figure 2.5) (Canto et al., 2008). Les régions CA3 et CA2 reçoivent des projections des fibres cholinergiques et histaminergiques depuis les noyaux du septum et des régions supramamillaires (Frotscher & Léránth, 1985; Bartesaghi et al., 2006; Schultz & Engelhardt, 2014). La région CA2 est la seule région de la CA à être innervée par les fibres des corps mamillaires du noyau hypothalamique qui participent à la génération du rythme thêta (figure 2.5) (Vertes & Mckenna, 2000). La région CA2 n'est donc pas uniquement sous le contrôle des fibres de la région CA3, et peut activer la région CA1 indépendamment de la région CA3 (Bartesaghi et al., 2006; Benoy et al., 2018).

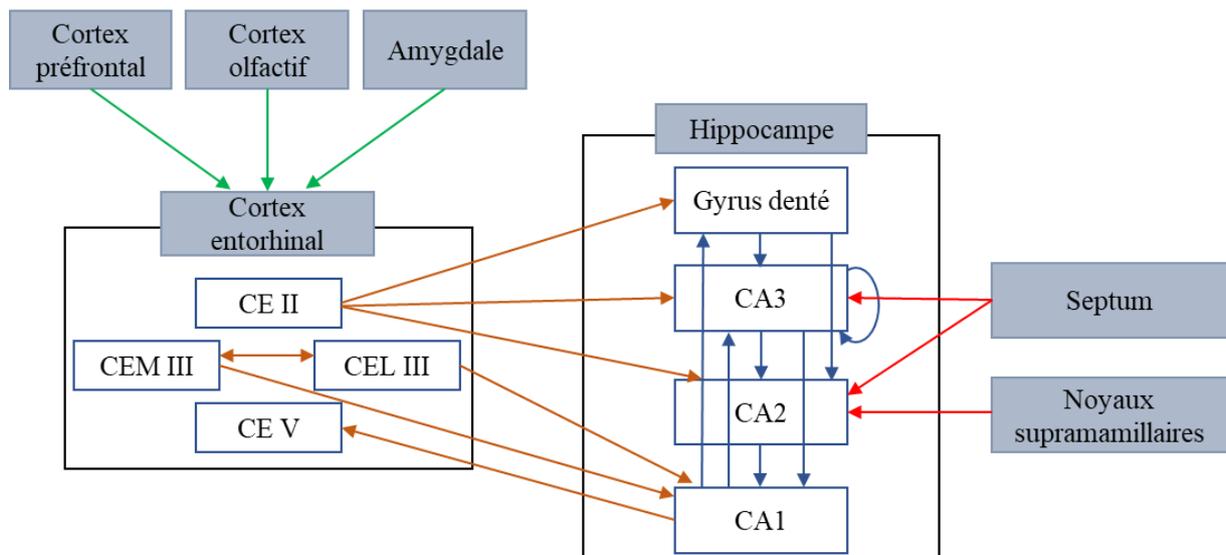


Figure 2.5 Le réseau intrinsèque et extrinsèque de l'hippocampe. Les régions de l'hippocampe communiquent les unes avec les autres (flèches bleues). Le CE projette sur l'hippocampe (flèches marrons). Les cortex préfrontal et olfactif ainsi que l'amygdale projettent sur le CE (flèches vertes). Le septum et les noyaux mamillaires projettent sur les régions CA2 et CA1 (flèches rouges). Le GD reçoit des afférences de la région CA1 et de la couche II du CE et projette sur les régions CA3 et CA2. La région CA3 reçoit des afférences de la couche II du CE et du GD. Les neurones de la région CA3 projettent sur d'autres neurones de la région CA3. La région CA3 projette sur les régions CA2 et CA1. La région CA2 reçoit des afférences de la couche II du CE et projette sur la région CA1. La région CA1 reçoit des afférences des couches II et III du CE, et des régions CA3 et CA2. La région CA1 projette sur la couche V du CE et sur la région CA3 et le GD.

CE II : couche II du CE, CEM III : couche III du CEM, CEL III : couche III du CEL, CE V : couche V du CE.

L'hippocampe est donc une structure organisée dont les réseaux intrinsèques et extrinsèques sont complexes. Dans cette partie nous avons vu que l'hippocampe fonctionne en fine collaboration avec ces structures adjacentes comprises dans la formation hippocampique. Nous avons également vu que d'autres aires cérébrales envoient et reçoivent des informations en contactant directement ou indirectement l'hippocampe. Dans la prochaine partie, nous allons étudier les fonctions cognitives traitées par ce réseau neuronal complexe.

4) Fonctions

a) Mémoire et apprentissage

Il existe 5 types de mémoire (figure 2.6). La première est la mémoire à court-terme ou mémoire de travail. Elle permet de retenir des informations lors de la réalisation d'une tâche, tel que se souvenir d'un numéro de téléphone qui vient d'être énoncé. Ce type de mémoire fait intervenir le cortex préfrontal. Ensuite, il existe la mémoire à long-terme qui se divise en mémoire déclarative ou explicite et en mémoire non déclarative ou implicite. La mémoire implicite comprend les mémoires procédurale et perceptive qui regroupent les processus inconscients. La mémoire procédurale est associée aux automatismes, tels que savoir conduire ou faire du vélo. La mémoire perceptive s'appuie sur les sens, elle permet notamment de se souvenir d'une personne ou d'une odeur. Les deux types de mémoire explicite sont la mémoire sémantique et la mémoire épisodique. La mémoire sémantique est la mémoire du langage, des connaissances du monde qui nous entoure et des connaissances sur soi. Enfin, la mémoire épisodique est la mémoire des événements vécus, elle nous permet de nous situer dans l'espace et dans le temps. L'hippocampe est impliqué dans la mémoire déclarative. Afin de se consolider, les informations nécessitent d'être répétées ou associées à une émotion importante. La consolidation et la restitution de souvenirs repose sur l'hippocampe (Dharani, 2015).

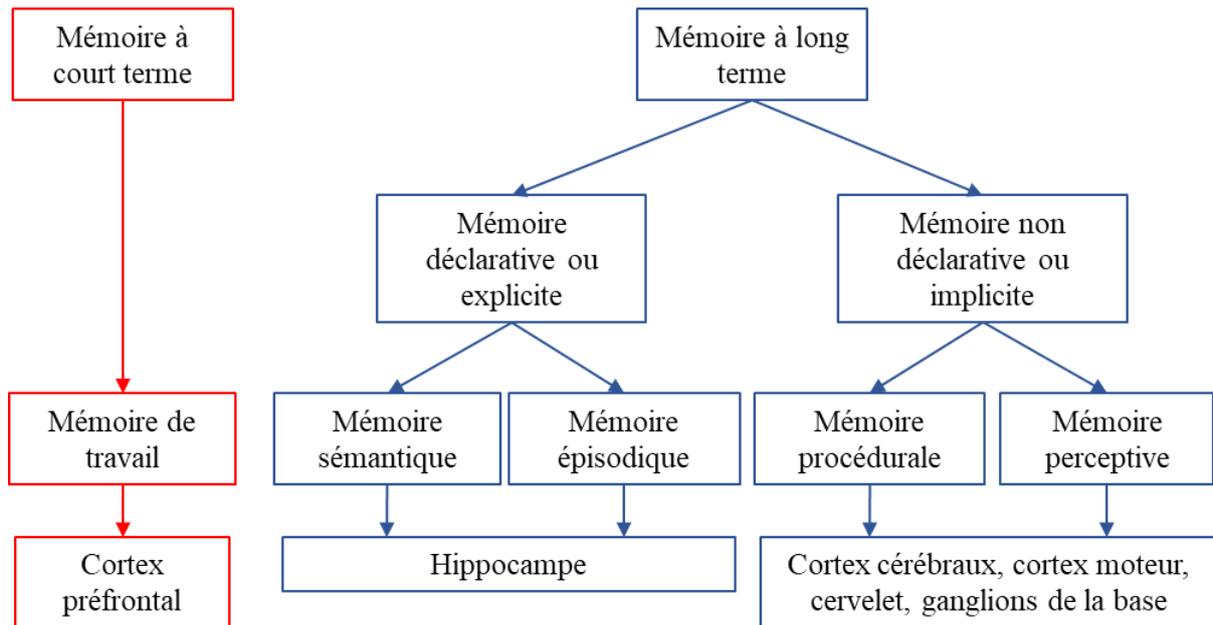


Figure 2.6. Les 5 types de mémoire. La mémoire à court terme ou mémoire de travail est codée par le cortex préfrontal. La mémoire à long terme est divisée en mémoire déclarative et non déclarative. La mémoire déclarative comprend la mémoire sémantique et la mémoire épisodique codées par l'hippocampe. La mémoire non déclarative comprend la mémoire procédurale et la mémoire perceptive codées par les cortex cérébraux, le cortex moteur, le cervelet et les ganglions de la base.

Les études visant à comprendre la fonction de l'hippocampe dans les processus mnésiques ont considérablement augmenté depuis la description du cas clinique du patient H.M. Ce patient a souffert d'une amnésie profonde à la suite d'une résection du lobe temporal médian (LTM) (Corkin, 2002). L'ensemble des études cherchant à comprendre le rôle du LTM dans les mécanismes de mémoire convergent vers un rôle de l'hippocampe dans la mémoire déclarative et plus particulièrement dans la mémoire épisodique (Bierley et al., s. d.; Wixted & Squire, 2011; Moscovitch et al., 2016; Aly & Ranganath, 2018; Sugar & Moser, 2019). Néanmoins, bien que le rôle de l'hippocampe dans les fonctions mnésiques soit clair, l'implication des différentes régions du LTM est sujette à débat (Opitz, 2014). En effet, certains supportent une communication bilatérale entre l'hippocampe et les structures du LTM, faisant de l'hippocampe la structure impliquée dans toutes les formes de mémoire déclaratives. D'autres supportent un autre modèle dans lequel différentes aires du LTM sont impliquées en fonction de la tâche

mnésique. Par exemple, l'hippocampe et le cortex parahippocampique interviendraient dans les souvenirs, c'est-à-dire la reconnaissance d'un objet afin de se souvenir de détails spécifiques appris d'une précédente expérience ; alors que le cortex périrhinal interviendrait dans la familiarité, c'est-à-dire la reconnaissance d'un objet sans se souvenir de détail spécifique lui appartenant. De plus, il y a toujours un débat afin de savoir si l'hippocampe est le centre de la mémoire et fonctionne en étant alimenté par les autres aires du LTM ou si les différentes informations sont traitées par différentes aires. Ce débat est principalement entretenu par la différence entre souvenirs et familiarité, et la question de savoir si le cerveau traite de manière identique ou différentes ces informations est toujours ouverte (Opitz, 2014).

Les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant le codage et le stockage de la mémoire reposent sur la plasticité synaptique (Martin et al., 2000). La plasticité synaptique est la modulation des connexions synaptiques entre les neurones qui peuvent se former, se consolider ou disparaître en fonction de leur activité. Il existe plusieurs formes de plasticité synaptique, mais la forme la plus communément associée aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire est la potentialisation à long-terme (LTP) (Bliss & Lømo, 1973; Citri & Malenka, 2008; Laroche, 2010; Morris, 2003; Neves et al., 2008).

La potentialisation à long terme

La potentialisation à long terme (LTP) correspond aux modifications moléculaires et structurelles qui se produisent dans la synapse après une forte activité. Ces mécanismes conduisent à une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique. La LTP nécessite une synchronisation des mécanismes présynaptiques, qui conduit à une forte libération de glutamate, et des mécanismes postsynaptiques qui conduit à une forte dépolarisation induisant l'activation du R-NMDA (figure 2.7). Le R-NMDA est un récepteur voltage-dépendant perméable au calcium et présent à la surface des membranes postsynaptiques. La transmission synaptique basale est assurée par les R-AMPA (Sheng & Kim,

2011; Diering & Huganir, 2018) en raison de l'inactivité des R-NMDA qui sont bloqués par des ions Mg^{2+} (Coan & Collingridge, 1985; Citri & Malenka, 2008). Lors d'une dépolarisation intense du neurone post-synaptique, l'ion Mg^{2+} fixé au R-NMDA est libéré dans le milieu extracellulaire, permettant l'activation des R-NMDA par la fixation du glutamate. Il en résulte une entrée de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique qui déclenche une série de réactions biochimiques, notamment l'activation d'un ensemble de protéines kinases dont la principale est la calcium/calmoduline kinase II (CamKII) (Lisman et al., 2017). D'autres kinases sont également impliquées telles que la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) ou encore les « mitogen-activated protein kinase (MAPK) ». Ces protéines kinases déclenchent 2 mécanismes essentiels à la plasticité synaptique : la phosphorylation de protéines dont les R-AMPA et R-NMDA dans le but d'augmenter leur sensibilité, et l'augmentation de la traduction et transcription de protéines. L'ensemble de ces voies permet de convertir le signal électrique en modifications fonctionnelles de la synapse dans le but de renforcer les connexions synaptiques et augmenter la sensibilité de la synapse (Citri & Malenka, 2008; Laroche, 2010; Luscher & Malenka, 2012).

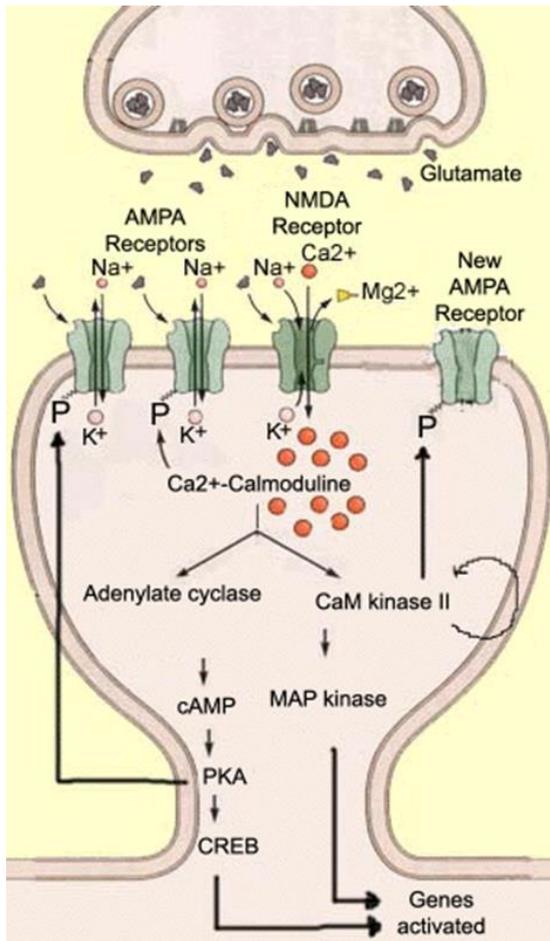


Figure 2.7. Mécanisme de la potentialisation à long-terme (www.thebrain.mcgill.ca).

Après une forte libération de glutamate dans la fente synaptique, l'activation des R-AMPA laisse entrer des ions Na^+ dans la cellule et provoque une forte dépolarisation dans le neurone postsynaptique. La forte dépolarisation entraîne la libération dans le milieu extracellulaire des ions Mg^{2+} qui bloquent les R-NMDA. Les R-NMDA sont alors activés et laissent entrer le Ca^{2+} dans la synapse. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire active des protéines kinases CaMKII qui phosphorylent les R-AMPA, et qui activent d'autres voies de signalisation faisant intervenir les protéines MAPK, PKA, cAMP, CREB dans le but d'activer la transcription et la traduction des gènes afin de synthétiser de nouvelles protéines dont des R-AMPA.

b) Orientation spatiale

Le rôle de l'hippocampe dans la navigation spatiale a émergé à la suite de la découverte des cellules dites de « lieu » (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Les cellules de lieu sont présentes dans toutes les régions de l'hippocampe allant du GD aux régions CA3-1 (Cobar et al., 2017). Les études réalisées sur les modèles murins ont montré que les cellules de lieu s'activent lorsque l'animal se retrouve dans un endroit précis de son environnement (Knierim, 2015; Cobar et al., 2017; Robinson et al., 2020). Ainsi les cellules de lieu forment une carte spatiale cognitive qui permet de s'orienter dans l'espace. Dans un environnement donné, seulement une partie des cellules de lieu sont actives. Lorsque l'animal change d'environnement, d'autres cellules s'activent : ce phénomène est appelé du « remapping » ou remappage (Muller & Kubie, 1987; Cobar et al., 2017).

Le rythme d'activité prédominant dans l'hippocampe est le rythme thêta. Ce rythme thêta est notamment retrouvé chez l'animal en mouvement ou pendant certaines phases du sommeil (O'Keefe & Recce, 1993; Buzsáki, 2002). Il a notamment été montré que les cellules de lieu reprennent la séquence d'activité qui a été expérimentée durant l'éveil. Ce processus de rappel est impliqué dans la consolidation mnésique (Pavlides & Winson, 1989; Knierim, 2015).

Bien que de nombreux débats aient eu lieu afin de déterminer si la fonction principale de l'hippocampe est le codage spatial ou la mémoire épisodique, les chercheurs semblent s'accorder à attribuer à l'hippocampe une fonction combinée de ces deux processus cognitifs (Smith & Mizumori, 2006; Knierim, 2015; Eichenbaum, 2017).

c) Neurogenèse adulte

La neurogenèse est le processus par lequel de nouveaux neurones sont formés et intégrés au réseau neuronal. Récemment, des sites de neurogenèse dans le cerveau mature ont été identifiés, comprenant la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire du GD de l'hippocampe chez les rongeurs et chez l'Homme (Cameron and Glover, 2015; Fares et al., 2019; Kuhn et al., 2018; Llorens-Martín et al., 2015).

Les cellules souches adultes sont localisées entre la couche de cellules granulaires et la couche polymorphique, dans une zone appelée la zone sous-granulaire (SGZ) (figure 2.8.A). Dans cet environnement, également appelé « niche » les cellules souches neuronales (CSN) sont contrôlées par les composants de la niche, tels que les astrocytes (Song et al., 2002; Duan et al., 2008). On retrouve 2 types de progéniteurs neuronaux dans la SGZ. Les cellules de type 1 sont des cellules radiales qui se ramifient dans la couche moléculaire. Les cellules de type 1, bien que différentes des astrocytes, expriment la protéine d'acides fibrillaires gliales (GFAP), qui est le marqueur des cellules astrocytaires. Les cellules de type 2 sont très peu ramifiées et reste localisées dans la SGZ. Les cellules de type 2 n'expriment pas la GFAP mais la protéine Sox-

2 (Fukuda et al., 2003). Les cellules de type 2 dériveraient des cellules de type 1 et se différencient en neuroblastes. Ces neuroblastes deviennent ensuite des neurones matures qui s'intègrent au réseau du GD (Duan et al., 2008; Eisch et al., 2008; C. Zhao et al., 2008) (figure 2.8.B-C). Les neurones néoformés envoient des projections sur les cellules composant les interneurones de la couche polymorphique, les cellules moussues et les cellules pyramidales des régions CA3 et CA2 (Toni et al., 2008; Llorens-Martín et al., 2015).

En condition physiologique, la neurogenèse est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage. En effet, des études ont montré une activation de la neurogenèse après une tâche d'apprentissage spatiale (Clelland et al., 2009; Lieberwirth et al., 2016; Tfilin & Turgeman, 2019; R. Q. Yu et al., 2019). Néanmoins, la neurogenèse est également modulée dans certaines maladies neurologiques telles que la schizophrénie, la dépression ou l'épilepsie du lobe temporal (ELT) (Eisch et al., 2008). Dans les ELT, des débats existent toujours afin de savoir si la neurogenèse a un rôle neuroprotecteur, en permettant la formation de nouveaux neurones après une mort neuronale (Jakubs et al., 2006), ou si à l'inverse, la neurogenèse favorise les crises d'épilepsie et favorisent la formation de connexions aberrantes qui entraîneraient le déclenchement de nouvelles crises (Cho et al., 2015; Althaus et al., 2019).

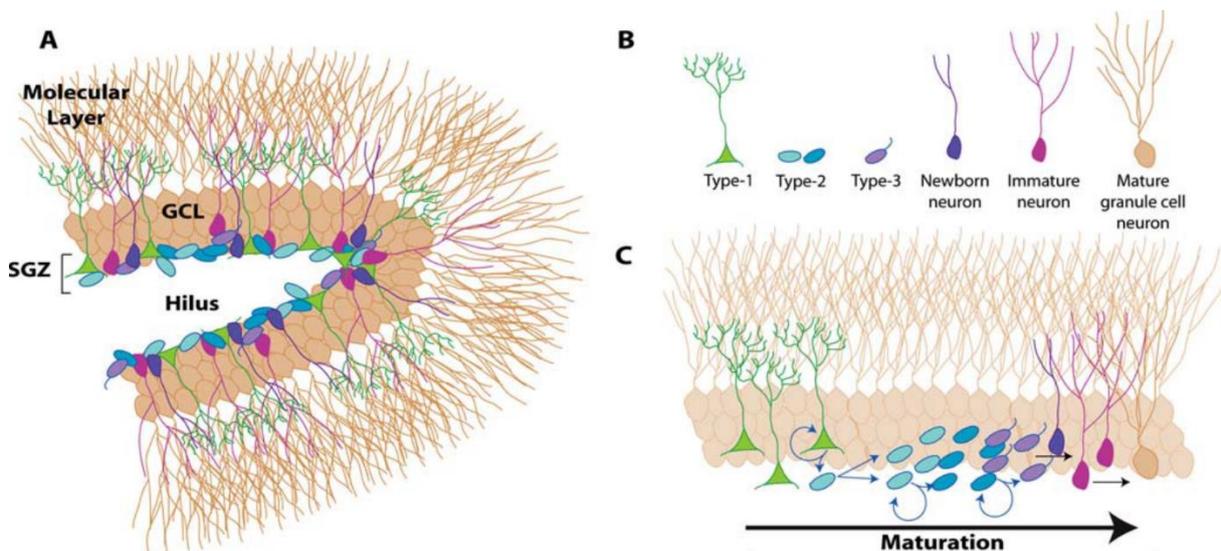


Figure 2.8. La neurogenèse adulte dans le gyrus denté (adapté de Eisch et al., 2008). La neurogenèse adulte dans l'hippocampe se produit dans le GD. La niche neurogénique qui contient les CSN à différents stades de maturation se situe en dessous de la couche granulaire dans la zone sous-granulaire (A, B). Au cours de la maturation, les cellules de type 1 se différencient en cellules de type 2 qui prolifèrent et se différencient en cellules de type 3 puis en neurones néoformés. Les neurones néoformés se développent en neurones immatures avant de donner les neurones matures fonctionnels et intégrés au réseau neuronal du GD (C). (GCL= couche de cellules granulaires ; SGZ = zone sous-granulaire).

5) La synapse

a) Généralités

La synapse est la région par laquelle l'information passe du neurone présynaptique au neurone post-synaptique. Il existe deux types de synapses : les synapses électriques et les synapses chimiques (figure 2.9).

Dans les synapses électriques, la fente synaptique est très étroite, elle mesure environ 2 à 3 nm. L'influx nerveux électrique se propage au niveau des jonctions communicantes ou « gap junctions » (Connors & Long, 2004; Curti & O'Brien, 2016). Ces jonctions communicantes sont composées d'amas de canaux formés par des protéines connexines, appelés canaux connexons, présents à la surface des membranes présynaptiques et postsynaptiques, et qui connectent les cytoplasmes des deux cellules (Harris & Littleton, 2015) (figure 2.9.A). L'influx nerveux qui passe d'une cellule à l'autre est direct et rapide. Les synapses électriques se trouvent dans le noyau olivaire inférieur de la moelle épinière ; dans le noyau thalamique réticulaire, une couche de neurones GABAergiques qui entourent et inhibent les noyaux du thalamus dorsal ; dans les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe pour les connexions inter-interneurones ; dans le néocortex pour les connexions entre interneurones, et probablement dans la rétine, le bulbe olfactif, le locus coeruleus (Connors & Long, 2004). Les synapses électriques étant moins étudiées que les synapses chimiques, d'autres structures du système nerveux central peuvent être composées de synapses électriques mais n'ont pas encore été identifiées. Les

synapses électriques ont pour fonction de synchroniser rapidement les neurones (Connors & Long, 2004; PosÅ, uszny, 2014; Connors, 2017; Montbrió & Pazó, 2020; Hoehne et al., 2020).

Dans les synapses chimiques, la communication se fait de manière indirecte en faisant intervenir des messagers chimiques. Les synapses présynaptiques et postsynaptiques sont séparées par une fente synaptique dans laquelle sont libérés les neurotransmetteurs depuis la membrane du neurone présynaptique. Les neurotransmetteurs libérés vont se fixer sur les récepteurs présents à la surface de la membrane du neurone postsynaptique et permettre une entrée d'ions et ainsi la transmission de l'influx nerveux. L'activation ou l'inhibition du neurone postsynaptique dépend de la nature du transmetteur libéré et des récepteurs activés (figure 2.9.B). Dans l'hippocampe, les principaux neurotransmetteurs sont le glutamate, qui est excitateur, et le GABA qui est inhibiteur.

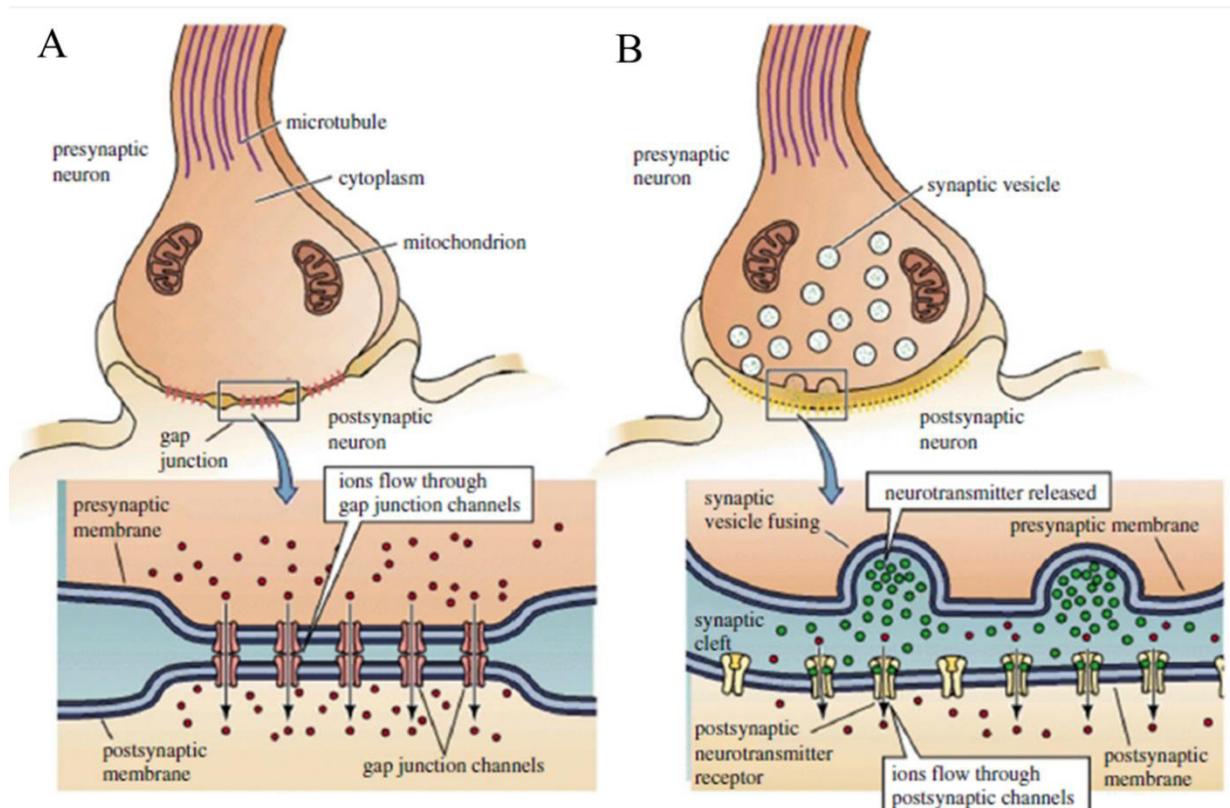


Figure 2.9 Les synapses électriques et chimiques (Towlson et al., 2018). Les synapses électriques sont liées par des jonctions communicantes composées d'amas de canaux connexons. Les ions passent du neurone présynaptique au neurone postsynaptique par ces canaux (A). Les synapses chimiques communiquent par l'intermédiaire de messagers

chimiques. Le neurone présynaptique libère le contenu de leurs vésicules synaptiques dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs se fixent sur leurs récepteurs présents à la surface de la membrane postsynaptique. L'activation des récepteurs entraîne l'entrée d'ions dans le neurone postsynaptique et permet le passage de l'influx nerveux (B).

b) La transmission synaptique glutamatergique

i. *Libération des vésicules présynaptiques*

L'arrivée d'un potentiel d'action dans les extrémités terminales du neurone entraîne une forte dépolarisation et conduit à une entrée massive de Ca^{2+} par l'activation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Ca_v) (Mochida, 2018). L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induit la fusion des vésicules présynaptiques chargées en glutamate avec la membrane présynaptique. Cette fusion permet de libérer les neurotransmetteurs dans la fente synaptique (figure 2.9.B). L'exocytose des vésicules synaptiques nécessite plusieurs étapes et fait intervenir un grand nombre de protéines qui agissent en coopération les unes avec les autres.

L'assemblage de la zone active :

La première étape de la libération vésiculaire présynaptique est l'ancrage des vésicules dans des régions spécialisées de la membrane plasmique, appelées « zones actives (ZA) » (figure 2.10.A) (Südhof, 2012). Cet ancrage permet de préparer les vésicules à fusionner rapidement avec la membrane plasmique lors de la prochaine augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Les mécanismes menant à la formation de cette ZA restent encore peu compris. Certaines protéines ont été soupçonnées d'agir dans cette assemblage, telles que les protéines RIM, qui forment des clusters dans les ZA et recrutent des canaux Ca_v (Kaeser et al., 2011). Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de comprendre l'ensemble de ces mécanismes (Emperador-Melero & Kaeser, 2020).

La fusion des vésicules synaptiques

La deuxième étape est la fusion entre la membrane des vésicules et la membrane plasmique du neurone. Les protéines « SNARE » pour « récepteurs des protéines Soluble N-éthylmaleimide-sensitif-facteur (SNAPs) » jouent un rôle essentiel dans ces mécanismes de fusion vésiculaire (Brunger et al., 2019; Südhof, 2013). Les protéines SNARE peuvent s'assembler entre elles pour former un complexe qui agira sur la fusion des membranes. L'assemblage des protéines SNARE se fait notamment par l'action des protéines Munc18 ou Munc13 (Ma et al., 2011; Y. Lai et al., 2017; S. Wang et al., 2019). La fusion des vésicules présynaptiques nécessite 2 à 3 complexes SNARE (Mohrmann et al., 2010; Sinha et al., 2011). En plus des protéines SNARE, la synaptotagmine et la complexine sont des protéines essentielles dans les mécanismes de fusion membranaire. La synaptotagmine est une protéine transmembranaire capable de lier le Ca^{2+} intracellulaire et qui agit à la suite des protéines complexines (Südhof, 2013). Les protéines complexines amorcent les complexes SNARE dans la ZA et empêchent la fusion membranaire (Jorquera et al., 2012; Maximov et al., 2009; Südhof, 2013). La synaptotagmine en se liant à la complexine libère les vésicules de cette dernière. La synaptotagmine liée au calcium permet d'induire l'exocytose dépendante du calcium. L'action couplée de la synaptotagmine et de la complexine permettrait de coupler la libération vésiculaire à l'entrée de calcium (Brunger et al., 2019; Südhof, 2013) (figure 2.10.B).

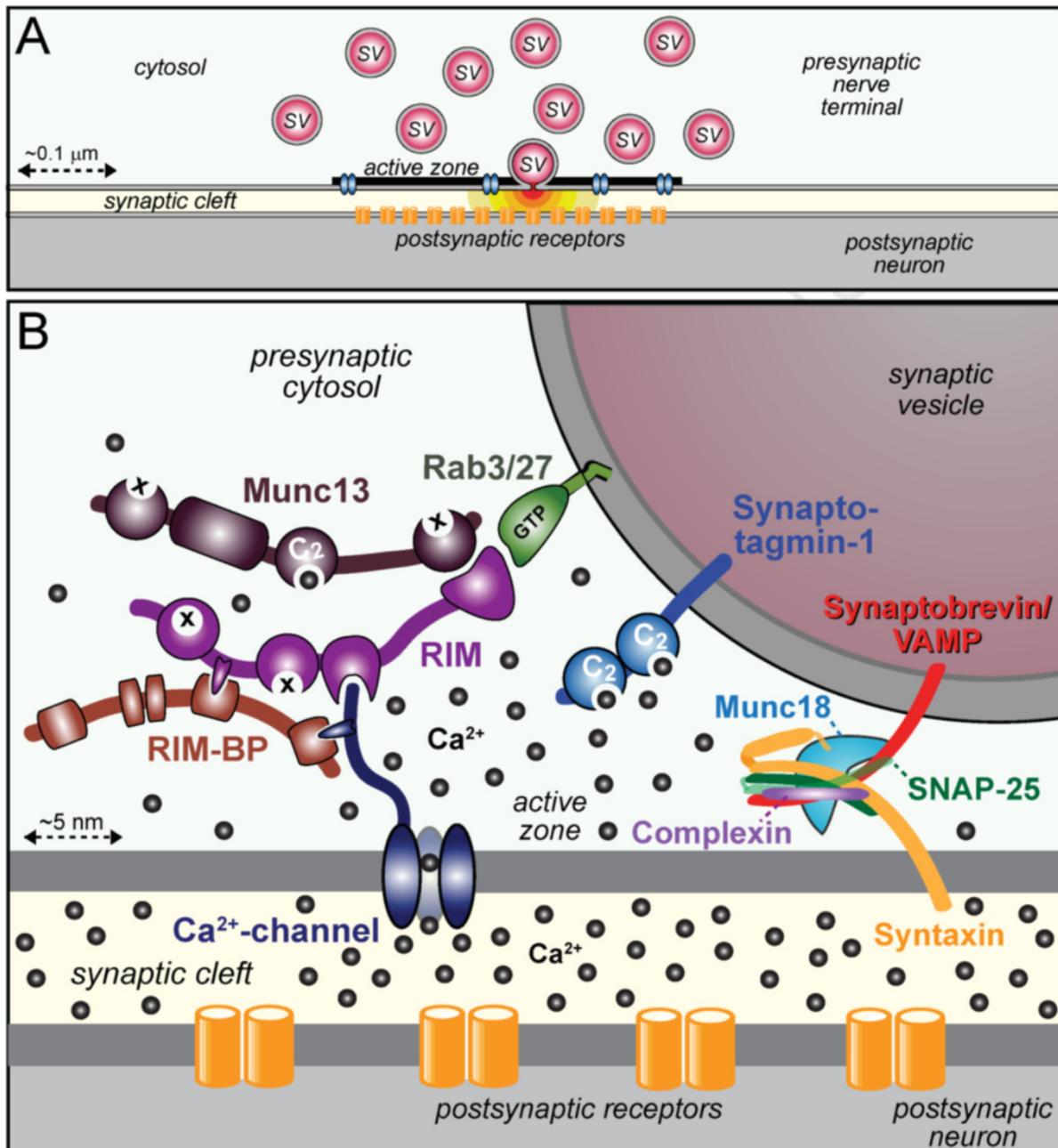


Figure 2.10. La libération des vésicules présynaptiques (Südhof, 2013). Les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane plasmique des neurones présynaptiques dans la ZA, dans le but de libérer les neurotransmetteurs dans la fente synaptique (A). L'ancrage des vésicules à la membrane de la ZA se fait par le complexe de protéines SNARE, incluant la syntaxine, SNAP-25 et la synaptobrevine/VAMP. Les protéines SNARE sont maintenues les unes avec les autres par la protéine Munc18. La complexine bloque la vésicule synaptique à la membrane plasmique. La synaptotagmine exprimée à la membrane des vésicules synaptiques permet de lier le Ca²⁺ et de libérer la vésicule de la complexine. Les protéines RIM permettent de former un complexe en liant les protéines des vésicules et des canaux Ca_v. L'ensemble de ce complexe permet la fusion rapide des membranes lors d'une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire.

ii. *Le complexe postsynaptique*

Après libération du contenu de la vésicule synaptique, les neurotransmetteurs de glutamate se retrouvent dans la fente synaptique et vont se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface de la membrane postsynaptique. Il existe deux familles de récepteurs activées par le glutamate : les récepteurs métabotropiques qui sont couplés à des protéines G, et les récepteurs ionotropiques (Scheefhals & MacGillavry, 2018). Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs membranaires qui sont activés par la liaison d'un ligand extracellulaire, tel que le glutamate, et activent une cascade d'évènements intracellulaires mettant en jeu la protéine G (Niswender & Conn, 2010). Les récepteurs ionotropiques comprennent les R-AMPA, perméables au sodium Na^+ , les R-NMDA perméable au calcium Ca^{2+} , et les récepteurs kaïnates. L'activation des R-AMPA, qui conduit à un influx Na^+ dépolarisant le neurone, sont responsables de la transmission synaptique basale. Comme précédemment développé dans la partie 3.b de ce chapitre, les récepteurs NMDA sont bloqués par un ion Mg^{2+} et ne peuvent s'activer que lorsqu'il y a une dépolarisation supérieure à -40 mV. L'entrée de Ca^{2+} qui en résulte induit une cascade de réaction à l'origine de la plasticité à long-terme. L'activation des R-NMDA conduit à la phosphorylation de plus de 100 protéines incluses dans la densité post-synaptique (PSD) (Sheng & Kim, 2011). Les récepteurs kaïnates sont beaucoup moins étudiés que les R-AMPA et R-NMDA et leur fonction reste encore inconnue. Néanmoins, les récepteurs kaïnates agiraient au niveau de la membrane présynaptique et joueraient un rôle dans la recapture du glutamate (Bloss & Hunter, 2010; Gielen, 2010).

Les synapses excitatrices forment une petite protrusion sur la dendrite appelée épine dendritique, qui présente une composition moléculaire et une organisation particulière appelée PSD. La taille des PSD varie de 200 à 800 nm de diamètre et de 30 à 60 nm d'épaisseur (Carlin et al., 1980; Sheng & Kim, 2011). La fonction des PSD est de former des clusters de récepteurs synaptiques afin d'aligner les complexes postsynaptiques à la ZA présynaptique. Les PSD

contiennent un très grand nombre de molécules de signalisation et de structures associées dont plus de 400 ont été identifiées. Des protéines d'échafaudages présentes sous la membrane des PSD permettent de maintenir l'ensemble de ces protéines en un complexe dense. Ce complexe contient des récepteurs membranaires, des protéines d'adhésion, des enzymes de signalisation cytoplasmique et des éléments du cytosquelette (figure 2.11) (Feng & Zhang, 2009; Sheng & Kim, 2011). Les protéines les plus répandues dans les PSD sont les protéines du cytosquelette qui représentent 12% des protéines des PSD, les récepteurs représenteraient 6% tout comme les protéines d'échafaudages. Parmi toutes les protéines identifiées, la famille des protéines CaMKII sont les plus répandues, suivi de la famille des PSD-95. La forte densité protéique de la PSD permet de coupler l'activation des récepteurs postsynaptiques avec des événements de signalisation biochimiques dans le neurone postsynaptique (Sheng & Kim, 2011).

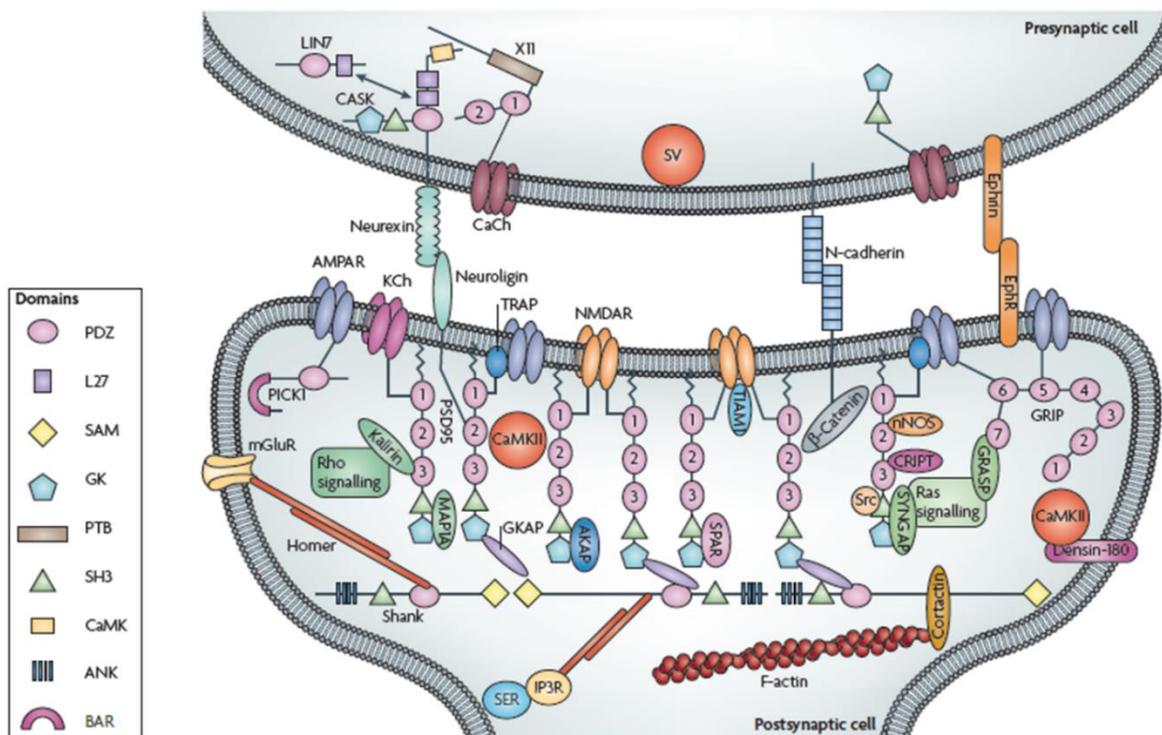


Figure 2.11. L'organisation du complexe post-synaptique (Feng & Zhang, 2009). Le complexe post-synaptique est un complexe dense composé de nombreuses protéines telles que des récepteurs, des protéines d'échafaudage, des protéines de signalisation ou des protéines de structure. Des protéines membranaires s'assemblent pour former des complexes trans-synaptiques, tels que les N-cadhérines et le complexe Neuroxine/Neuroligine. Les complexes trans-synaptiques facilitent la communication entre les compartiments présynaptiques et

postsynaptiques. L'interaction de toutes ces protéines entre elles, permet l'activation de différentes voies de signalisation permettant la transmission synaptique et la modulation de celle-ci en fonction de l'activité plus ou moins forte de la synapse.

c) Les récepteurs AMPA

i. *Composition :*

Les R-AMPA sont des récepteurs ionotropiques glutamatergiques qui sont perméables au Na^+ et sont impliqués dans la transmission synaptique basale. Il existe 4 sous-unités des R-AMPA nommés GluA1 à GluA4, qui peuvent s'assembler en tétramères selon différentes combinaisons pour former le récepteur ionique. Cet assemblage différentiel confère au récepteur différentes propriétés biophysiques (Diering & Huganir, 2018; Hollmann & Heinemann, 1994). Les sous-unités des R-AMPA contiennent des domaines de liaison hautement conservés leur permettant de lier le glutamate et permettant de se lier les unes aux autres afin de former les pores. Néanmoins, les queues cytoplasmiques des sous-unités ont différentes tailles. Alors que les sous-unité GluA1, GluA4 et une sous-catégorie de GluA2 (GluA2R) ont des longues queues cytoplasmiques, les sous-unités GluA2, GluA3 et une sous-catégorie de GluA4 (GluA4S) ont des queues cytoplasmiques courtes (Shepherd & Huganir, 2007). Dans l'hippocampe, les R-AMPA sont principalement composés des combinaisons GluA1/2 (Diering & Huganir, 2018; Wenthold et al., 1996). La sous-unité GluA4 est très peu présente dans le système nerveux mature car principalement exprimée dans le système nerveux immature (Zhu et al., 2000). L'absence de la sous-unité GluA2 dans les R-AMPA leur confère une perméabilité au Ca^{2+} que les autres R-AMPA ne possèdent pas. Les R-AMPA sans sous-unités GluA2 sont principalement exprimés au cours du développement leur attribuant un rôle essentiel dans le développement des synapses ainsi que dans certaines formes de plasticité synaptique (Isaac et al., 2007).

ii. Les protéines auxiliaires :

Les R-AMPA se lient à des protéines auxiliaires qui régulent le transport cellulaire et synaptique des récepteurs ainsi que leur propriété d'activation. L'une des protéines auxiliaires les plus abondantes dans l'hippocampe sont les « protéines transmembranaires régulatrices des R-AMPA (TARP) » (Diering & Huganir, 2018; Kamalova & Nakagawa, 2021; Schwenk et al., 2014) telle que la Stargazine (Turetsky, 2005). Environ 2 à 4 protéines TARPs interagissent avec un R-AMPA par leur domaine transmembranaire (Shaikh et al., 2016). Les protéines TARPs possèdent une queue cytoplasmique contenant un domaine PDZ qui lui permet de se lier à la protéine PSD95 ainsi que des sites de phosphorylation dans leur domaine C-terminal. A la surface des synapses, les protéines TARPs interagissent avec les lipides membranaires, ce qui réduit l'interaction avec les PSD95. La phosphorylation des protéines TARPs, par les protéines CaMKII et les protéines PKC et PKA, réduit l'interaction avec les lipides membranaires et favorise la liaison des protéines TARPs avec les PSD95 (figure 2.12) (Bats et al., 2007; Diering & Huganir, 2018; Kamalova & Nakagawa, 2021). Grâce à cette interaction avec les PSD95, les protéines TARPs stabilisent les R-AMPA à la surface des cellules et des synapses. Bien que largement étudiées pour leur rôle dans le transport des R-AMPA, les protéines TARPs agissent sur d'autres fonctions des R-AMPA. C'est notamment le cas de la Stargazine, une protéine TARPs qui module les propriétés fonctionnelles des R-AMPA en réduisant leur désensibilisation (Bissen et al., 2019; Turetsky, 2005).

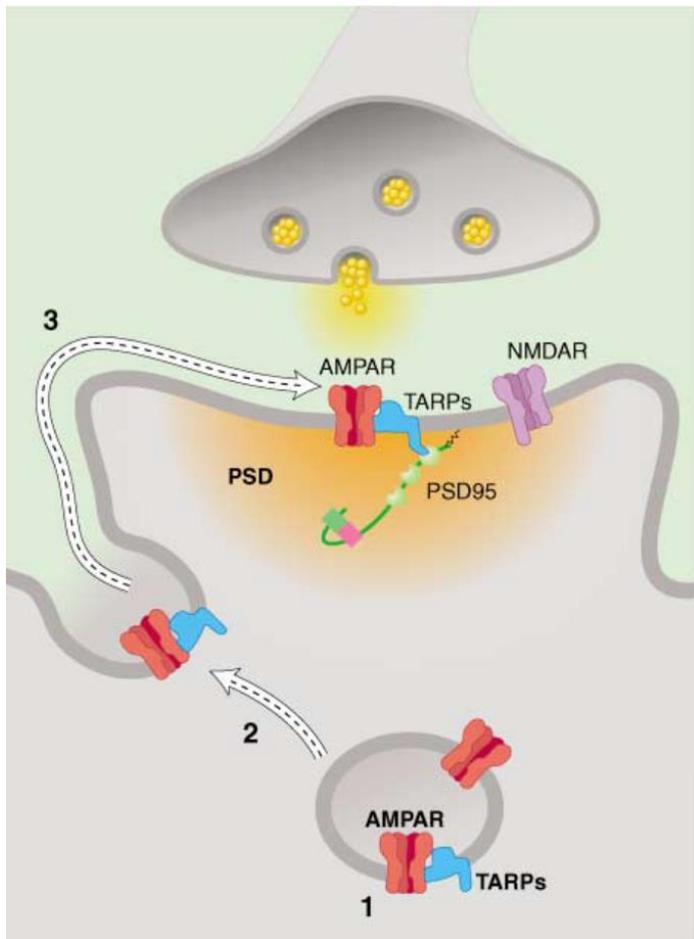


Figure 2.12. Les protéines auxiliaires TARPs des R-AMPA (Nicoll, 2006). Les protéines TARPs interagissent avec les R-AMPA dans les vésicules intracellulaires par leur domaine transmembranaire. Une fois le complexe libéré à la surface de la membrane plasmique, les protéines TARPs stabilisent les R-AMPA à la surface de la synapse en interagissant avec la PSD95 par leur domaine PDZ.

iii. Modifications post-traductionnelles :

Les domaines cytoplasmiques des R-AMPA subissent des modifications post-traductionnelles (MPT) dépendantes de l'activité de la synapse. Ces MPT sont essentielles au bon fonctionnement des R-AMPA allant de leur transport membranaire à des modifications d'expression. Différentes MPT ont été identifiées telles que la phosphorylation, la palmitoylation, l'ubiquitination, S-nitrosylation et potentiellement la O-glycosylation (Diering & Huganir, 2018). La plupart des MPT sont indispensables pour la plasticité synaptique incluant la LTP. Notamment, il a été montré que la phosphorylation de la sous-unité GluA1 sur les sites S845 par la PKA et S831 par la CaMKII ou la PKC facilite l'induction de la LTP et maintient les R-AMPA à la synapse (Roche et al., 1996; Barria, 1997; Lee et al., 2003; J. Q. Wang et al., 2005; Diering et al., 2016).

iv. Organisation à la membrane :

Les R-AMPA sont des structures dynamiques accédant à la surface de la membrane plasmique par exocytose et qui diffusent le long de cette membrane (Roth et al., 2017). Ces mécanismes de diffusion permettent aux R-AMPA d'entrer et sortir de la synapse en fonction de l'activité synaptique et sont essentielles pour la plasticité synaptique (Choquet & Hosy, 2020; Hiester et al., 2018; Nair et al., 2013; Penn et al., 2017). A la synapse, la quantité de R-AMPA exprimée résulte de l'activité synaptique. Une forte activité synaptique, par exemple lors de la LTP, augmentera l'expression des R-AMPA (Penn et al., 2017; Wu et al., 2017) alors qu'une réduction de l'efficacité synaptique notamment observée au cours de la dépression à long terme (LTD) diminuera l'expression de surface des R-AMPA (Awasthi et al., 2019; Kakegawa et al., 2018). Récemment, il a été montré que l'organisation précise des R-AMPA à la synapse était un facteur important dans l'efficacité synaptique. En effet, lors d'une libération vésiculaire unitaire, seulement 25% des R-AMPA seraient activés (Liu et al., 1999). Cela s'explique par la faible affinité des R-AMPA pour le glutamate mais aussi par la rapide diminution de la concentration en glutamate dans la fente synaptique. De ce fait, les R-AMPA sont organisés en clusters appelés « nanodomains » d'environ 100 nm à la surface de la synapse (figure 2.13) (Nair et al., 2013). Afin que la transmission synaptique soit efficace, ces nanodomains sont localisés à moins de 100 nm du site de libération des vésicules présynaptiques (Choquet & Hosy, 2020). De plus, les nanodomains post-synaptiques sont alignées avec les ZA de la membrane présynaptique en une structure appelée « nanocolonnes » (Tang et al., 2016; Choquet & Hosy, 2020). L'organisation de ces nanodomains trans-synaptiques et des nanocolonnes serait à l'origine de l'augmentation de l'efficacité synaptique plus que le nombre de R-AMPA exprimés (Choquet & Hosy, 2020). Les mécanismes qui sous-tendent ces alignements trans-synaptiques restent encore à être élucidé. Néanmoins, il semblerait que les complexes trans-synaptiques dus aux interactions entre les protéines

transmembranaires présynaptiques et postsynaptiques jouent un rôle prépondérant dans cette organisation synaptique (figure 2.13) (Fossati & Charrier, 2021; Fukata et al., 2021).

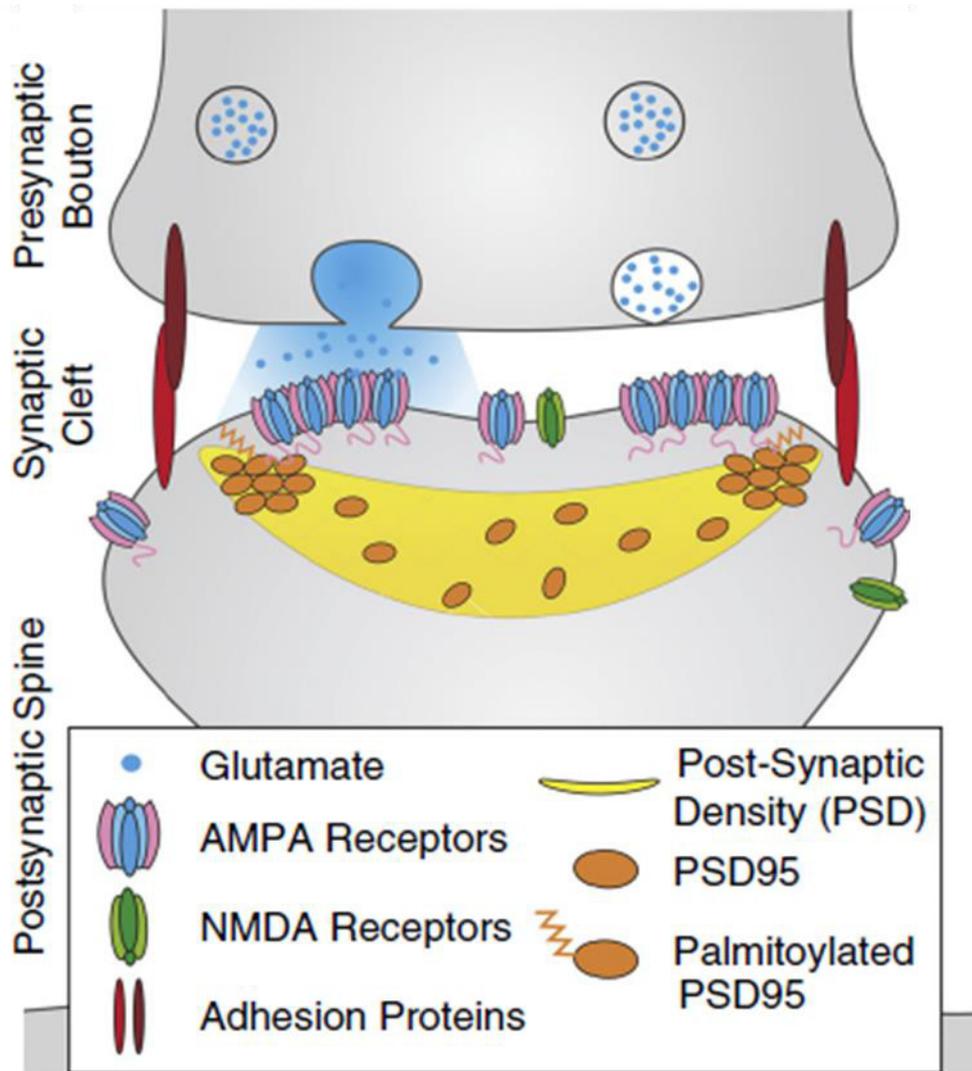


Figure 2.13 L'organisation synaptique des R-AMPA en nanodomaine (Hosy et al., 2014). Les R-AMPA localisés au niveau des PSD95 sont organisés en nanodomains alignés à la ZA de la membrane présynaptique. L'organisation en nanodomaine permet l'augmentation de l'efficacité synaptique. Lors de la libération d'une vésicule synaptique, le glutamate diffuse dans la fente synaptique et interagit avec les R-AMPA. L'interaction des protéines d'adhésion en complexe trans-synaptique régule cette organisation synaptique.

6) Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'hippocampe, une structure particulièrement touchée lors des neuropathologies causées par un dysfonctionnement de la protéine LGI1.

L'hippocampe est une structure finement organisée et divisée en différentes régions : GD, CA3, CA2 et CA1 elles-mêmes divisés en différentes couches. La connectivité et la composition cellulaire de ces différentes couches ont été étudiées afin de mieux comprendre le fonctionnement de l'hippocampe dans différentes fonctions cognitives et dans des conditions pathologiques.

L'hippocampe est considéré comme étant le siège de la mémoire épisodique et spatiale (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Moscovitch et al., 2016; Cobar et al., 2017; Aly & Ranganath, 2018; Sugar & Moser, 2019). Ces fonctions sont altérées dans des pathologies ciblant l'hippocampe tels que la maladie d'Alzheimer ou les ELT. Le contrôle de ces fonctions cognitives se fait par la communication directe et indirecte de l'hippocampe avec des structures limbiques et extra-limbiques. Nous avons vu la complexité des connexions de la formation hippocampique. Chaque région de l'hippocampe et du CE est interconnectée et de nombreuses projections unilatérales et bilatérales ont lieu. Ce haut degré de connectivité rend l'hippocampe sensible aux crises d'épilepsie qui sont causées par une excitabilité neuronale trop importante et incontrôlée. De nombreux facteurs sont nécessaires à la perturbation de cette équilibre neuronale induisant une hyperexcitabilité neuronale, tels que des facteurs génétiques ou des traumatismes crâniens. En effet, en condition physiologique, le réseau neuronal est finement contrôlé par le réseau inhibiteur qui exerce un rétrocontrôle négatif sur les neurones excitateurs du réseau environnant. Dans ce chapitre, nous avons vu que les interneurons sont présents dans toutes les régions de l'hippocampe. Leur grande arborisation permet de projeter sur un grand nombre de neurones environnants et de contrôler efficacement l'activité neuronale. Les interneurons reçoivent des afférences excitatrices qui les activent et envoient en retour des projections inhibitrices. Les connexions inter-interneurones permettent également un contrôle de l'inhibition. Bien que de nombreuses études aient déjà été menés afin de mieux comprendre le contrôle de cette balance neuronale, d'autres études sont nécessaires afin d'élucider les

mécanismes sous-jacents aux fonctions cognitives de l'hippocampe et les mécanismes par lesquels l'excitabilité neuronale est régulée ou dérégulée en condition pathologique.

Lors de crises d'épilepsie, la transmission synaptique excitatrice est fortement augmentée. Afin de comprendre les mécanismes induisant des crises d'épilepsie, de nombreuses études ont étudié le fonctionnement des synapses. Dans ce chapitre, nous avons vu que les synapses sont des structures très complexes, denses et composées de nombreuses protéines (Feng & Zhang, 2009; Sheng & Kim, 2011). Les synapses sont des structures très changeantes qui se modulent rapidement à court-terme ou à long-terme en fonction de l'activité synaptique (Penn et al., 2017; Wu et al., 2017; Kakegawa et al., 2018; Awasthi et al., 2019). En raison de cette complexité, de nombreux mécanismes sont encore incompris. Pendant longtemps, il était admis que les R-AMPA étaient des protéines fixes exprimées à la surface de la membrane postsynaptique dont l'expression plus ou moins importante reflétait l'efficacité synaptique. Or, récemment il a été montré que ces récepteurs ne sont pas fixes mais dynamiques. Ils sont transportés le long de la membrane plasmique et entrent et sortent en permanence de la synapse (Groc et al., 2004; Groc & Choquet, 2006; Nair et al., 2013; Compans et al., 2016; Roth et al., 2017; Choquet & Hosy, 2020). Au-delà de la mobilité de ces récepteurs, leur organisation en nanodomains à la membrane de la synapse semble un critère majeur de l'efficacité synaptique. Notamment les R-AMPA doivent être organisés en clusters précisément situés en face d'une ZA afin de permettre la transmission synaptique basale (Tang et al., 2016; Choquet & Hosy, 2020). Pendant longtemps, les outils disponibles ne permettaient pas d'étudier l'organisation synaptique à l'échelle nanoscopique. Récemment, grâce au développement de la microscopie super-résolution, il est possible d'observer des structures allant jusqu'à une résolution de 20 nm. Cependant, les mécanismes de régulation du transport, de l'expression et de l'activité des récepteurs synaptiques ne sont pas totalement élucidés. De prochaines études sont nécessaires

afin de mieux comprendre l'organisation des protéines synaptiques et leurs mécanismes de régulation.

Dans ce chapitre, nous avons étudié les mécanismes de la transmission synaptique basale dans le réseau hippocampique. Dans le prochain chapitre, nous allons voir la régulation de certains de ces mécanismes par la protéine LGI1, qui est fortement exprimée dans l'hippocampe, et les conséquences d'un dysfonctionnement de cette protéine ayant une action primordiale dans la régulation synaptique.

Chapitre III : La protéine Leucine-Rich Glioma Inactivated 1 (LGI1)

1) Histoire de la protéine LGI1

La protéine LGI1 est une protéine sécrétée de 60 KDa codée par le gène *LGII* situé sur le chromosome 10 en position 10q24 (Chernova et al., 1998). La région génétique dans laquelle le gène LGI1 a été identifiée est associée à une forme de tumeur cérébrale appelée glioblastome. Les glioblastomes correspondent à une tumeur provoquée par l'accumulation de cellules gliales. De ce fait, les chercheurs ont étudié la protéine LGI1 et son rôle potentiel dans la formation de glioblastome. L'absence d'expression de la protéine LGI1 dans les glioblastomes les ont poussés à supposer que la protéine LGI1 empêche la prolifération cellulaire (Chernova et al., 1998; Gabellini & Masola, 2009). Des études réalisées *in vitro* sur des cultures de lignées cellulaires, montrent un rôle de LGI1 dans la prolifération cellulaire (Gabellini & Masola, 2009; Kunapuli et al., 2003). Par la suite, des études s'intéressant à l'expression cellulaire de la protéine LGI1 dans le SNC, ont mis en évidence que LGI1 est exprimée uniquement par les neurones et non par les cellules gliales (Gu et al., 2005; Piepoli et al., 2006). Ainsi, l'absence d'expression de la protéine LGI1 dans les glioblastomes s'expliquent par le fait que ces tumeurs sont très majoritairement composées de cellules gliales n'exprimant pas LGI1. Ce résultat associé à des études cliniques ne montrant pas d'association entre une mutation dans le gène LGI1 et le développement de glioblastomes, ont permis de réfuter l'hypothèse que le dysfonctionnement de LGI1 agirait sur le développement des glioblastomes (Brodtkorb et al., 2003; Gu et al., 2005; Piepoli et al., 2006).

Au début des années 2000, des mutations de la protéine LGI1 ont été associées à une forme héréditaire d'épilepsie du lobe temporelle autosomique dominante (ADLTE) (Kalachikov et al., 2002). Il s'agit d'une forme rare d'épilepsie idiopathique caractérisée par des crises partielles associées à des troubles auditifs. Plusieurs mutations dans le gène LGI1 ont été identifiées chez différents patients souffrant d'ADLTE ; à l'heure actuelle environ 43 mutations ont été

identifiées (Yamagata and Fukai, 2020). Plusieurs études se sont alors intéressées à la fonction de LGI1 dans le SNC et ont plus particulièrement cherché à comprendre pourquoi une mutation génétique de la protéine LGI1 génère des crises d'épilepsie. Pour cela, des modèles de souris transgéniques portant les mutations génétiques identifiées chez certains patients, ont été générés dans le but de reproduire les ADLTE (Boillot et al., 2014; Fukata et al., 2010; Zhou et al., 2009). Ces modèles transgéniques ont permis de faire de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes d'action de la protéine LGI1 dans le SNC allant de l'altération dans l'expression de la protéine LGI1 à l'effet dramatique de son absence sur la mise en place du réseau neuronal. L'ensemble de ces études ont mis en évidence un rôle essentiel de LGI1 au cours du développement dans la maturation du réseau neuronal, ainsi que sur la régulation des canaux potassiques voltage-dépendants kv1.1 et l'expression des R-AMPA (Schulte et al., 2006; Zhou et al., 2009; Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015).

En 2010, l'action de LGI1 s'est étendue au-delà du développement du SNC, lorsque des auto-anticorps anti-LGI1 ont été identifiés dans le sérum et le LCR de patients atteints d'EL LGI1, décrit dans le chapitre 1 (M. Lai et al., 2010). En effet, cette pathologie touche des patients adultes qui souffrent également de crises d'épilepsie (M. Lai et al., 2010; Irani et al., 2011; van Sonderen et al., 2017). Les EL LGI1 ont donc permis de mettre en évidence un rôle primordial de LGI1 dans le SNC mature.

Le rôle de LGI1 dans le SNC a suscité un intérêt grandissant durant cette dernière décennie. Bien que certains mécanismes d'action de la protéine LGI1 aient été identifiés, de nombreuses questions restent encore à élucider. La principale interrogation reste notamment de comprendre comment LGI1 régule le réseau neuronal mature et comment une modification de sa fonction conduit à générer des crises d'épilepsie.

2) Les épilepsies du lobe temporel autosomique dominante

a) Généralités de l'épilepsie :

Les épilepsies sont des maladies du SNC qui sont caractérisées par l'apparition de crises d'épilepsie spontanées. L'apparition d'une crise est due à un déséquilibre de la transmission neuronale pendant lequel les neurones qui déchargent habituellement de manière asynchrone, se mettent à décharger fortement et de manière synchrone. Ce déséquilibre entraîne une hyperexcitabilité qui se traduit au niveau phénotypique par la crise d'épilepsie.

Les crises d'épilepsies peuvent être partielles ou généralisées. Les crises partielles ou focales ont une origine cérébrale localisée, qu'on appelle un foyer épileptique. Les caractéristiques des crises partielles sont diverses et dépendent de la localisation de leur foyer épileptique. On distingue les crises partielles simples sans perte de la conscience, des crises partielles complexes avec perte de la conscience. Les crises généralisées s'étendent sur la totalité du cerveau et sont de 3 types différents : les crises tonico-cloniques sont les plus connues, elles sont caractérisées par des convulsions et perte de conscience ; les absences sont caractérisées par une perte de conscience de plusieurs secondes sans convulsion ; les crises myocloniques sont caractérisées par des secousses musculaires brèves sans perte de conscience. Les crises partielles peuvent évoluer en crises généralisées. Les causes des épilepsies sont variées. On distingue notamment les crises idiopathiques ayant une origine génétique, les crises symptomatiques dont la cause est environnementale, tel qu'un accident ou un traumatisme, et les épilepsies inclassables dont la cause n'est pas identifiée (figure 3.1) (Pack, 2019). Des traitements antiépileptiques sont généralement donnés aux patients épileptiques, néanmoins environ 30% des patients sont pharmaco-résistants.

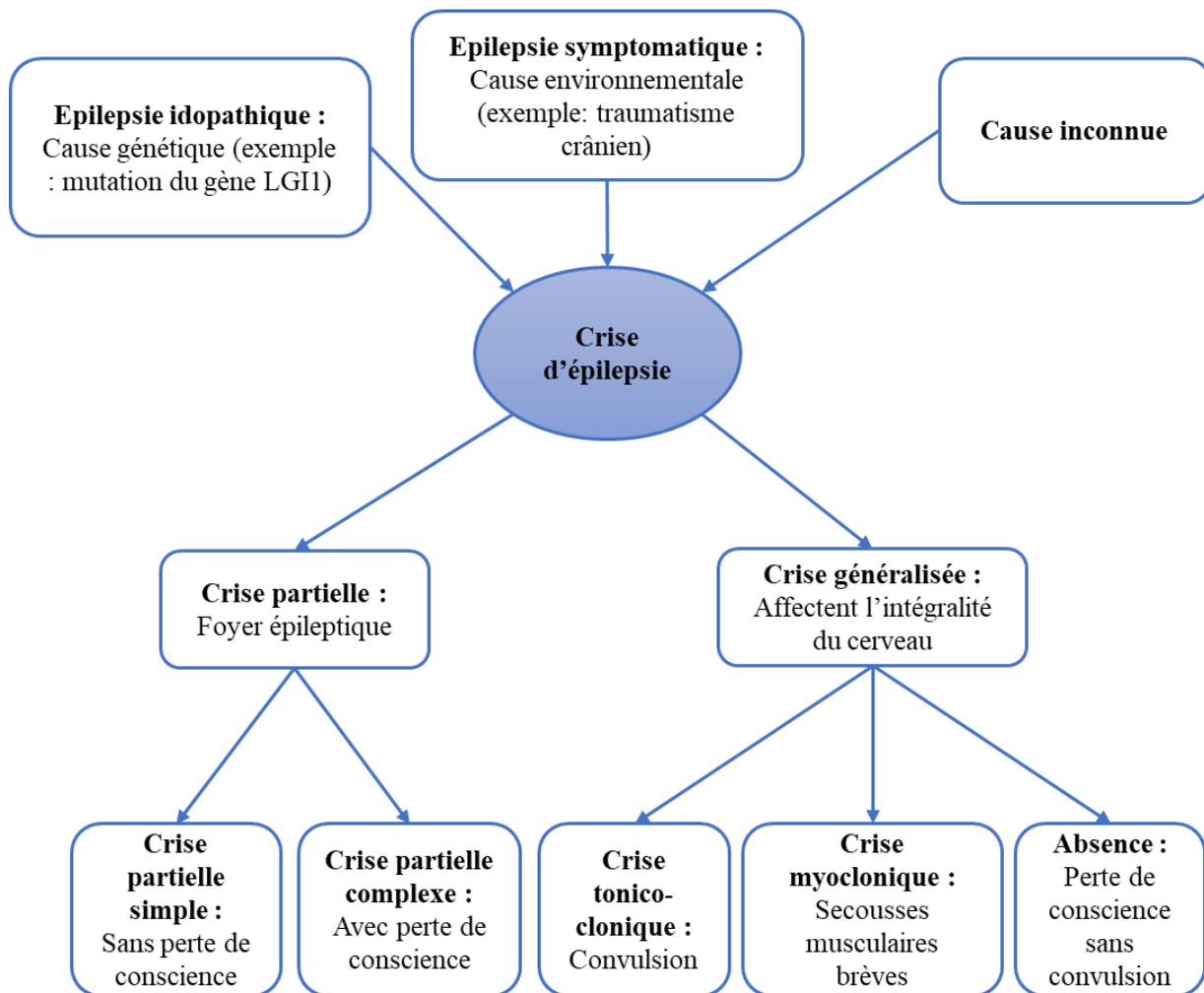


Figure 3.1. Caractérisation des différentes crises d'épilepsie. Les épilepsies peuvent être d'origine idiopathique, symptomatique ou inconnue. Les crises d'épilepsie peuvent être des crises partielles simples ou complexes ou des crises généralisées tonico-cloniques, myocloniques ou des absences.

b) Les épilepsies du lobe temporal :

Environ 60% des patients souffrent de crises d'épilepsie partielles et 1/3 de ces épilepsies partielles ont un foyer épileptique localisé dans le lobe temporal (Querol Pascual, 2007). La majorité des épilepsies du lobe temporal (ELT) sont caractérisées par des crises partielles complexes qui sont précédées par des auras épileptiques. Les auras épileptiques représentent l'ensemble des symptômes et signes qui surviennent au début d'une crise. Les auras épileptiques ont une durée de 5 à 30 secondes et restent en mémoire. Dans 70% des cas, l'aura est suivie d'une perte de conscience (Querol Pascual, 2007).

c) Les épilepsies du lobe temporal autosomiques dominantes :

En 2002, des mutations dans le gène *LGII* ont été associées à une forme héréditaire d'ELT transmise de façon autosomique dominante, alors appelée « épilepsie du lobe temporal autosomique dominante (ADLTE) » (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat, 2002). Environ 30% des patients atteints d'ADLTE ont une mutation dans le gène *LGII*. Cette forme rare d'ELT également appelée « épilepsie partielle autosomique dominante avec troubles auditifs (ADPEAF) » est caractérisée par des crises partielles qui évoluent généralement en crises généralisées tonico-cloniques avec des auras auditives survenant pendant la phase ictale, c'est-à-dire pendant la période de convulsion (Michelucci et al., 2003). Au sein d'une famille souffrant d'ADLTE, la pénétrance des mutations du gène *LGII* est de 50 à 85% (Rosanoff & Ottman, 2008). Les mutations sont diverses et peuvent toucher toutes les régions du gène *LGII* (Yamagata and Fukai, 2020). Alors que certaines mutations conduisent à un défaut de sécrétion de la protéine LGI1, d'autres mutations altèrent la liaison de la protéine avec ses partenaires (Yamagata and Fukai, 2020; Yokoi et al., 2015).

Les IRM et les EEG des patients atteints d'ADLTE ne montrent pas d'anomalie cérébrale (Michelucci et al., 2003; Ottman et al., 1995). Les traitements anti-épileptiques administrés aux patients tels que la carbamazépine et le phénobarbital, des anti-convulsants, ou la phénytoïne, un bloqueur des canaux sodiques, contrôlent efficacement les crises. L'arrêt des traitements entraîne généralement une rechute (Michelucci et al., 2003).

L'implication d'un dysfonctionnement génétique de la protéine LGI1 dans les ADLTE a permis d'identifier un rôle clé de cette protéine dans la régulation neuronale. Plusieurs études ont ainsi été menées afin de mieux comprendre la fonction de la protéine LGI1 dans le SNC et ont mis en lumière des fonctions essentielles dans la maturation du réseau neuronal (Zhou et al., 2009).

3) Structure et interactions de la protéine LGI1

a) La structure de la protéine LGI1

La protéine LGI1 est une protéine de 60 KDa qui est composée d'un domaine N-terminal appelé « leucine-rich repeat domain (LRR) » et d'un domaine C-terminal appelé « épitempine (EPTP) ». La protéine comporte également un signal peptide en N-terminal qui est clivé et sert à la sécrétion de la protéine (figure 3.2 A) (Leonardi et al., 2011; Yamagata and Fukai, 2020).

Le domaine LRR est un domaine retrouvé dans plus de 330 protéines et qui est enrichi en séquence leucine. Le domaine LRR de la protéine LGI1 est composé de 24 acides aminés et est impliqué dans l'interaction protéine-protéine (Ko & Kim, 2007). La protéine LGI1 est composée de 4 ou 5 domaines LRR entourés par les régions enrichies en cystéine N-cap et C-cap, respectivement situées aux domaines N-terminal et C-terminal (figure 3.2 B) (Leonardi et al., 2011; Kegel et al., 2013; Yamagata et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020). Dans la partie C-terminale du domaine LRR, réside un site de glycosylation sur le site Asn¹⁹² qui est trouvé dans toutes les protéines de la famille LGI (Kegel et al., 2013).

Le domaine EPTP ou « epitempin repeat (EAR) » de la protéine LGI1 comprend 7 domaines β -propeller chacun composé de 4 brins β -antiparallèles. Les domaines s'assemblent en formant des liaisons hydrophobes pour constituer un disque avec un pore central conique qui contient un ion Ca^{2+} afin de stabiliser la structure (figure 3.2 B) (Kegel et al., 2013; Yamagata et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020).

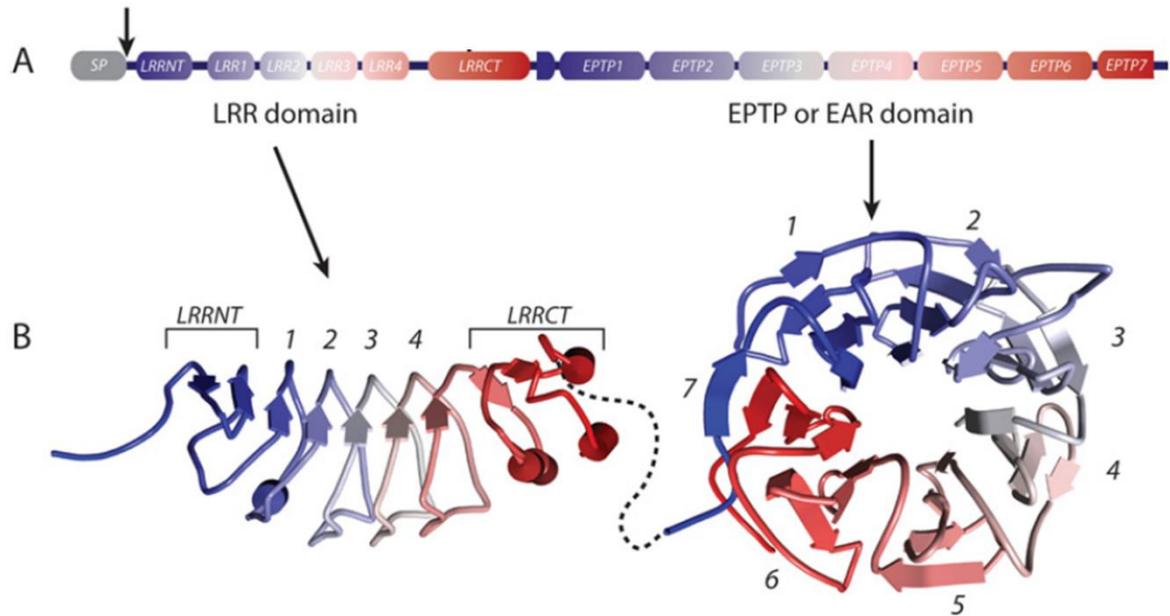


Figure 3.2. Structure de la protéine LGI1 (Kegel et al., 2013). La protéine LGI1 est composée d'un domaine LRR en N-terminal et d'un EPTP en C-terminal. La protéine contient également un signal peptide (SP) (A). Le domaine LRR est constitué de 4 domaines LRR (5 domaines d'après Yamagata et Fukai, 2020) entouré par les régions N-cap (LRRNT) et C-cap (LRRCT). Le domaine EPTP est constitué de 7 domaines β -propeller comportant 4 brins β -antiparallèles (B).

b) Les partenaires de la protéine LGI1

Dans le SNC, la protéine LGI1 peut interagir avec deux partenaires appartenant à la famille des « A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) » : ADAM11, ADAM22 et ADAM23 (Sagane et al., 2008; Fukata et al., 2010; Ohkawa et al., 2013; Yamagata et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020). Les protéines ADAM11, ADAM22 et ADAM23, sont des protéines transmembranaires exprimées dans le SNC et le système nerveux périphérique (SNP). Contrairement aux protéines de la famille ADAM, ADAM11, ADAM22 et ADAM23 n'ont pas de domaine métalloprotéase ce qui les rend catalytiquement inactives. Les protéines ADAM11, 22 et 23 sont impliquées dans les interactions cellulaires (Benarroch, 2012; Hsia et al., 2019). Bien que l'interaction de LGI1 avec ADAM11 ait été mise en évidence *in vitro*, aucune étude ne s'est penchée sur cette possible interaction *in vivo*. L'ensemble des études s'accordent à parler uniquement des protéines ADAM22 et ADAM23 en tant que partenaire de la protéine LGI1.

La protéine LGI1 s'homodimérise grâce à l'interaction du résidu E123 de son domaine LRR avec le résidu R474 du domaine EPTP d'une autre protéine LGI1. En plus de son rôle dans l'homodimérisation de la protéine, le domaine EPTP permet l'interaction de LGI1 avec ses partenaires (figure 3.3). C'est notamment par l'interaction avec ces partenaires, que la protéine LGI1 module diverses fonctions du SNC, notamment la transmission synaptique glutamatergique (Zhou et al., 2009; Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015).

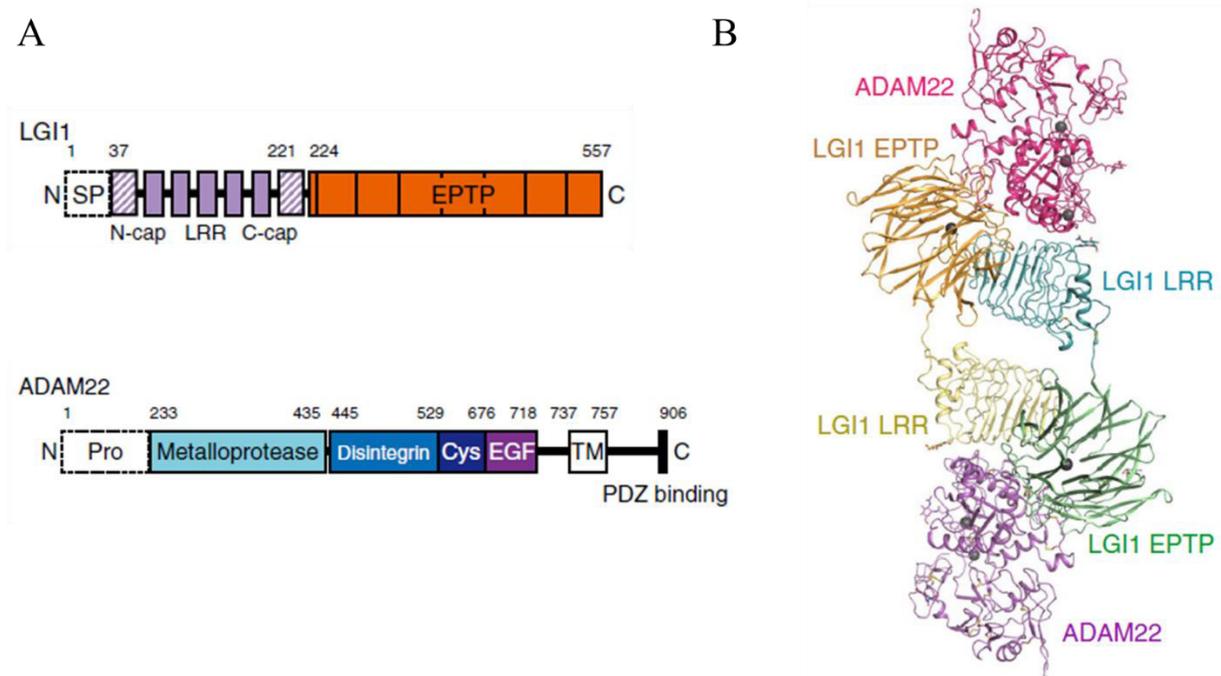


Figure 3.3 Le complexe LGI1-ADAM22 (Yamagata et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020). La protéine LGI1 est formée d'un domaine LRR N-terminal entouré de deux régions enrichies en cystéine N-cap et C-cap ; et d'un domaine EPTP. La séquence signal peptide (SP) est clivée pour que la protéine soit sécrétée. La protéine ADAM22 immature est formée par une proséquence (Pro) clivée dans la forme mature. La forme mature de ADAM22 est composée d'un domaine extracellulaire constitué des domaines métalloprotéase inactifs, désintégrine, d'un domaine enrichi en cystéine, et un domaine « epidermal-growth facteur-like (EGF) ». La protéine ADAM22 possède une région transmembranaire (TM) et un domaine de liaison aux domaines PDZ (A). La protéine LGI1 s'homodimérise par l'interaction des domaines LRR et EPTP. Le domaine EPTP interagit avec la protéine ADAM22, qui est un partenaire de LGI1 (B).

4) L'expression de la protéine LGI1

a) L'expression de la protéine LGI1 au cours du développement

La protéine LGI1 est une protéine exprimée très majoritairement dans le SNC. De très faibles taux semblent être identifiés dans les muscles squelettiques et les nerfs périphériques ainsi que quelques tissus tels que le foie, le pancréas et le thymus (Chernova et al., 1998). Au cours du développement, les ARN messenger (ARNm) de la protéine LGI1 sont transcrits dans l'éminence ganglionnaire caudale (EGC) (Kusuzawa et al., 2012). L'EGC donne notamment les interneurons GABAergiques, et de nombreuses cellules de l'hippocampe tels que les interneurons épineux, les cellules moussues, et quelques neurones granulaires et pyramidaux (Brazel et al., 2003). Dans le cerveau, seuls les neurones expriment la protéine LGI1, aucune cellule gliale n'exprime cette protéine (Piepoli et al., 2006). La protéine LGI1 est progressivement exprimée dans le cerveau de souris à partir de 14 jours postnatal (P14) pour être pleinement exprimée à P21 (Zhou et al., 2009). Dans le cerveau mature, les ARNm sont principalement identifiés dans les régions du GD, CA3, CA2 et CA1 de l'hippocampe. De plus de faible taux d'ARNm sont retrouvés dans le néocortex (figure 3.4 A) (Senechal et al., 2005; Herranz-Pérez et al., 2010). Les neurones sécrètent la protéine LGI1 dans le milieu extracellulaire (Sirerol-Piquer et al., 2006). Dans le cerveau adulte, la protéine LGI1 est largement exprimée dans de nombreuses structures du cerveau avec une forte expression dans l'hippocampe (figure 3.4 B) (Herranz-Pérez et al., 2010; Fukata et al., 2010).

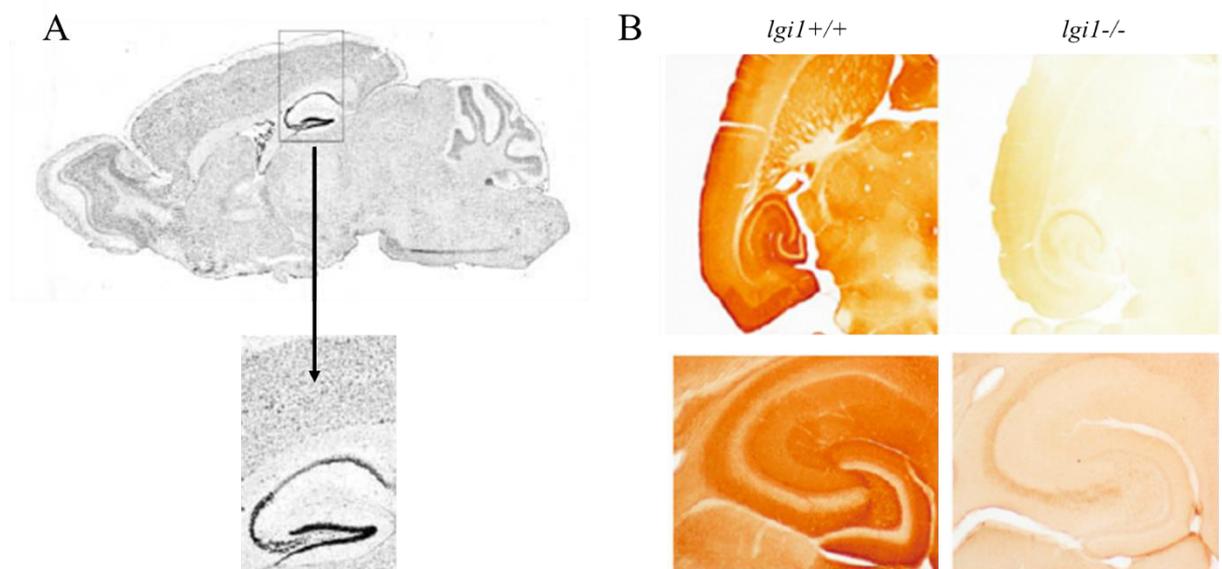


Figure 3.4 L'expression de LGI1 dans le cerveau de souris. Hybridation *in situ* de l'ARNm de LGI1 sur coupe sagittale de cerveau de souris adulte (P55-60) (Senechal et al., 2005). L'ARNm de la protéine LGI1 est majoritairement transcrit dans l'hippocampe et légèrement dans le cortex (A). Expression de la protéine LGI1 sur des coupes transversales de cerveaux de souris adultes (P18) *lgil* +/+ (gauche) et *lgil* -/- (droite) (Fukata et al., 2010). La protéine LGI1 est largement exprimée dans le cerveau avec une forte expression dans l'hippocampe (B).

b) Le complexe trans-synaptique LGI1-ADAM22/23

Récemment, les domaines d'interaction de la protéine LGI1 ont été clairement identifiés et ont permis de mieux comprendre le complexe que forme la protéine LGI1 avec ses partenaires (Yamagata et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020). La protéine LGI1 forme un complexe trans-synaptique avec ses partenaires ADAM22 en postsynaptique et ADAM23 ou ADAM22 en présynaptique (figure 3.5). Dans le compartiment postsynaptique, la protéine ADAM22 transmembranaire interagit avec le domaine PDZ de la PSD95 qui est la protéine d'échafaudage des synapses excitatrices (Fukata, 2006). La protéine Stargazine régulatrice des R-AMPA, est immunoprécipitée avec les protéines LGI1, ADAM22 et PSD95 (Fukata, 2006). La Stargazine appartient donc également au complexe LGI1-ADAM22-PSD95. De par l'interaction de LGI1 avec l'ensemble du complexe postsynaptique, la protéine LGI1 régule l'expression des R-AMPA (Fukata, 2006; Fukata et al., 2010; Ohkawa et al., 2013). Le complexe formé dans le compartiment présynaptique est moins clair. Il est communément admis que la protéine LGI1

forme un complexe présynaptique avec son partenaire ADAM23 et agirait sur la régulation des canaux potassiques kv1.1 (Fukata et al., 2010; van Sonderen et al., 2017; Petit-Pedrol et al., 2018). Bien que la présence de la protéine ADAM22 dans le compartiment postsynaptique soit une certitude (Fukata, 2006), l'interaction présynaptique de LGI1 et ADAM23 n'a jamais été mise en évidence *in vivo*. La protéine ADAM22 pourrait également être le partenaire présynaptique de LGI1. Néanmoins, il a été démontré que LGI1 forme un large complexe trans-synaptique comprenant de nombreuses protéines présynaptiques et postsynaptiques (Fukata et al., 2021). Le complexe trans-synaptique LGI1-ADAMs est essentiel dans l'organisation synaptique et la nanoarchitecture de la synapse. Cette organisation synaptique précise est primordiale dans la transmission synaptique.

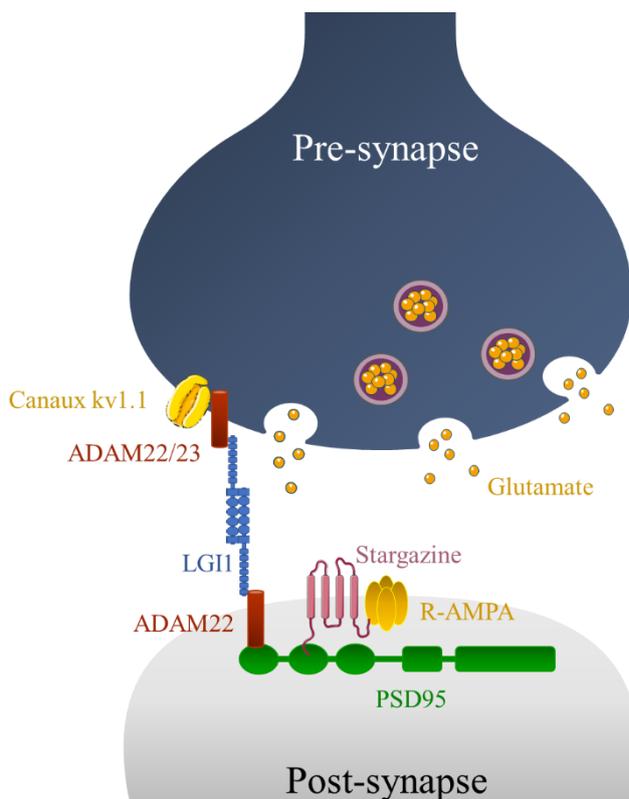


Figure 3.5. Le complexe trans-synaptique de LGI1-ADAM22/23. La protéine LGI1 s'homodimérise dans la fente synaptique et interagit avec son partenaire postsynaptique ADAM22. ADAM22 en postsynaptique forme un complexe avec la PSD95 et la stargazine. Ce complexe postsynaptique permet à LGI1 de réguler l'expression des R-AMPA. En presynaptique, LGI1 se lie à la protéine ADAM22 ou 23 et régulerait les canaux potassiques kv1.1.

c) L'expression de LGI1 au niveau du segment initial des axones

Récemment des études se sont penchées sur le rôle de LGI1 au niveau du segment initial des axones (AIS) (Seagar et al., 2017; Hivert et al., 2018). Dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat, les protéines ADAM22 et ADAM23 sont enrichies au niveau du AIS (Hivert et al., 2018). Dans ces cultures, les protéines ADAM22 et LGI1 sont colocalisées au niveau du AIS avec les canaux potassiques kv1 (figure 3.6). Chez des souris *lgi*^{-/-}, l'absence de la protéine LGI1 entraîne une forte réduction de l'expression des canaux kv1.1 au AIS des neurones de la région CA3 de l'hippocampe (Seagar et al., 2017). Ainsi le complexe LGI1-ADAM22 pourrait également agir au niveau du AIS sur la régulation des canaux kv1.1 et sur l'excitabilité neuronale. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre ces mécanismes d'action.

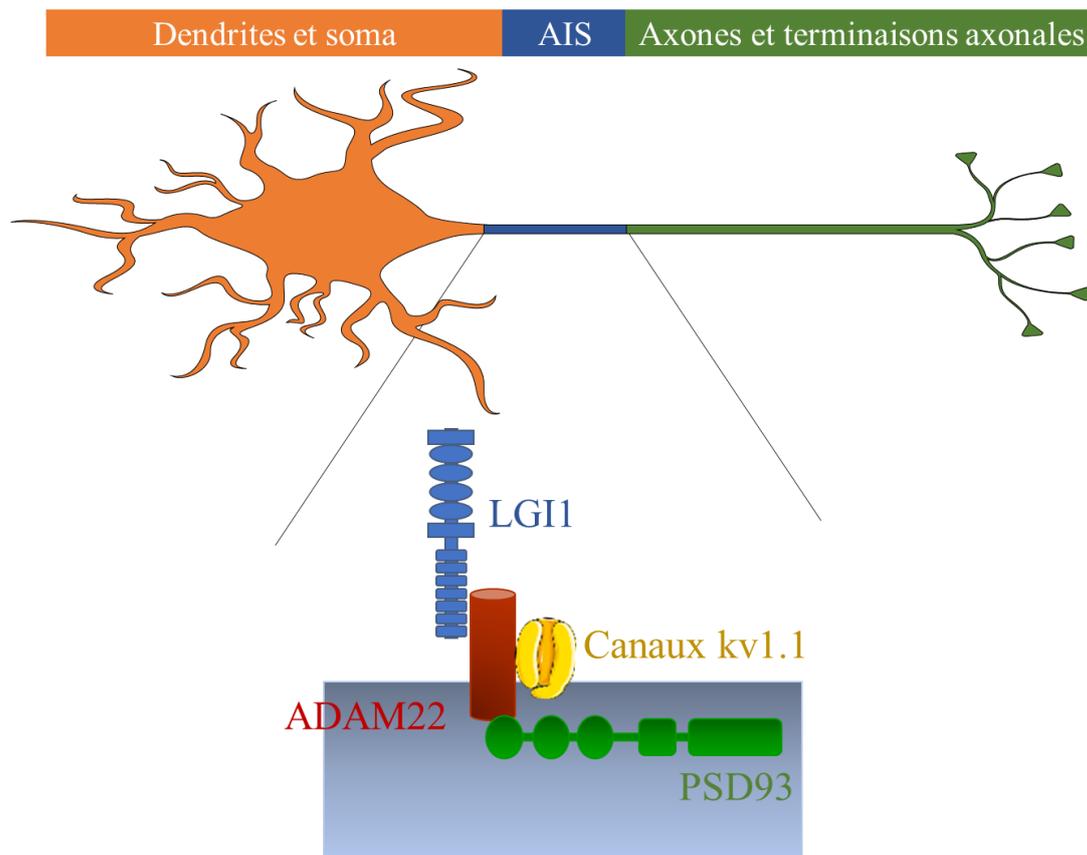


Figure 3.6. Le complexe LGI-ADAM22 au AIS. La protéine ADAM22 est enrichie au AIS avec son partenaire, la protéine LGI1, et les canaux potassiques voltage-dépendant kv1.1 avec lesquels elle interagit directement ou indirectement.

5) Les fonctions de la protéine LGI1 dans le SNC

a) Les modèles d'étude

Afin de mieux comprendre la fonction de la protéine LGI1 dans le SNC, différents modèles d'étude murins ont été générés dans le but de reproduire les pathologies associées à un dysfonctionnement de la protéine LGI1.

i. *Les modèles transgéniques :*

Les premiers modèles à avoir été développés sont les modèles transgéniques. Des souris hétérozygotes *lgi1*^{+/-} ont été générées afin de reproduire génétiquement les ADLTE décrites chez les patients (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010). En revanche, chez ces animaux, aucun symptôme ou trouble n'a été identifié par rapport aux souris WT et aucun phénotype épileptique n'a été observé. Néanmoins, les souris *lgi1*^{+/-} sont plus sensibles à l'induction de l'épilepsie par l'injection de pentylènetétrazole (PTZ), un antagoniste des récepteurs GABA_A, ou par une stimulation auditive par rapport aux souris sauvages wild-type (WT) (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010). L'absence de crises d'épilepsie spontanées chez le modèle hétérozygote a poussé les chercheurs à générer un modèle de souris *lgi1*^{-/-}. Ce modèle de souris knock-out (KO) a fait partie des modèles les plus étudiés et a beaucoup contribué à la compréhension des fonctions de la protéine LGI1 (Fukata et al., 2010; Yu et al., 2010). Chez les souris *lgi1*^{-/-}, aucun défaut anatomique n'a été observé à la naissance, mais de sévères crises d'épilepsie généralisées apparaissent brusquement à P14, et seraient initiées dans l'hippocampe (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010). Au cours de ces crises très récurrentes qui surviennent toutes les heures, les animaux se mettent soudainement à courir et sauter dans leur cage avant de déclencher des crises tonico-cloniques (figure 3.7.A). Les crises tonico-cloniques sont caractérisées par des contractions musculaires induisant une raideur intense et généralisée pendant la phase tonique, suivies de secousses musculaires brusques et généralisées pendant la phase clonique. En raison de la sévérité des crises, une sous-nutrition importante a été identifiée

chez les animaux *lgi1*^{-/-} (Chabrol et al., 2010). Les crises conduisent au décès des animaux entre P14 et P21 (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010).

Des modèles de souris portant des mutations du gène *LGII* identifiées chez des patients atteints d'ADLTE ont également été créés (Zhou et al., 2009; Yokoi et al., 2015). Dans le modèle transgénique *LGII*^{835delC}, la masse de la protéine *LGII* est de 23KDa au lieu de 60KDa, ce qui empêche sa sécrétion (Zhou et al., 2009). Ce modèle a été développé afin d'étudier la maturation du réseau neuronal qui est défectueuse dans cette forme transgénique (Zhou et al., 2009). Deux autres modèles ont été générés, l'un portant une mutation conduisant à un défaut de sécrétion de la protéine, *LGII*^{E383A}, l'autre portant une mutation empêchant l'interaction de la protéine avec ses partenaires *LGII*^{S473L}. Dans ces 2 modèles, le même phénotype épileptique que celui décrit chez les souris *lgi1*^{-/-} est retrouvé et induit une mort prématurée des souris.

A l'inverse des modèles transgéniques ayant une déficience de la protéine *LGII*, un modèle conduisant à une augmentation de 50% de la sécrétion de la protéine *LGII* a été créé (Zhou et al., 2009). Bien que ce modèle qui surexprime *LGII* n'a pas été décrit en détail, la surexpression de *LGII* n'engendre pas de phénotype particulier. Ce modèle a notamment permis de comparer le développement du réseau neuronal avec des souris déficientes en protéine *LGII* et des souris WT.

Les précédents modèles transgéniques et la mort prématurée de ces animaux mettent clairement en évidence la fonction de la protéine *LGII* au cours du développement du réseau neuronal. De ce fait, des souris KO conditionnelles pour *LGII* ont été générées (Boillot et al., 2014). Les souris KO conditionnelles ont permis non seulement de contrôler l'expression de la protéine *LGII* au cours du développement du réseau neuronal, mais également d'induire un défaut d'expression dans les neurones inhibiteurs ou excitateurs. Au total, 4 modèles de souris conditionnelles ont été créés : les deux premiers modèles provoquent une délétion de la protéine

LGI1 à un stade embryonnaire précoce (E10,5) dans les neurones inhibiteurs à parvalbumine ou dans les neurones excitateurs glutamatergiques ; les deux autres modèles induisent la délétion de la protéine LGI1 dans les mêmes cellules excitatrices ou inhibitrices à un stade postnatal tardif à partir de 5 semaines (Boillot et al., 2014). Dans ces modèles, aucun défaut épileptique n'a été induit par la délétion de LGI1 dans les interneurons probablement en raison de la faible proportion d'interneurones composant le réseau neuronal. En effet, le réseau neuronal étant majoritairement composé de cellules excitatrices, le taux de protéine LGI1 sécrété par les neurones excitateurs compense probablement le taux de LGI1 qui n'est plus sécrété par les neurones inhibiteurs. Néanmoins, la délétion de LGI1 dans les neurones excitateurs conduit au déclenchement de crises d'épilepsie au stade embryonnaire et au stade postnatal.

L'ensemble de ces modèles transgéniques ont permis de mettre en évidence l'importance de LGI1 au cours du développement (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010; Yokoi et al., 2015; Zhou et al., 2009). Toutefois, le développement des modèles transgéniques est très long et entraînent une modulation de l'expression de la protéine LGI1 dans l'intégralité du cerveau. De plus, ces modèles induisent un phénotype épileptique chez les animaux. Les crises d'épilepsie provoquent une mort cellulaire plus ou moins importante et la formation de connexions aberrantes qui sont également des facteurs de déclenchement d'une nouvelle crise d'épilepsie (Sloviter, 1999; Long et al., 2014; Cui et al., 2020). De ce fait, une fois que le réseau épileptique est mis en place, il est difficile d'identifier si les perturbations observées sont les conséquences directes du dysfonctionnement de la protéine LGI1 ou des effets indirects résultant des crises d'épilepsie.

ii. *Le modèle infusé avec les auto-ac anti-LGI1 :*

La découverte des EL LGI1 a permis de développer un nouveau modèle d'étude de la protéine LGI1 qui contourne les défauts des modèles transgéniques. Dans ce modèle, des auto-ac de

patients atteints d'EL LGI1 sont collectés à partir de leur LCR ou de leur sérum afin d'être infusés dans le cerveau de souris. L'infusion se fait à l'aide d'une mini-pompe osmotique remplie avec les auto-ac pathogéniques. Dans ce modèle, il est possible de contrôler le site d'injection, généralement situé dans les ventricules, ainsi que le temps d'infusion allant communément de 7 à 14 jours (Petit-Pedrol et al., 2018).

Le modèle de souris infusées avec les auto-ac présente les avantages d'être simple et rapide à mettre en place, d'établir un contrôle spatio-temporel de l'injection, et de contrôler la dose d'auto-ac infusés pour ainsi bloquer les fonctions de la protéine LGI1 sans entièrement abolir ces fonctions. Une fois cet équilibre trouvé, il est possible d'étudier la fonction de la protéine LGI1 avant le déclenchement de crise d'épilepsie. Néanmoins, ce modèle a le désavantage d'être invasif et l'implantation de la canule d'infusion dans le cerveau des souris entraîne inévitablement des altérations des structures cérébrales voisines.

Les modèles transgéniques et le modèle infusé par les auto-ac présentes des avantages et des inconvénients. Alors que les modèles transgéniques semblent bien reproduire la pathologie des ADLTE, mais induisent des troubles développementaux, il n'y a actuellement pas de modèle d'étude reproduisant parfaitement la pathologie des EL LGI1.

b) L'effet de la protéine LGI1 au cours du développement

Les études se basant sur les modèles transgéniques ont mis en évidence une action de la protéine LGI1 au cours du développement dans la maturation du réseau neuronal (Zhou et al., 2009; Fukata et al., 2010; Yokoi et al., 2015). Dans ces modèles transgéniques, des crises d'épilepsie sont observées dès P14, ce qui correspond au début d'expression de la protéine LGI1 dans le cerveau (Zhou et al., 2009). Des modifications morphologiques sont observées dès P14 dans l'hippocampe, au moment de la maturation du réseau neuronal (Chabrol et al., 2010). Chez les souris portant la mutation LGI1^{835delC} qui empêche la sécrétion de la protéine LGI1, l'arbre

dendritique est beaucoup plus développé par rapport aux souris WT. Plus spécifiquement, le réseau neuronal mature à P23 est comparable au réseau neuronal immature à P13 des souris WT et mutées (figure 3.7.B). De plus, la densité synaptique est plus grande chez les souris mutées par rapport aux WT (figure 3.7.C) (Zhou et al., 2009). Au cours du développement, les synapses excitatrices prolifèrent avant d'être élaguées durant la 3^{ème} semaine postnatale (Rihn & Claiborne, 1990). Les synapses qui restent deviennent fonctionnellement mature et sont caractérisées par une diminution de la probabilité de libération des neurotransmetteurs (NTs) et une modulation de l'expression des sous-unités des R-AMPA et des R-NMDA (Bolshakov & Siegelbaum, 1995; Cull-Candy et al., 2001; Schwenk et al., 2014). Plus particulièrement, le développement est marqué par la diminution des sous-unités NR2B des R-NMDA et des sous-unités GluA4 des R-AMPA qui sont majoritaires durant les stades embryonnaires et l'augmentation des sous-unités NR2A des R-NMDA et des sous-unités GluA2 des R-AMPA (Cull-Candy et al., 2001; Henley & Wilkinson, 2016). LGI1 régule les fonctions présynaptiques durant le développement en réduisant la probabilité de libération des NTs au niveau des synapses glutamatergiques de la voie perforante et des cellules granulaires (Zhou et al., 2009). Les fonctions postsynaptiques sont également modulées par l'expression de la protéine LGI1 durant le développement en induisant une diminution du ratio NR2B/NR2A des sous-unités des R-NMDA (Zhou et al., 2009). La protéine LGI1 ne semble pas jouer sur la maturation des R-AMPA puisque LGI1 commence à être exprimée dès P14 alors que les sous-unités GluA2 des R-AMPA semblent pleinement exprimés à ce stade (Henley & Wilkinson, 2016). Néanmoins, LGI1 agit sur d'autres mécanismes de régulation des R-AMPA durant le développement puisque chez les souris *lgi1*^{-/-}, l'expression des sous-unité GluA1 des R-AMPA est fortement réduite ainsi que les courants glutamatergiques AMPA (Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015; Ohkawa et al., 2013). La réduction des R-AMPA est particulièrement importante dans le GD

de l'hippocampe où il a également été montré une réduction de l'expression des partenaires ADAM22 et ADAM23 de LGI1 (Fukata et al., 2010).

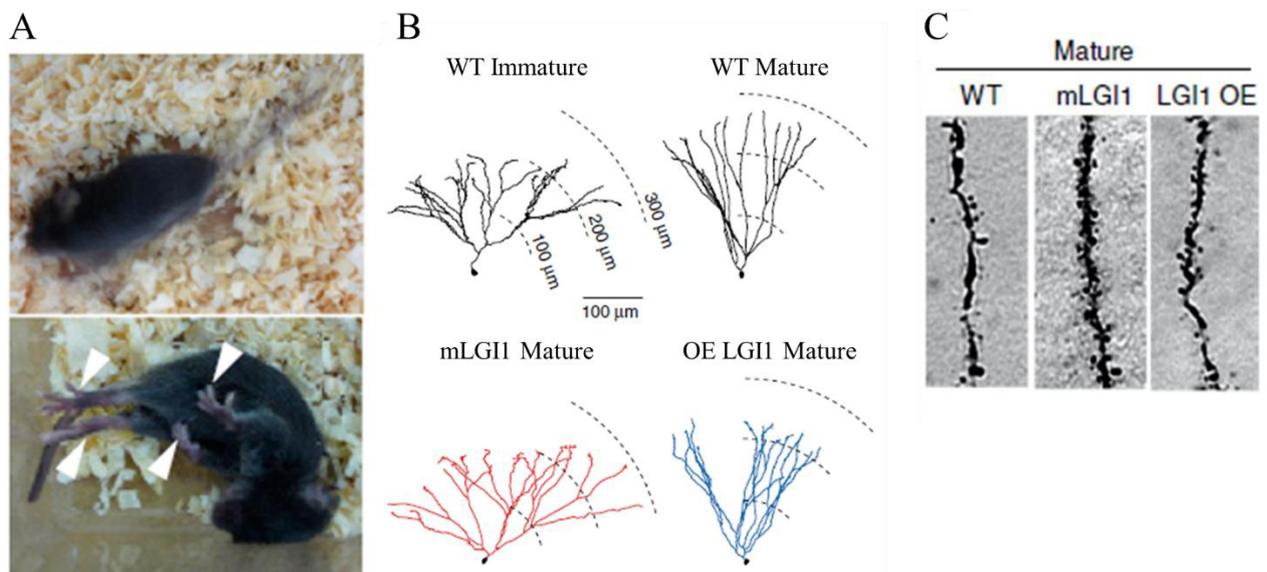


Figure 3.7. La protéine LGI1 est impliquée dans la maturation du réseau neuronal. Image d'une crise d'épilepsie chez des souris *lgil*^{-/-}. Les souris se mettent à courir et sauter dans leur cage (image du haut) puis subissent une crise tonico-clonique (image du bas) (Fukata et al., 2010) (A). Chez les souris WT, l'arbre dendritique est très développé dans le réseau neuronal immature (P13) puis subit un élagage au cours de la maturation pour donner lieu à un arbre dendritique moins dense dans le réseau mature (P23). Chez les souris mutées *LGI1*^{835delC} (mLGI1), l'arbre dendritique du réseau neuronal mature est très développé et est comparable au réseau neuronal immature des souris WT. L'arbre dendritique du réseau neuronal mature des souris surexprimant la protéine LGI1 (OE LGI1) est moins développé que celui des souris WT. Ces mesures ont été réalisées sur des neurones de la région CA3 de l'hippocampe (B) (Zhou et al., 2009a). La densité d'épine dendritique est beaucoup plus grande chez les souris mLGI1 par rapport aux souris WT et OE LGI1 (C) (Zhou et al., 2009a).

c) L'effet de la protéine LGI1 sur la régulation des canaux potassiques kv1.1

i. *Caractéristiques des canaux kv1 :*

Les canaux potassiques kv1 appartiennent à la superfamille des canaux *Shaker* comprenant différents sous-types allant de kv1.1 à kv1.8. Les canaux kv1 ont une action essentielle dans la régulation de l'excitabilité neuronale. La cinétique d'activation des canaux kv1 dépend de leur site d'expression et des autres protéines exprimées dans leur complexe VGKC. Le complexe

VGKC est un ensemble de canaux potassiques kv1.1/kv1.2/kv1.6 associés à d'autres protéines telles que les protéine Caspr2 et LGI1 (Irani et al., 2010), qui sont présents à la membrane des neurones du CNS et au niveau des juxtapanoeuds des axones myélinisés. Le complexe des VGKC permet notamment la repolarisation membranaire après un potentiel d'action. Des dysfonctionnements des canaux kv1.1 sont associés à diverses pathologies incluant certaines formes d'épilepsie (Nguyen & Anderson, 2018; Trosclair et al., 2020). Les canaux kv1.1 sont largement exprimés dans le SNC et périphérique. Dans le SNC, les canaux kv1.1 sont majoritairement hétérotétramériques on les retrouve principalement dans l'hippocampe, le cervelet et le néocortex. Au niveau neuronal, les canaux kv1.1/kv1.2 sont exprimés au niveau du AIS, dans les régions juxtapanodales, et dans les terminaisons axonales (figure 3.8) (D'Adamo et al., 2020). Ainsi, les canaux kv1.1 sont activés à faible voltage et sont rapidement inactivés quand ils sont coexprimés avec kv1.4 et k β 1 (D'Adamo et al., 2020; Dodson & Forsythe, 2004).

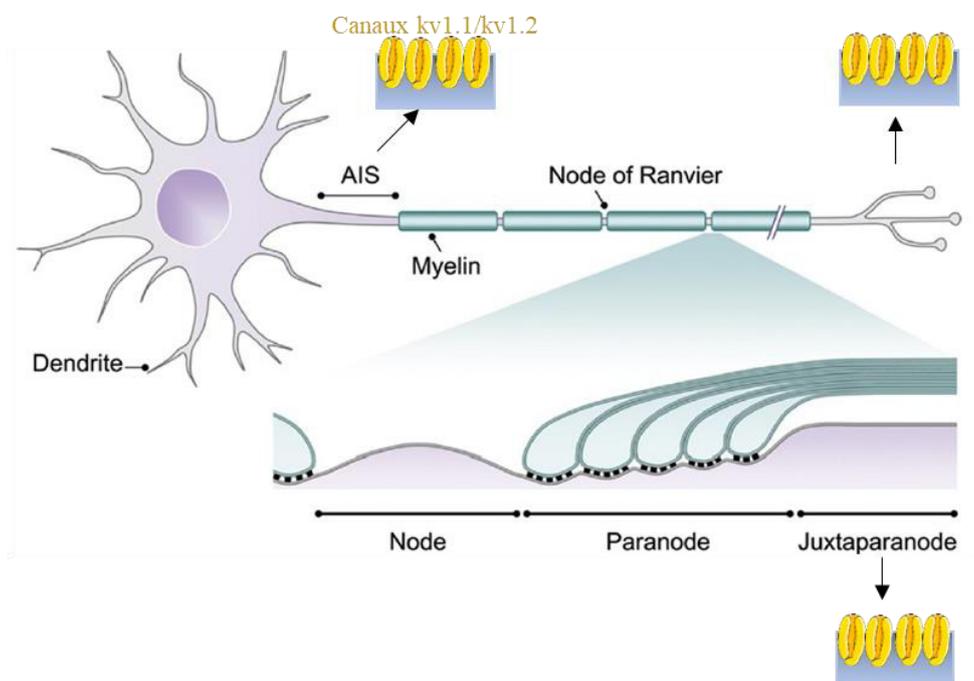


Figure 3.8. L'enrichissement des canaux potassiques kv1.1 sur les neurones (adapté de (Chang et Rasband, 2013)). Les canaux potassiques kv1.1 sont enrichis aux AIS, aux régions juxtapanodales et aux terminaisons axonales.

ii. *La régulation des canaux kv1.1 par la protéine LGI1*

Une première étude s'est intéressée au rôle des canaux kv1.1 dans l'excitabilité neuronale, et a cherché à comprendre leur rôle dans certaines formes d'épilepsie (Schulte et al., 2006). Ils ont alors mis en évidence que la protéine LGI1 est un régulateur des courants potassiques kv1.1. En effet, la présence de protéine LGI1 exogène empêche la rapide inactivation des canaux kv1.1 par la sous-unité kv β 1 dans des ovocytes exprimant ce complexe de canaux potassiques (Schulte et al., 2006). Cependant, la protéine LGI1 n'a pas la capacité d'interagir directement avec les canaux kv mais uniquement avec ses partenaires ADAM22/23 qui ne sont pas exprimés dans les ovocytes (Sagane et al., 2008; Ohkawa et al., 2013; Yamagata et al., 2018). Néanmoins, cette étude a dévoilé un rôle de LGI1 sur les courants potassiques. L'expression des canaux kv1.1 aux extrémités terminales des axones, et l'action de la protéine LGI1 à la synapse, ont poussé les études à se pencher sur le rôle de la protéine LGI1 sur l'activité présynaptique modulée par les canaux kv1.1.

Plus spécifiquement, la facilitation à court-terme mesurée au travers du protocole de « paired-pulse facilitation » (PPF) a été enregistrée au niveau de la synapse formée entre les fibres de la voie perforante et les cellules granulaires du GD sur des tranches d'hippocampe de souris mutées LGI1^{835delC} et de souris WT (Zhou et al., 2009). La PPF est une forme de plasticité à court-terme pendant laquelle lors de l'arrivée rapide d'un 2^{ème} potentiel d'action, le potentiel évoqué dans le neurone postsynaptique va être augmenté pendant une courte durée (figure 3.9). La PPF reflète communément les propriétés présynaptiques. Ainsi, dans cette étude, la PPF est plus faible chez les souris mLGI1 par rapport aux souris WT. La PPF est plus grande chez les souris surexprimant la protéine LGI1 par rapport aux souris mLGI1 et WT (figure 3.9). Cependant, l'ajout d' α -dendrotoxine (α -DTX), un inhibiteur spécifique des canaux kv1.1, annule la différence entre les souris WT et mutées en diminuant la PPF des souris WT (Zhou et

al., 2009). Ces résultats mettent en évidence une altération des propriétés présynaptiques chez les souris mLGII par rapport aux souris WT. Cela suggère également un défaut des canaux kv1.1 lors d'un dysfonctionnement de la protéine LGII. L'altération des mécanismes présynaptiques en absence de LGII est soutenue par une autre étude électrophysiologique qui rapporte une augmentation de la transmission glutamatergique dans l'hippocampe de souris *lgil-/-* à P9 (Boillot et al., 2014). L'absence d'effet dans le compartiment postsynaptique les pousse à conclure que la déficience de la protéine LGII agit sur le compartiment présynaptique (Boillot et al., 2016). Néanmoins, dans cette étude les canaux kv1.1 n'ont pas été spécifiquement étudiés. Plus récemment, l'altération présynaptique est confirmée chez des souris infusées avec les auto ac-LGII pour qui la probabilité de libération des NTs est augmentée (Petit-Pedrol et al., 2018). Dans cette étude, ils ont également analysé l'expression des canaux kv1.1 à la surface des synapses. Ils montrent une réduction de l'expression des canaux kv1.1 synaptiques dans les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe dès 13 jours d'infusion (Petit-Pedrol et al., 2018). Ainsi, le blocage des fonctions de la protéine LGII réduit l'expression des canaux kv1.1 et conduit à réduire les courants potassiques kv1.1. La réduction des courants kv1.1 empêche la repolarisation neuronale et provoque une augmentation de la probabilité de libération des NT.

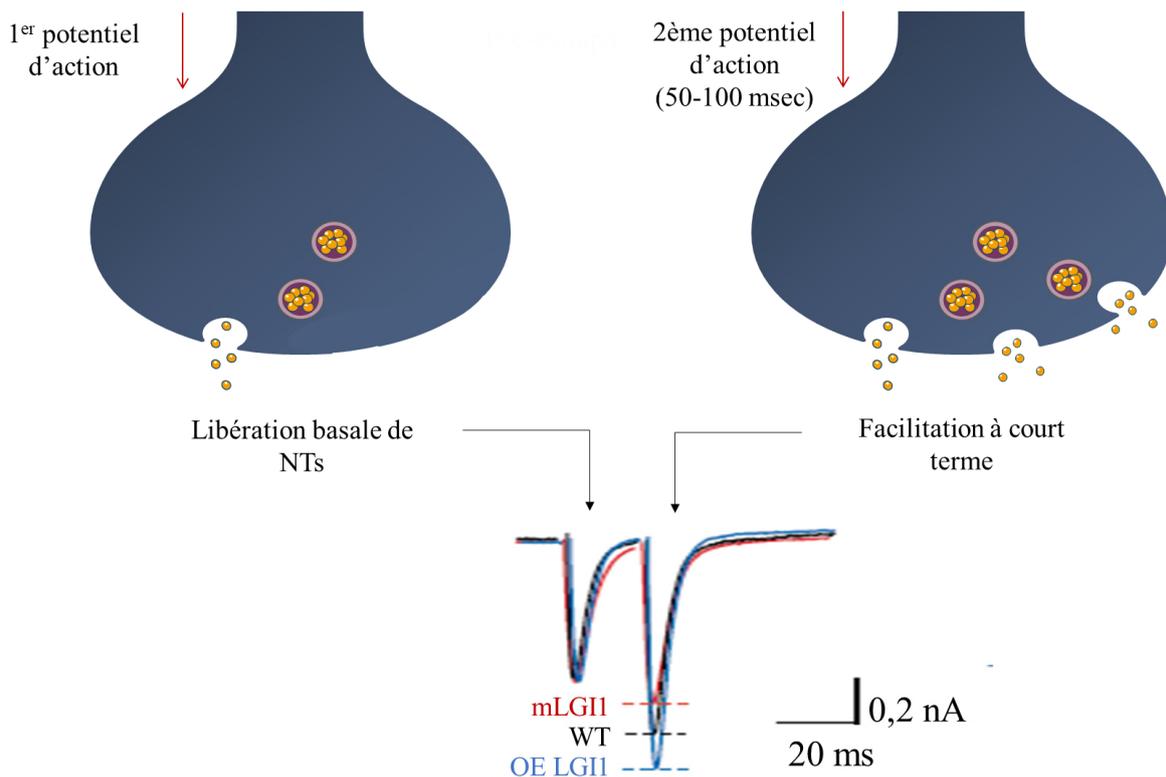


Figure 3.9. LGI1 régule la libération de NT. La PPF est une forme de plasticité à court-terme qui se produit lorsqu'une 2^{ème} stimulation induisant le déclenchement d'un potentiel d'action est déclenchée entre 50 et 100 msec après la 1^{ère} stimulation ou potentiel d'action. Cette plasticité entraîne l'augmentation de la libération des NTs lors du 2^{ème} potentiel d'action et augmente la réponse évoquée. Chez les souris porteuses de la mutation $LGI1^{835delC}$ (mLGI1), la PPF est réduite par rapport aux souris WT. Les souris surexprimant la protéine LGI1 (OE LGI1) ont une augmentation de la PPF.

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant la régulation présynaptique des canaux potassiques kv1.1 par la protéine LGI1, une étude s'est intéressée au complexe LGI1-ADAM22/23 (Lancaster et al., 2019). Dans cette étude des cultures de lignée cellulaire HEK239T ont été transfecté avec les plasmides codant pour les canaux kv1.1 et les protéines ADAM22 ou 23. L'ajout exogène de protéine LGI1 augmente les courants potassiques kv1.1 par l'interaction entre LGI1 et ADAM22. En revanche, ADAM22 sans LGI1 n'a pas d'effet sur les canaux kv1.1, mais ADAM23 seul suffit à réduire les courants potassiques kv1.1. L'ajout de LGI1 en présence de la protéine ADAM23 ne module pas les courants potassiques kv1.1.

LGI1 module donc les courants potassiques kv1.1 par son interaction avec son partenaire ADAM22, qui a des effets opposés à la protéine ADAM23 sur les canaux kv1.1. Ce résultat tend à contester le modèle trans-synaptique LGI1-ADAM23 à la membrane présynaptique (figure 3.5) mais reste à être confirmé par des études complémentaires.

Bien que les études se soient principalement focalisées sur l'action de la protéine LGI1 à la synapse, des auteurs se sont intéressés au rôle de la protéine LGI1 au AIS (Hivert et al., 2018; Seagar et al., 2017). Dans l'hippocampe de souris *lgi*^{-/-}, l'expression des canaux kv1.1 est fortement réduite au niveau du AIS des neurones de la région CA3 par rapport aux souris WT (Seagar et al., 2017). De plus, l'excitabilité intrinsèque des neurones de la région CA3, est augmentée en absence de la protéine LGI1 et réduite après l'ajout de protéine LGI1 exogène. Ces études mettent en évidence une action de la protéine LGI1 sur l'expression des canaux kv1.1 au niveau du AIS. Cette régulation passerait par un large complexe protéique exprimé au niveau du AIS, comprenant également la protéine Caspr2 (Irani et al., 2010; M. Lai et al., 2010). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'action de la protéine LGI1 au AIS sur les canaux kv1.1.

L'ensemble de ces études met en évidence un rôle de la protéine LGI1 dans la régulation des canaux kv1.1. Un dysfonctionnement de la protéine LGI1, dû à des mutations ou à la présence d'ac anti-LGI1, provoque une réduction de l'expression des canaux kv1.1 et réduit les courants potassiques. Cette réduction des courants potassiques, empêche le neurone de rapidement se repolariser. Ce défaut de repolarisation entraînerait donc une augmentation de la libération des NTs et serait à l'origine de l'augmentation de l'excitabilité neuronale. Néanmoins, si la réduction des canaux kv1.1 lors d'une déficience de la protéine LGI1 semble claire, les mécanismes menant à cette réduction ne sont pas connus. De plus, le rôle des canaux kv1.1 dans la régulation de l'excitabilité neuronale n'est pas clairement comprise. De ce fait, l'identification de la protéine LGI1 comme acteur de la modulation des canaux kv1.1 devrait

permettre à de futures études de mieux comprendre les mécanismes de régulation du réseau neuronale par les protéines LGI1 et les canaux kv1.1.

d) L'effet de la protéine LGI1 sur la régulation des récepteurs AMPA

La protéine LGI1 régule l'expression des R-AMPA de par son interaction avec son partenaire postsynaptique ADAM22 (figure 3.5) (Fukata, 2006; Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015; Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018).

Les R-AMPA sont impliqués dans la transmission synaptique glutamatergique et sont régulés par des protéines auxiliaires telle que la Stargazine (Turetsky, 2005; Diering & Huganir, 2018). Des enregistrements électrophysiologiques réalisées sur des tranches d'hippocampe de souris *lgi1*^{-/-}, mettent en évidence une altération de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique sans effet sur la transmission inhibitrice (figure 3.10 A) (Lovero et al., 2015; Y. E. Yu et al., 2010). A l'inverse, l'ajout de protéine LGI1 exogène sur des tranches d'hippocampe de souris WT augmente les courants glutamatergiques (Fukata, 2006). Ces résultats suggéraient une modulation des récepteurs glutamatergiques AMPA ou NMDA. Le blocage des courants Na⁺ par l'ajout de tétrodotoxine (TTX), un antagoniste des canaux Nav, permet d'enregistrer les courants post-synaptiques excitateurs miniature (mEPSC) (figure 3.10 B). L'ajout de TTX empêche le déclenchement des potentiels d'action. De ce fait, les courants enregistrés sont le résultat de la libération spontanée d'une seule vésicule synaptique, ce qui permet de s'affranchir des modulations provenant du neurone présynaptique. Puisque seule une forte dépolarisation du neurone permet l'activation des R-NMDA, l'enregistrement des courants mEPSC sont donc le reflet des R-AMPA postsynaptiques. Ainsi, l'altération des mEPSC chez les souris *lgi1*^{-/-} par rapport aux souris WT, traduit l'altération des R-AMPA en absence de protéine LGI1 (figure 3.10B). Des études immunohistochimiques confirment la réduction des R-AMPA en montrant que l'absence de la protéine LGI1 conduit à une forte

réduction des sous-unités GluA1 dans l'hippocampe et plus particulièrement dans le GD (Ohkawa et al., 2013).

L'effet de LGI1 sur les R-AMPA a été confirmé dans le modèle de souris infusées avec les auto-ac anti-LGI1 dans les ventricules (Petit-Pedrol et al., 2018). Dans ce modèle, il y a une réduction de l'expression des R-AMPA synaptiques dans les régions GD et CA1 de l'hippocampe après 18 jours d'infusion (Petit-Pedrol et al., 2018). Il n'y a cependant pas d'effet de l'infusion des ac sur les mEPSC dans la région CA1. De plus, aucun phénotype épileptique n'est observé dans le modèle infusé (Petit-Pedrol et al., 2018). Cependant, dans le modèle d'infusion avec les ac anti-LGI1, il est peu probable que la totalité des protéines LGI1 soient bloquées par les auto-ac contrairement aux souris *lgi1*^{-/-} où la protéine n'est plus exprimée. Le système semble être capable de s'auto-réguler puisque seules des conditions extrêmes semblent entraîner le déclenchement de crises d'épilepsie et sont visibles dans les études électrophysiologiques et biochimiques.

Bien que la protéine LGI1 ait une action claire sur les R-AMPA, les mécanismes d'action menant aux déficits décrits lors d'un déficit de LGI1 sont encore inconnus. Des études se sont intéressées aux fonctions des domaines LRR et EPTP de la protéine LGI1 sur les mécanismes de régulation des R-AMPA (Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020; Kornau et al., 2020). Le domaine EPTP a été impliqué dans l'interaction de LGI1 avec ses partenaires (Ohkawa et al., 2013; Yamagata et al., 2018). Initialement, il était pensé que la régulation des R-AMPA passait principalement par la liaison de LGI1 avec ADAM22 et que l'inhibition de cette interaction serait à l'origine des déficits rapportés. Cependant, une étude récente montre que le blocage du domaine LRR de la protéine LGI1 par des auto-ac monoclonaux réactifs au domaine LRR, augmente les courants mEPSC alors que le blocage du domaine EPTP module plus faiblement les courants mEPSC dans les neurones de la région CA3 de l'hippocampe (Kornau et al., 2020). De plus, les ac anti-LRR augmentent l'excitabilité neuronale. L'augmentation des

mEPSC en présence d'ac anti-LRR est contradictoire avec les résultats précédemment décrits. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ce résultat et d'élucider les mécanismes d'action des domaines LRR et EPTP à la synapse. Cependant, cette étude montre le rôle important de l'ensemble du complexe trans-synaptique LGI1-ADAM22 sur la régulation des R-AMPA et pas uniquement l'interaction de LGI1 avec ADAM22 à la surface des membranes postsynaptiques.

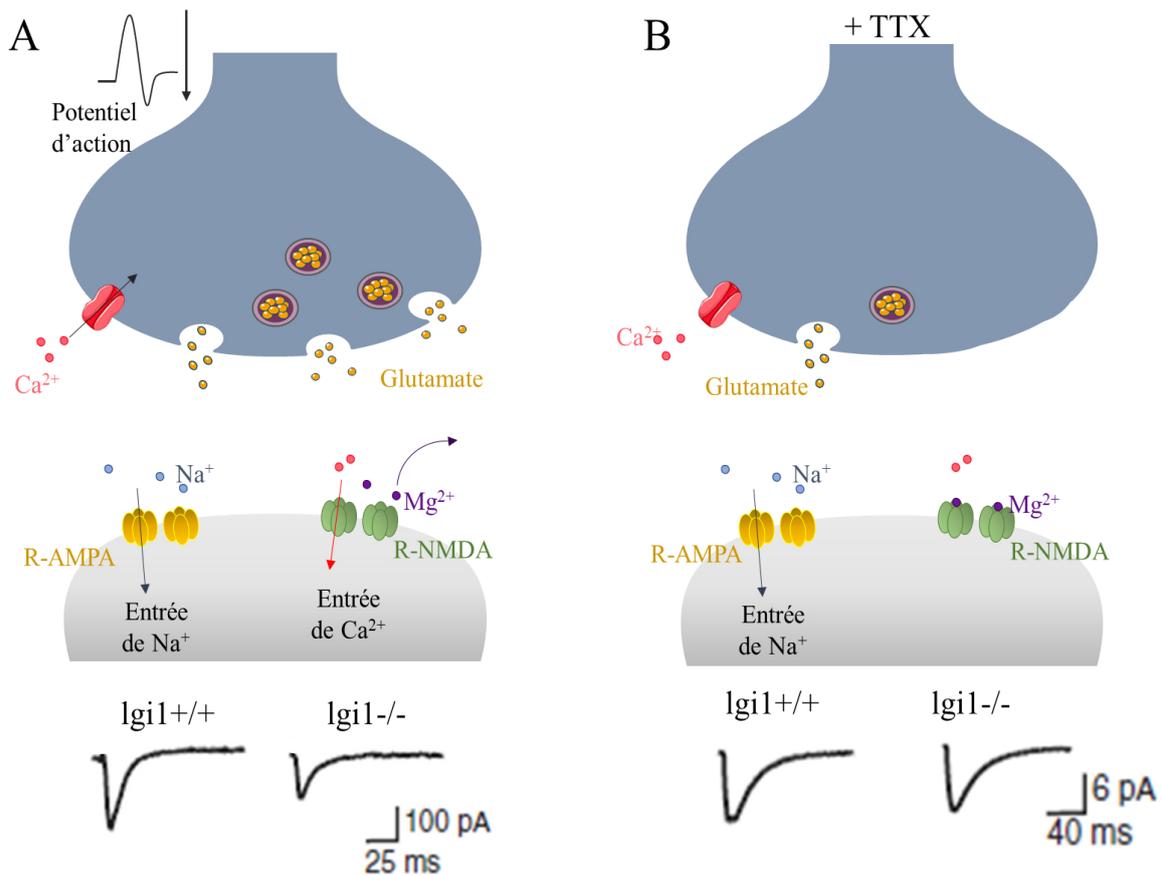


Figure 3.10. L'absence de la protéine LGI1 réduit les EPSC et les mEPSC. Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action dans le compartiment présynaptique, l'entrée de calcium provoque la fusion des vésicules synaptiques et la libération de glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate active les R-AMPA qui laissent entrer les ions Na^+ et provoquent la dépolarisation du neurone postsynaptique. La forte dépolarisation entraîne la libération des ions Mg^{2+} des R-NMDA dans le milieu extracellulaire et permet l'activation des R-NMDA qui laisse entrer le Ca^{2+} . Ces mouvements d'ions sont à l'origine des EPSCs enregistrés. Chez les souris *lgi1*^{-/-}, les EPSCs sont réduits par rapport aux souris *lgi1*^{+/+} (Fukata et al., 2010) (A). L'ajout de TTX bloque les canaux Na_v et empêche le déclenchement des potentiels d'action. Les courants mEPSC enregistrés dans les neurones postsynaptiques sont dus à la libération d'une vésicule

synaptique unitaire et active uniquement les R-AMPA. Les mEPSC sont réduits chez les souris *lgi1*^{-/-} par rapport aux souris *lgi1*^{+/+} (Fukata et al., 2010) (B).

La protéine LGI1 joue un rôle sur l'expression des R-AMPA, mais les mécanismes d'action conduisant au déclenchement de crises d'épilepsie sont encore incompris. Il est très surprenant d'observer que des mutations de la protéine LGI1 diminuent l'expression des R-AMPA étant donné que ces mutations conduisent à un phénotype épileptique. En effet, les crises d'épilepsie sont dues à une hyperexcitabilité du réseau neuronal. A l'inverse, la diminution de l'expression des R-AMPA réduit la transmission glutamatergique excitatrice. Afin d'expliquer cette contradiction, des auteurs ont suggéré que la réduction de l'expression des R-AMPA lors d'un dysfonctionnement de la protéine LGI1 serait le résultat d'une régulation homéostatique. La protéine LGI1 aurait un effet principalement sur les canaux *kv1.1* et l'augmentation de l'excitabilité neuronale pousserait le système à s'autoréguler en diminuant la transmission glutamatergique (Seagar et al., 2017). Néanmoins, ce mécanisme n'a jamais été prouvé et il semble peu probable que l'action de LGI1 sur les mécanismes de régulation des R-AMPA soient aussi indirects étant donné le rôle du complexe LGI1-ADAM2 dans l'organisation synaptique (Fukata et al., 2021). Une autre hypothèse plus probable serait que la réduction des R-AMPA affecterait principalement les synapses excitatrices présentes sur les dendrites des neurones inhibiteurs. En effet, une réduction des R-AMPA exprimés à la surface des neurones inhibiteurs, réduirait l'activité des interneurons qui ne seraient plus en mesure de réguler l'excitation du réseau neuronal.

6) Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre nous avons vu que la protéine LGI1 est une protéine essentielle dans la régulation du SNC autant au cours du développement, dans les processus de maturation, que dans la régulation du réseau neuronal à l'âge adulte. Différents modèles d'études ont été développés afin d'étudier les mécanismes d'action de la protéine LGI1, notamment le modèle

de souris infusées qui permet de s'affranchir des troubles développementaux observés chez les animaux transgéniques (Zhou et al., 2009; Fukata et al., 2010; Petit-Pedrol et al., 2018).

L'action de la protéine LGI1 a principalement été étudiée à la synapse. Par la formation d'un complexe trans-synaptique avec ces partenaires les protéines ADAMs, LGI1 régule la transmission synaptique. Cette régulation pourrait passer par des mécanismes présynaptiques au travers des canaux kv1.1, et postsynaptiques en impliquant les R-AMPA. Néanmoins, de nombreuses questions subsistent notamment concernant la composition protéique précise du complexe LGI1-ADAMs trans-synaptiques. Une meilleure compréhension de l'organisation protéique du complexe LGI1-ADAMs à la synapse, permettra de mieux aborder les mécanismes de régulation sous-jacents. En effet, le complexe trans-synaptique LGI1-ADAMs pourrait avoir pour fonction l'alignement des clusters présynaptiques et postsynaptiques en nanocolonnes (Tang et al., 2016), ou si son action s'étend également à la régulation de certaines voies de signalisation, agir sur l'expression des protéines synaptiques. De plus, les mécanismes fins menant à la régulation des R-AMPA et des canaux kv1.1 par la protéine LGI1 ne sont pas connus. Notamment, à ce jour, il n'y a pas d'explication claire qui justifie que la réduction de l'expression des R-AMPA conduit à une hyperexcitabilité du réseau neuronal.

La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes est nécessaire non seulement pour comprendre les mécanismes de régulation de la transmission synaptique mais également pour comprendre les perturbations observées dans les EL LGI1, comme décrit dans le chapitre 1, ou les ADLTE. Une meilleure compréhension de ces mécanismes et de ces pathologies seraient également une avancée pour d'autres maladies impliquant un déséquilibre dans la transmission neuronale, notamment retrouvé dans les autres formes d'épilepsie, mais également d'autres pathologies où on observe une altération des canaux kv1.1, telles que les ataxies épisodiques de type 1, ou des R-AMPA, telle que la maladie d'Alzheimer.

Pour conclure, de nombreuses questions restent encore à élucider et des études sont nécessaires pour comprendre le rôle de la protéine LGI1 dans la régulation du réseau neuronal et notamment comprendre pourquoi un dysfonctionnement de la protéine LGI1 induit une hyperexcitabilité du réseau neuronal qui se traduit par le déclenchement de crises d'épilepsie.

Contexte scientifique

Une perturbation de la fonction de la protéine LGI1, d'origine génétique ou due à la présence d'auto-ac dans le sérum et le LCR, provoque des crises d'épilepsie chez les patients. La crise d'épilepsie est due à un déséquilibre de la balance excitation-inhibition du réseau neuronal conduisant à une hyperexcitabilité. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les effets d'un blocage de la fonction de la protéine LGI1 afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à une hyperexcitabilité neuronale. En raison des troubles développementaux observés chez les souris transgéniques, nous avons choisi d'utiliser le modèle de souris infusées avec les auto-ac de patients atteints d'EL LGI1 ainsi que des cultures primaires de neurones d'hippocampe.

Les précédentes études cherchant à comprendre le rôle de la protéine LGI1 dans la régulation de la transmission neuronale, ont mis en évidence que la perturbation de la protéine LGI1 réduit l'expression des R-AMPA exprimés à la surface des synapses excitatrices. Ce phénomène est contradictoire avec l'hyperexcitabilité du réseau neuronal. De ce fait, notre but a été de comprendre cette contradiction. Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons suggéré que la réduction des R-AMPA affecterait plus drastiquement les synapses excitatrices situées sur les neurones inhibiteurs. Il en résulterait une réduction de la transmission synaptique excitatrice au niveau des neurones inhibiteurs. Ce déficit dans l'activité du réseau inhibiteur empêcherait les neurones inhibiteurs de contrôler efficacement l'activité des neurones excitateurs et conduirait à des crises d'épilepsie.

Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse a été d'étudier l'effet des auto-ac anti-LGI1 sur l'expression des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs ou excitateurs, et de comprendre les mécanismes résultants sur l'excitabilité du réseau neuronal.

Matériels et Méthodes

Animaux

Cette étude a été réalisée en accord avec la directive européenne 2010/63/EU sur l'utilisation des animaux à des buts scientifiques. L'utilisation des animaux et les procédures expérimentales ont été soumises et validées par le comité d'éthique de l'université de Lyon 1 (#13703).

Pour l'étude électrophysiologique, des souris mâles C57Bl/6JRj (provenance JanvierLabs) ont été utilisées. Dès leur arrivée à l'animalerie à l'âge de 5 semaines, les souris ont été placées en cycle jour-nuit de 12h/12h avec eau et nourriture *ad libidum* et ont bénéficié d'une semaine d'habituation avant d'entrer dans la procédure expérimentale.

Des souris transgéniques Gad2-rosa tomato (GAD2-RT) ont été générées dans notre laboratoire. Pour cela, des souris Gad2-IRES-Cre^{+/+} qui expriment la protéine Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Gad2* codant pour la protéine Glutamate Acide Décarboxylase 65 (GAD65), ont été croisées avec des souris Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}^{+/+} qui contiennent le codon stop loxé avant la séquence codant pour la protéine td-tomato. La descendance Gad2-IRES-Cre^{+/+} Gt(ROSA)26Sor^{+/+} exprime la protéine fluorescente td-tomato dans les cellules GAD65. Aucun phénotype dommageable n'a été observé chez ces souris transgéniques.

Chirurgie

Les souris âgées de 6 semaines ont été infusées à l'aide une mini-pompe osmotique (Alzet, modèle 1007D) durant 7 jours dans le septum médian (coordonnées par rapport au bregma : antéro-postérieur : +0,25 mm ; latéro-médian : +0,5mm ; profondeur : -3mm). La pompe a été préremplie avec 100µL d'IgG purifiées à 60µg/ml ou avec de la dendrotoxine-K (DTX-K) à 100nM. Le jour de la chirurgie, les souris ont été profondément anesthésiées à l'isoflurane (IsoVet) et gardées ainsi pendant toute la durée de l'opération. La température corporelle a été

maintenue par un coussin chauffant et contrôlée à l'aide d'une sonde thermique. Les chirurgies ont été réalisées à l'aide d'un cadre stéréotaxique. Les souris ont reçu une injection de métacam[®] (2mg/kg) en intrapéritonéal à la fin de la chirurgie et le jour suivant. A la suite de la chirurgie, les souris ont été placées sous surveillance quotidienne et leur bien-être a été évalué selon une échelle de douleur prenant en compte le poids, la nidification, la mobilité et le comportement de l'animal.

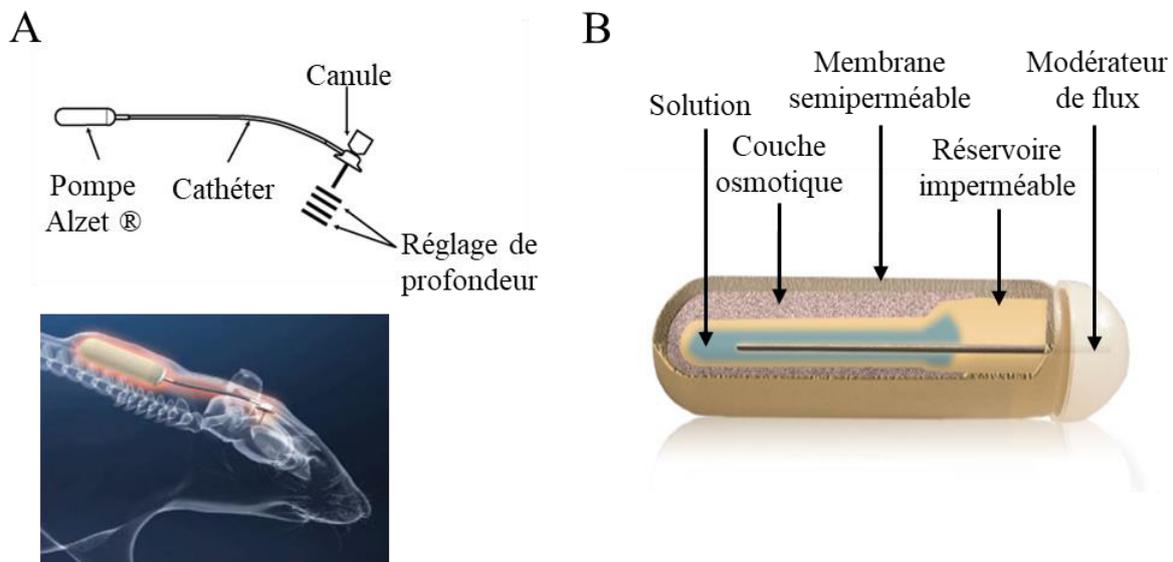


Figure 4.1. Schéma du fonctionnement de la mini-pompe osmotique Alzet[®]. La mini-pompe contient un réservoir prérempli avec la solution d'IgG purifiées ou de DTX-K. La mini-pompe est glissée sous la peau de l'animal. Le réservoir est séparé du milieu extérieur tissulaire par une membrane semi-perméable qui laisse passer les mouvements d'eau, et une couche osmotique où l'osmolarité est élevée. La différence élevée d'osmolarité entre l'environnement tissulaire et la couche osmotique provoque un flux d'eau entrant qui comprime le réservoir afin d'envoyer la solution contenue dans le réservoir vers la canule et la faire diffuser dans le cerveau (site Alzet.fr).

Purification des immunoglobulines G humaines

Les sérums de 4 patients atteints d'encéphalite limbique à anticorps anti-LGI1 (P1, P2, P3 et P4) ont été fournis par le centre de référence des syndromes paranéoplasiques et la NeuroBioTech des Hospices Civils de Lyon (HCL – Hôpital neurologique Pierre Wertheimer).

Les sérums de 2 sujets sains (C1 et C2) ont été fournis par l'établissement français du sang (EFS).

Les sérums sont conservés à -80°C jusqu'à la purification des IgG. Des billes de sépharose recouvertes de protéine A (Sigma, 4B fast-flow *Staphylococcus aureus*, #P9424) ont été placées dans des tubes en polypropylène et rincées 3 fois au PBS 1X. Les sérums des patients ont été incubés avec les billes pendant 2h30 dans le but de fixer les IgG aux protéines A, puis le mélange a été transféré dans des colonnes de chromatographie (Evergreen Scientific, #208-3384-060). Après une élution du surplus de sérum et 3 rinçages au PBS 1X et NP40 0,01%, les IgG ont été éluées par une solution de Glycine 0,1M pH 2,8 et neutralisées dans une solution de TRIS-HCL 1,5M pH 8,8. Les fractions les plus concentrées ont été dialysées contre du PBS 1X dans une cassette de dialyse (Thermofisher, #87730) pendant une nuit à 4°C. La solution a été dosée au nanodrop avant d'être filtrée (filtres 0,22µm, Dutscher #2528619). Les IgG purifiées sont stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Cultures primaires de neurones d'hippocampe de rats

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe ont été obtenues à partir d'embryons de rattes Wistar (provenance JanvierLabs) au stade embryonnaire 17,5 jours (E17,5). Des lamelles en verre de 14mm de diamètre (Labelians, #LCO14) ont été utilisées dans les expériences d'électrophysiologie. Des lamelles en verre de 18 mm de diamètre (VWR, #631-0153) ont été utilisées pour les expériences d'immunomarquages. Des boîtes de Pétri de 100mm de diamètre (Dutscher, #430167) ont été utilisées afin d'étudier l'expression des protéines synaptiques après enrichissement des densités synaptiques.

Les lamelles en verre ont été préalablement lavées à l'acide nitrique 30% avant d'être stérilisées. Le jour précédent la mise en culture, les lamelles en verre ou les boîtes de Pétri ont été traitées à la poly-l-lysine (Sigma, #P2636) à 0,5 mg/ml durant 1 nuit à 37°C. Le jour de la

mise en culture, la ratte gestante a été profondément anesthésiée à l’isoflurane puis décapitée afin de prélever les embryons et les déposer dans une solution de dissection de Hank’s Buffer Salt Solution 1X (HBSS, Gibco, #14185-045). Les hippocampes des embryons ont été récupérés en condition stérile et ont subi une dissociation chimique par une solution de trypsine 0,25 % (Gibco, #15090-046) pendant 10 minutes à 37°C. La dissociation chimique est inhibée par de l’albumine de sérum bovin 0,2% (BSA, Sigma, #A2058). Puis, les hippocampes ont été dissociés mécaniquement dans le milieu de culture Neurobasal (Gibco, #21103-049) supplémenté en B27 4% (Gibco, #17504-044), Penicilline/Streptomycine 1% (P/S, Gibco, #15140-122), L-glutamine 0,3% (Gibco, #25030-024). Les cellules ont été comptées puisensemencées dans le milieu de culture à 210 cellules/mm² sur les lamelles en verres ou 950 cellules/mm² sur les boîtes de Pétri et placées dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ jusqu’à leur utilisation entre 14 et 17 jours (DIV14-17).

Cultures primaires de neurones d’hippocampe de souris

Les cultures primaires de neurones d’hippocampe de souris ont été obtenues à partir d’embryons (E18) de souris GAD2-RT. Les cultures neuronales d’hippocampe de souris ont été utilisées pour l’étude des effets des IgG LGI1 sur l’expression des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs, réalisée par microscopie super-résolution STORM. Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles en verre de 18mm de diamètre (VWR, #631-0153).

De même que pour les cultures primaires de neurones de rats, les lamelles en verre ont été lavées à l’acide nitrique 30%, stérilisées et traitées à la poly-L-lysine (Sigma, #P2636) à 0,5 mg/ml durant 1 nuit à 37°C 5% CO₂. Le jour de la mise en culture, les femelles gestantes ont été profondément anesthésiées à l’isoflurane avant d’être décapitées. Les embryons ont été prélevés, puis les hippocampes ont été récupérés dans une solution de dissection HBSS1X en condition stérile. La dissociation chimique a été faite dans une solution de trypsine 0,25% à

37°C durant 10 minutes. La trypsine a été rincée et inhibée dans une solution Neurobasal (Gibco, #2103-049) supplémentée avec du sérum de veau foetal 10% (SVF, ThermoFisher, #15377636), puis dans une solution de Neurobasal pure (Gibco, #2103-049). La dissociation mécanique a été réalisée dans le milieu de pré-adhésion composé de « Minimum Essential Medium » (MEM, Gibco, #51200-046) supplémenté en sodium pyruvate 1% (Gibco, #11360-039), sérum de cheval 5% (Gibco, #26050-070), L-glutamine 1% (Gibco, #25030-024), P/S 1% (Gibco, #15140-122). Les cellules ont été comptées etensemencées à 210 cellules/mm² pendant 2h avant de remplacer le milieu de culture par un milieu neurobasal supplémenté en B27 2% (Gibco, #17504-044), L-glutamine 1% (Gibco, #25030-024), P/S 1% (Gibco, #15140-122). Les cellules ont été placées dans un incubateur à 37°C, 5%CO₂ jusqu'à leur utilisation à DIV14-17.

Cultures et immunomarquages sur cellules HEK293T

Des cellules HEK293T ont étéensemencées à 80 000 cellules sur des lamelles en verre 14mm de diamètre (Labelians, #LCO14), traitées à la poly-l-lysine (Sigma, #P1399) à 10µg/ml. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM, Gibco, #31885) supplémenté en P/S 1% (Gibco, #15140-122), SVF 10% (ThermoFisher, #15377636) à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont été transfectées à l'aide d'un kit de transfection à la lipofectamine LTX (ThermoFisher, # 15338100) avec un plasmide codant pour la protéine LGI1 couplée à la « green fluorescent protein » (LGI1-GFP) et un plasmide codant pour la protéine ADAM22, ou bien avec un plasmide codant pour la protéine Caspr2-GFP. 48h plus tard, les cellules ont été incubées avec les IgG purifiées à des concentrations croissantes pendant 1h avant d'être fixées à la paraformaldéhyde 4% (PFA, Euromedex, # EM-15713-S) puis lavées 3 fois au PBS 1X. Les cellules ont ensuite été incubées avec une solution de blocage BSA 1% (Axdy, #1000 -70), Normal Goat Serum 10% (NGS, Eurobio, #S-100), PBS pendant 30 minutes avant d'être incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG humaines - Alexa 555 (Invitrogen, #A21433) pendant 2h à température ambiante. Les cellules

ont ensuite été marquées au DAPI (1:50) avant d'être déposées sur une lame dans un milieu de montage Fluoromount (ThermoFisher, # 4958-02). Les images ont été réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Imager Z1 Apotome).

Immunomarquages sur les cultures neuronales

Détermination de la concentration d'utilisation des IgG purifiées :

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe (DIV17) ont été incubées avec les IgG purifiées à une gamme de dilutions croissantes allant de 1:10^{ème} à 1:320^{ème} pendant 1h avant d'être fixées dans une solution de PFA 4% (Euromedex, # EM-15713-S), tampon phosphate 0,1M pendant 15 minutes. Les cellules ont été incubées dans une solution de blocage BSA 1% (Axdays, #1000 -70), NGS10% (Eurobio, #S-100), PBS avant d'être incubées 2h avec les anticorps secondaires anti- IgG - Alexa 555 (Invitrogen, #A21433). Après un marquage au DAPI à 50µg/ml, les lamelles de verre ont été montées sur lame dans un milieu de montage Fluoromount-G (ThermoFisher, # 4958-02).

Etude de l'effet des IgG sur l'expression des R-AMPA :

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat ou de souris GAD2-RT ont été incubées durant 3 jours (DIV14-17) avec les IgG purifiées à 20µg/ml avant d'être fixées dans une solution de PFA 4%, tampon phosphate 0,1M pendant 10 minutes. Les cellules ont été incubées dans une solution de blocage BSA 1%, NGS 10%, PBS pendant 1h avant d'être incubées avec les ac anti-GluA1 (Thermofisher, #MA1-045) durant 1 nuit à 4°C puis incubées avec les ac secondaires anti-lapin conjugués Alexa 647 (Invitrogen, # A21244). Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution de PBS-Triton 0,3% (PBS-T) pendant 15 minutes puis de nouveau incubées dans une solution de blocage BSA 1% (Axdays, #1000 -70), NGS10% (Eurobio, #S-100), PBS-T pendant 1h. Les ac anti-PSD95 (Thermofisher, #MA1-045) ont été incubés pendant 1 nuit à 4°C suivis des ac secondaires anti-souris conjugués Alexa 488

(Invitrogen, # A11029) pendant 2h. Après un marquage au DAPI à 50µg/ml, les lamelles ont été montées sur lame dans un milieu de montage Fluoromount (ThermoFisher, # 4958-02). Les cultures de neurones d'hippocampe des souris GAD2-RT réalisées pour la microscopie STORM n'ont pas été marquées au DAPI et ont été conservées dans du PBS1X à 4°C jusqu'au jour de l'acquisition. Le jour de l'acquisition, les lamelles ont été montées sur une lame à dépression (voir protocole dans la partie « Microscopie super-résolution STORM »).

Pour les cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat, les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Imager Z1 Apotome) à l'objectif x100 (Ouverture Numérique ON 1,4). Les images ont été analysées sous le logiciel Icy à l'aide du plugin Spot Detector. Les clusters des sous-unités GluA1 des R-AMPA colocalisés dans un cluster de protéines PSD95 ont été analysés afin d'étudier l'expression synaptique des sous-unités GluA1.

Electrophysiologie sur cultures neuronales

Les enregistrements en patch-clamp configuration cellule entière ont été réalisés sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe (DIV17) immergées dans une solution de liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) 1X composée de (en mM) : 136 NaCl ; 2,5 KCl ; 1,26 MgCl₂ ; 2 CaCl₂ ; 10 D-glucose, pH 7,4, 291 mOsm à 37°C. La pipette d'enregistrement a été obtenue par élongation d'un capillaire en verre (Harvard Apparatus, #GC150F-10, diamètre externe : 1,5mm, diamètre interne : 0,86mm,) de résistance 7 à 11 MΩ et a été remplie d'une solution intrapipette composée de (en mM) : 145 K-gluconate ; 2 MgCl₂ ; 5 EGTA ; 2 Na₂ATP ; 0,2 NaGTP ; 10 Hepes ; pH=7,5, 276 mOsm. Les neurones ont été enregistrés en voltage-clamp à l'aide d'un amplificateur MultiClamp 700B (Axon CNS, Molecular Devices). Le potentiel de membrane des cellules était maintenu à -70mV, et seuls les neurones dont la résistance d'accès était comprise entre 10 et 30 MΩ ont été enregistrés. Les neurones ont été observés à l'aide d'un microscope optique Olympus BX51WI et les courants post-synaptiques

excitateurs spontanés (sCPSE) ont été enregistrés pendant 10 minutes par le logiciel WinWCP. L'analyse des sCPSE a été réalisée par le logiciel Clampfit version 10.2. L'amplitude et la fréquence des courants ont été analysées et moyennées pour chaque neurone. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM et représentent le nombre de neurones enregistrés.

Electrophysiologie sur tranches aigues d'hippocampe de souris

L'étude électrophysiologique a été réalisée sur des tranches aigues d'hippocampe de souris C57BL6/JRj âgées de 7 semaines, 7 jours suivant l'implantation de la mini-pompe osmotique. Après anesthésie à l'isoflurane, les animaux ont été mis à mort par décapitation et le cerveau a été rapidement prélevé puis immergé dans une solution de aCSF à 4°C composée de (en mM) : 125 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose oxygénée avec 95% O₂ et 5% CO₂. Des tranches transversales de 400 μ m d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un vibratome (ThermoFisher, #HM 650V) avant de reposer au moins 2h dans l'aCSF 95% O₂ et 5% CO₂ à température ambiante avant de procéder aux enregistrements électrophysiologiques.

Une tranche a ensuite été transférée dans la chambre d'enregistrement perfusée avec la solution d'aCSF chauffée à 37°C et visualisée à l'aide d'un microscope optique droit (Zeiss, Axioskop). Les collatérales de Schaeffer ont été stimulées dans la région CA3 de l'hippocampe à l'aide d'une électrode bipolaire concentrique (Phymep, #CBARC75) reliée à un stimulateur (WPI, modèle A365) et contrôlée à l'aide du logiciel WinWCP (version 5.2). Les pipettes d'enregistrement ont été réalisées à l'aide d'une étireuse (Narishige, modèle PC-10) à partir de capillaires de verre (Harvard Apparatus, #GC150F-10, diamètre externe : 1,5mm, diamètre interne : 0,86mm.). L'électrode d'enregistrement remplie d'aCSF a été positionnée dans la région CA1 de l'hippocampe afin d'enregistrer les potentiels de champs locaux (PCL). Le signal a été amplifié à l'aide d'un amplificateur MultiClamp 700B (Axon CNS, Molecular

Devices). Avant l'enregistrement les PCL, la courbe « d'entrée/sortie » ou « input-output (IO) » a été établie en délivrant dans les collatérales de Schaeffer des stimulations d'intensité croissante allant de 0 à 60mV d'une durée de 0,05msec à 0,01Hz, et en enregistrant les réponses évoquées dans la région CA1. L'intensité des stimulations a ensuite été ajustée à 50% de l'amplitude maximale des réponses évoquées pour la suite des enregistrements. La ligne de base des PCL a été enregistrée durant 15 minutes pendant laquelle des stimulations de 0,05msec à 0,03Hz ont été délivrées afin de vérifier la viabilité de la tranche. Puis, une solution de 4-aminopyridine (4-AP, Tocris, #0940) à 40 μ M ou une solution de 4-AP à 40 μ M et picrotoxine (Tocris, #1128) à 100 μ M, a été ajoutée au bain durant 20 minutes avant d'être rincée 25 minutes à l'aCSF 1X. Les stimulations ont été arrêtées dès le déclenchement du 1^{er} ictus. Les enregistrements ont été analysés à l'aide du logiciel Clampfit (version 5.2). L'hyperexcitabilité globale du réseau a été calculée en multipliant l'aire des ictus par le nombre d'ictus déclenchés pendant les 45 minutes d'enregistrement suivant l'ajout de 4-AP ou de 4-AP et picrotoxine.

Purification des densités postsynaptiques et analyse de l'expression des protéines

ADAM22/23

Enrichissement et fractionnement des densités postsynaptiques :

Les purifications des densités post-synaptiques (PSD) ont été réalisées à partir de cultures de neurones non traitées à DIV17 et à partir de tranches aigues d'hippocampe de l'hémisphère controlatéral de souris âgées de 7 semaines infusées avec les IgG ctrl. Les cultures cellulaires ou les tranches d'hippocampe ont été incubées 10 minutes sur glace dans une solution tampon 1 composée de sucrose 0,32M et HEPES 10 mM pH 7,4 complétée avec un inhibiteur de protéase (Sigma, #4693132001) et de l'orthovanadate 1X (Biolabs, #P0758S). Puis, une étape de trituration dans la solution tampon 1 a été réalisée afin de dissocier les cellules des cultures et des tranches d'hippocampe avant d'être centrifugées 10 minutes à 1 000 g afin d'enlever les

débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré et a été à nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 20 minutes. Le culot contenant les fractions membranaires brutes a été resuspendu dans une solution tampon 2 composée de EDTA 1 mM et HEPES 4 mM, pH 7,4 afin de chélater le calcium, puis centrifugé 20 minutes à 12 000 g. Cette étape a été répétée 2 fois. Le culot résultant contenait la fraction synaptosomale, a été resuspendu et incubé 1h dans une solution tampon 3 composée de NaCl 100 mM, HEPES 20 mM, Triton 0,5%, pH 7,4 à 4°C, puis centrifugé à 12 000 g pendant 20 minutes. La fraction non-PSD contenu dans le surnageant a été récupérée et le culot resuspendu dans une solution tampon 4 composée de NaCl 0,15 mM, Triton 1%, DOC 1%, SDS 1%, HEPES 20 mM pH 7,5 et incubée 1h à 4°C. La fraction PSD a été récupérée après centrifugation à 10 000 g pendant 15 minutes.

Western Blot :

Les fractions non-PSD et PSD ont été éluées dans une solution de Laemmli-DTT pendant 5 minutes à 95°C, puis 5 µg de protéines ont été déposées et séparées par SDS-Page dans un gel de polyacrylamide 4-12% (Biorad, #3450124). Les gels ont été transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 30 minutes dans une solution de blocage composée de lait 4% et « Tris Buffer Saline » (TBS)-tween 0,1%. Les protéines d'intérêt ont été révélées par un immunomarquage avec les anticorps correspondants suivants : anti-ADAM22 (Abcam, # ab231340), anti-ADAM23 (abcam, # ab28304) anti-PSD-95 (Cell Signaling, #3450S), anti-Synaptophysine (Sigma, # S5768), anti-souris conjugués à la protéine horseradish peroxidase (HRP) (JacksonLabs, #115-036-003), anti-lapin conjugués HRP (JacksonLabs, #11-036-003). Le niveau d'expression de chacune des protéines d'intérêt a été révélé par chimiluminescence et analysé à l'aide du logiciel ImageLab.

Microscopie super-résolution STORM :

Réalisation des coupes d'hippocampe :

Des souris GAD2-RT implantées pendant 7 jours avec une mini-pompe osmotique ont été profondément anesthésiées à l'isoflurane (IsoVet) et perfusées en intracardiaque avec 5ml de NaCl 0,9% à 120ml/h puis avec 5ml de NaCl à 60 ml/h. Les cerveaux ont été prélevés et fixés dans une solution de PFA 4% (Euromedex, # EM-15713-S), tampon phosphate 0,1M pendant 24h et conservés dans une solution de sucrose 30%. Les cerveaux ont ensuite été congelés à l'isopentane à -40°C puis ont été intégrés dans un composé OCT (optimal cutting temperature) pour conserver les cerveaux et réaliser les coupes. Des coupes coronales de l'hippocampe de 7µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Thermofisher, #NX50) à -20°C et récoltées sur des lamelles haute-précision (Marienfield #0117580) préalablement incubées avec de la gélatine. Les coupes ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Immunohistochimie :

Les coupes ont été réhydratées durant 5 minutes dans une solution de PBS1X et incubées avec une solution de blocage BSA 1% (Axday, #1000 -70), NGS 10% (Eurobio, #S-100), PBS pendant 1h à température ambiante. Les ac anti-GluA1 (Millipore #ABN241) ont été incubés durant 1 nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS 1X, les ac anti-lapin conjugués Alexa 647 (Invitrogen #A21244) ont été incubés pendant 2h à température ambiante. Les coupes ont été lavées puis conservées à 4°C jusqu'à l'acquisition.

Acquisitions et analyses :

Les coupes et les cultures primaires de neurones d'hippocampe de souris GAD2-RT immunomarquées et fixées sur des lamelles ont été montées sur des lames à dépression (Marienfield # 631-9475) scellées contenant un milieu « switching buffer dStorm » comme précédemment décrit (Heilemann et al., 201 ; Van De Linde et al., 2018). Les acquisitions des

images ont été réalisées à l'aide d'un microscope Nikon PALM-STORM équipé d'une caméra EM-CCD (Andor Ixon 897 Ultra, gain 250). Les acquisitions ont été réalisées en utilisant le logiciel NIS-Element.

Les hippocampes ont été localisés à l'aide d'un objectif x20 (ON 0,5) avant de passer à l'objectif à immersion x100 (ON 1,49). Les analyses ont été réalisées dans la couche moléculaire de la région du gyrus denté, et dans les couches *stratum radiatum* et *stratum lacunosum moleculare* des régions CA3 et CA1. Dans les cultures neuronales, les neurones inhibiteurs exprimant la protéine td-tomato (GAD+) ont été localisés à l'aide d'un objectif x20 (ON 0,5) avant de passer à l'objectif à immersion x100 (ON 1,49). Une image « wide-field (WF) » à la longueur d'onde d'excitation 561 nm a été réalisée avant de définir une région d'intérêt (ROI) de 256x256 pixels (taille du pixel = 157,29 nm). Pour les cultures neuronales, une image WF des protéines PSD95 a été également réalisée à la longueur d'excitation 488 nm. Les acquisitions en super-résolution ont été effectuées avec un laser diode de longueur d'onde 642 nm (puissance laser : 320 mW) et un filtre Cy5 4040C (M352119). 30 000 images par acquisitions ont été prises. Les tableaux de localisations ont été générés à l'aide du plugin ThunderStorm du logiciel Image J, à partir des 25 000 dernières images. Les tableaux de localisation ont ensuite été utilisés afin d'étudier les sous-unités GluA1 sous le logiciel SR Tesseler.

Pour l'analyse des sous-unités GluA1 dans les cultures neuronales, les régions d'intérêt (ROI) correspondant aux clusters PSD95 ont été définies sous le logiciel Fiji à l'aide du plugin Spot Detector. Les ROI ont été converties pour être exportées sous le logiciel SR Tesseler à l'aide du plugin « ExportROIsToTesselerFormat » développé par le Bordeaux Imaging Center. A l'aide du logiciel SR Tesseler, les sous-unités GluA1 localisées à l'intérieur d'une ROI ont été analysées. Les paramètres suivants ont été appliqués : facteur de densité : 2 localisations, nombre de localisation minimum : 50 nm.

Pour l'analyse des sous-unités GluA1 dans des coupes d'hippocampe, les paramètres suivants ont été appliqués pour les cellules GAD⁺ : facteur de densité : 4 localisations, aire minimum des clusters = 20 nm et nombre minimum de localisations dans un cluster = 20 localisations. Pour les régions GAD⁻, les paramètres suivants ont été utilisés : facteur de densité : 5 localisations, aire minimum des clusters = 20 nm, nombre minimum de localisations dans un cluster = 50 localisations.

Analyses statistiques

L'ensemble des tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 7. Les données sont exprimées par la moyenne \pm SEM. Pour chaque analyse statistique, un test d'identification des outliers a été réalisé en suivant la méthode de ROUT puis la distribution des données a été testée par le test de normalité de Shapiro-Wilk uniquement si la taille des échantillons (n) < 30 . Si $n \geq 30$, les données sont considérées comme suivant une loi normale.

Pour comparer les moyennes entre 2 groupes, nous avons réalisé un test t de Student si les données suivent une loi normale, ou un test de Mann-Whitney si les données ne suivent pas une loi normale. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Pour comparer les moyennes de plus de 2 groupes, nous avons effectué un test ANOVA 1 facteur si les données suivent une loi normale, ou un test de Kruskal-Wallis si les données ne suivent pas une loi normale. Si les résultats des tests étaient statistiquement différents (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), un test *post Hoc* a été utilisé afin de comparer les moyennes 2 à 2. Dans le cas d'un test ANOVA 1 facteur, le test *post Hoc* de Dunnett a été utilisé afin de comparer un ensemble de moyennes à une moyenne de référence, ou le test *post Hoc* de Tukey a été utilisé afin de comparer toutes les moyennes entre elles. Dans le cas d'un test de Kruskal-

Wallis, le test *post Hoc* de Dunn a été utilisé afin de comparer les moyennes entre elles. Les résultats sont statistiquement différents lorsque * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Résultats

Le centre de référence des syndromes paranéoplasiques des Hospices Civils de Lyon (HCL) a pour objectif le diagnostic des patients atteints d'encéphalites auto-immunes. Pour cela, les échantillons de sérum et de LCR des patients sont recueillis, testés et conservés dans la banque NeuroBioTec rattachée à l'hôpital neurologique Pierre Wertheimer des HCL. Nous avons obtenu des échantillons de sérum de 4 patients atteints d'EL LGI1, respectant 3 critères de sélection :

- Les sérums proviennent de patients diagnostiqués avec une EL LGI1 avec un titre élevé en IgG LGI1 dans leur sérum.
- Les sérums doivent contenir uniquement des IgG LGI1 sans IgG Caspr2.
- Les IgG LGI1 doivent être positifs dans le sérum et dans le LCR des patients.

Les sérums contrôles ont été prélevés chez des sujets sains et ont été fournis par l'établissement français du sang (EFS). Toutes les expériences ont été réalisées sur les IgG purifiées à partir des sérums de patients atteints d'EL LGI1 et de sujets sains.

Partie I : Validation de l'utilisation des IgG purifiées à partir d'échantillons de sérum.

1) Validation des purifications des IgG à partir des échantillons de sérum

Les IgG ont été purifiées à partir du sérum de 4 patients atteints d'EL LGI1 appelés P1, P2, P3 et P4, et du sérum de 2 sujets sains appelés C1 et C2. Nous avons vérifié que les IgG purifiées à partir du sérum des patients atteints d'EL LGI1 se fixent sur la protéine LGI1. Pour cela, nous avons réalisé des immunomarquages fluorescents sur des cellules HEK293T exprimant la protéine LGI1 couplée à la protéine fluorescente « Green Fluorescent Protein (GFP) (LGI1-GFP) », et son partenaire ADAM22 afin que la protéine LGI1, qui est sécrétée dans le milieu

extracellulaire, puisse se fixer à la surface des cellules. Les IgG LGI1 étant polyclonales, certaines d'entre elles vont se fixer sur des sites de liaison de la protéine LGI1 sans perturber son interaction avec la protéine ADAM22 et seront détectées par immunomarquage. Certains patients atteints d'EL possèdent dans leur sérum des ac anti-LGI1 ainsi que des ac anti-Caspr2, une protéine neuronale associée aux VGKC (Taha Abdulaziz et al., 2017). Nous avons donc réalisé des immunomarquages sur des cellules HEK293T exprimant la protéine Caspr2 couplée à la protéine GFP (Caspr2-GFP).

Nos résultats montrent que les IgG humaines des patients P1, P2, P3 et P4 sont colocalisées avec la protéine LGI1-GFP (figure 5.1) mais qu'il n'y a pas d'IgG humaines fixées sur les cellules HEK293T lorsqu'elles ont été transfectées avec la protéine Caspr2 (figure 5.2). Cela signifie que les IgG purifiées à partir des sérums de patients P1-P4 contiennent des ac anti-LGI1 mais pas d'ac anti-Caspr2. Un contrôle réalisé à partir de cellules exprimant uniquement la protéine ADAM22 et un contrôle réalisé à partir de cellules n'exprimant ni la protéine LGI1 ni la protéine ADAM22 nous ont permis de confirmer que nos résultats sont bien dus à la présence d'ac anti-LGI1 dans nos échantillons. Aucune IgG humaine n'a été détectée lorsque les IgG des sujets sains C1 ou C2 ont été incubées (figure 5.1 et 5.2). Cela indique que les IgG purifiées à partir des sérums des sujets sains C1 et C2 ne contiennent ni ac anti-LGI1 ni ac anti-Caspr2. Ces résultats valident l'utilisation de ces échantillons pour la suite de notre étude. Les IgG purifiées à partir du sérum de patients atteints d'EL LGI1 seront appelées « IgG LGI1 », et les IgG purifiées à partir des sérums de sujets sains seront appelées « IgG ctrl », pour la suite de ce manuscrit.

Transfection
LGI1

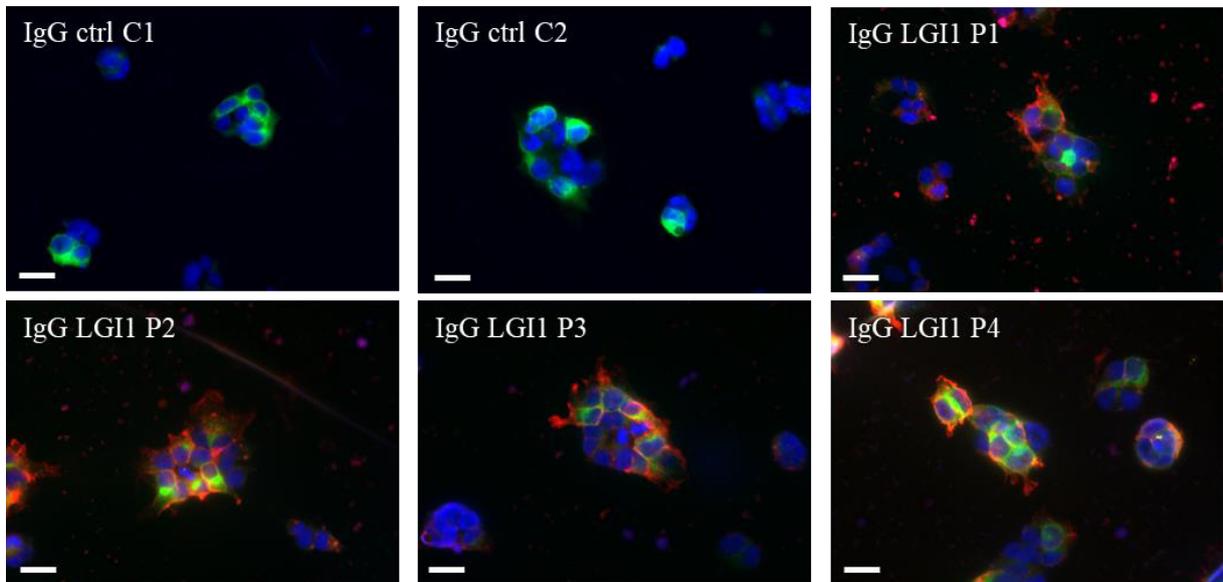


Figure 5.1. Les ac anti-LGI1 sont présents dans les IgG purifiées à partir des sérums de patients atteints d'EL LGI1. Le noyau des cellules HEK293T est marqué au DAPI (bleu). Les cellules HEK293T sont transfectées avec le plasmide LGI1-GFP (vert) et le plasmide ADAM22. Les IgG humaines (rouge) purifiées à partir du sérum de patients atteints d'EL LGI1 P1, P2, P3 et P4 sont colocalisées avec la protéine LGI1-GFP. Aucun marquage d'IgG humaines provenant des IgG purifiées à partir des sérums contrôle C1 et C2 n'est observé. Barre d'échelle = 20 μ m.

Transfection
Caspr2

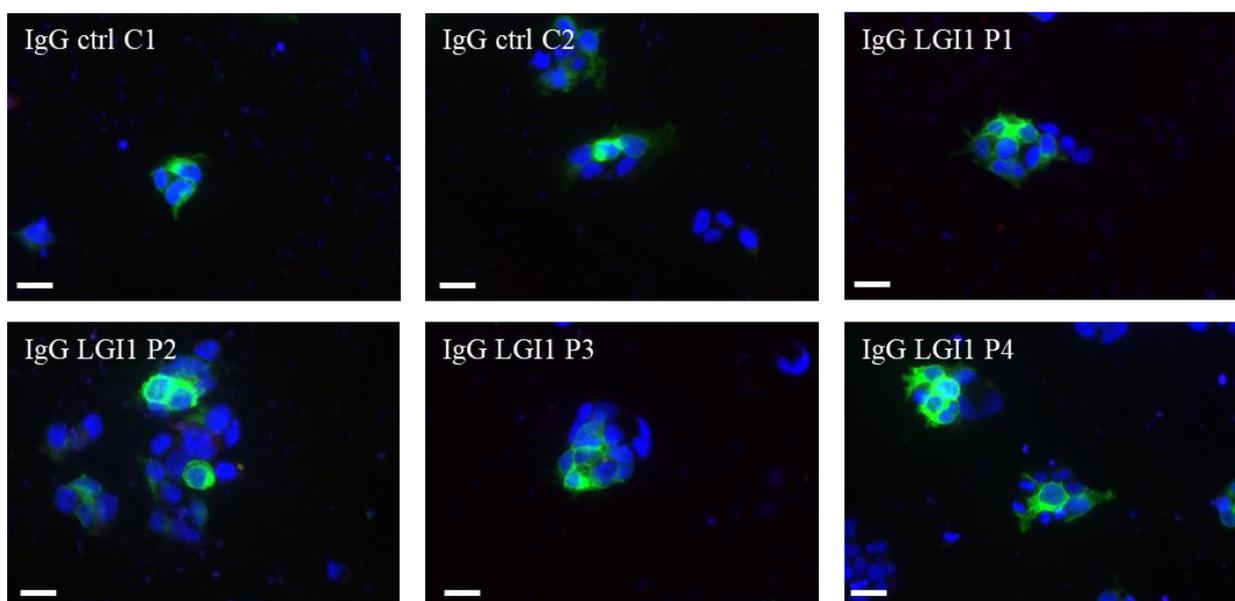


Figure 5.2. Les IgG purifiées à partir des sérums ne contiennent pas d'ac anti-Caspr2. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide Caspr2-GFP (vert). Aucun marquage des IgG humaines purifiées n'est observé à la surface des cellules. Barre d'échelle = 20 μm .

2) Détermination de la concentration d'utilisation des IgG purifiées.

Afin de déterminer les concentrations d'utilisation des IgG purifiées, nous avons réalisé des immunomarquages fluorescents des IgG humaines sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe.

Pour les études réalisées à partir du modèle de souris infusées dans le parenchyme avec les IgG purifiées, nous avons infusé une concentration d'IgG purifiées proche de celle retrouvée dans le LCR des patients. Pour déterminer cette concentration, nous avons comparé l'intensité de marquage entre différentes concentrations d'IgG purifiées à partir du sérum des patients et le LCR des patients dilué au 1:10^{ème}. La concentration finale correspondante a été fixée à 60 $\mu\text{g/ml}$.

Dans les études réalisées à partir du modèle de cultures primaires de neurones d'hippocampe, les IgG sont incubées directement dans le milieu de culture sans besoin de diffuser à travers les tissus. Nous avons donc utilisé une concentration d'IgG purifiées plus faible que le modèle de souris infusées. Pour cela, nous avons utilisé la plus petite concentration pour laquelle nous observons un immunomarquage des IgG LGI1 sur les neurones en culture, correspondant à 20 $\mu\text{g/ml}$ (figure 5.3). A cette concentration, nous observons que les IgG LGI1 des 4 patients P1-4 marquent spécifiquement les neurones en culture le long des prolongements. Les IgG ctrl C1 et C2 ne marquent pas spécifiquement les prolongements neuronaux (figure 5.3).

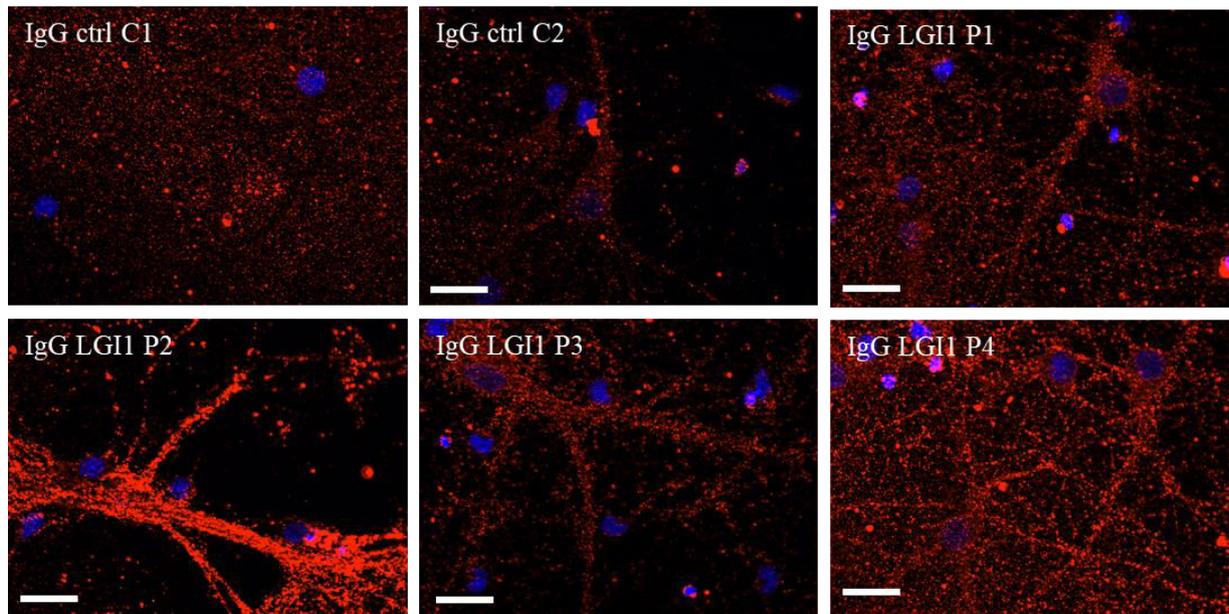


Figure 5.3. Les IgG purifiées des sérums des patients à EL marquent les neurones dans des cultures primaires de neurones. Les cultures primaires de neurones d'hippocampe ont été incubées avec les IgG ctrl ou LGI1 à 20 $\mu\text{g/ml}$. Les IgG humaines (rouge) ctrl C1 et C2 ne marquent pas les prolongements des neurones. Les IgG LGI1 P1-4 marquent spécifiquement les prolongements des neurones à des intensités variables. Barre d'échelle = 20 μm

Partie II : Fonctionnement du réseau neuronal en présence IgG LGI1

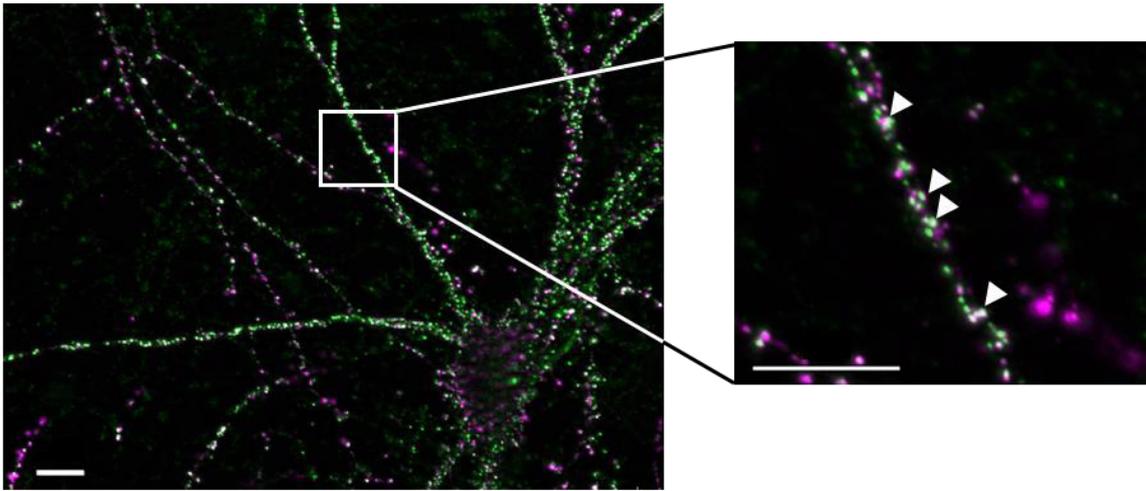
1) Quel est l'effet des IgG LG1 sur le réseau neuronal dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe ?

- a) L'expression des R-AMPA sur les neurones *in vitro* est-elle modulée par les IgG LGI1 ?

Afin d'étudier l'effet des IgG LGI1 sur l'expression des R-AMPA à la surface des synapses excitatrices, nous avons réalisé des immunomarquages des sous-unités GluA1 des R-AMPA et des protéines PSD95, les protéines d'échafaudage des synapses excitatrices, dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe.

Nos résultats montrent que les IgG LGI1 ont des effets différents sur l'expression des sous-unités GluA1 synaptiques. Nous avons observé que les IgG LGI1 provenant du sérum de deux patients (P1 et P2) diminuent l'intensité des clusters des sous-unités GluA1 par rapport aux IgG ctrl, alors que les IgG LGI1 du sérum des deux autres patients (P3 et P4) n'ont pas d'effet par rapport aux IgG ctrl (figure 5.4 B). De manière globale, l'ensemble de ces résultats signifie que les IgG LGI1 diminuent l'expression des R-AMPA sur l'ensemble des synapses excitatrices localisées sur les neurones excitateurs et inhibiteurs *in vitro*.

A



B

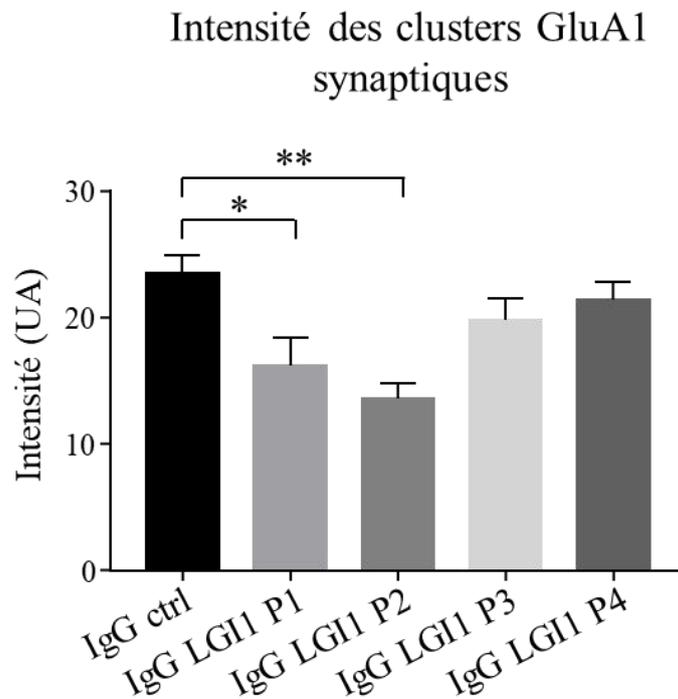


Figure 5.4. Les IgG LGI1 diminuent l'expression synaptique des R-AMPA *in vitro*. Immunomarquages des sous-unités GluA1 (violet) et des protéines PSD95 (en vert) (flèches blanches) dans des cultures neuronales. Images prises en microscopie à fluorescence (objectif x100), barre d'échelle = 10 μ m (A). Les IgG LGI1 P1 et P2 diminuent l'intensité des clusters des sous-unités GluA1 synaptiques par rapport aux IgG ctrl (ANOVA 1 facteur ** $p=0,004$, test *post-Hoc* de Dunnett IgG ctrl-LGI1 P1 * $p=0,04$, IgG ctrl-LGI1 P2 ** $p=0,003$). Les IgG LGI1 P3 et P4 n'ont pas d'effet sur l'intensité des clusters des sous-unités GluA1 synaptiques par rapport aux IgG ctrl (ANOVA 1 facteur et test *post-Hoc* de Dunnett IgG ctrl-LGI1 P3 $p=0,13$, IgG ctrl-LGI1 P4 $p=0,42$) (B). Les données représentent la moyenne \pm SEM ($n_{ctrl}=130$; $n_{P1}=33$; $n_{P2}=32$; $n_{P3}=69$; $n_{P4}=72$ neurones).

b) Les IgG LGI1 modulent-elles l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs *in vitro* ?

Une atteinte du réseau inhibiteur pourrait expliquer la génération de crises d'épilepsie lors d'un dysfonctionnement de la protéine LGI1. Nous avons étudié l'effet des IgG LGI1 sur l'expression synaptique des R-AMPA spécifiquement à la surface des neurones inhibiteurs. Pour cela, nous avons réalisé des immunomarquages des sous-unités GluA1 des R-AMPA et des protéines PSD95, dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe dont les neurones inhibiteurs GAD65 expriment la protéine fluorescente td-tomato. Par microscopie super-résolution « *stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)* », nous avons quantifié spécifiquement le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des neurones inhibiteurs.

Nous avons quantifié la densité des clusters des sous-unités GluA1 localisées dans un cluster de protéines PSD95. Nos résultats montrent que les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité de clusters des sous-unités GluA1 synaptiques par rapport aux IgG ctrl (figure 5.5 B). Nous avons ensuite quantifié le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur des clusters des sous-unités GluA1 synaptiques. Nos résultats montrent que les IgG LGI1 augmentent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées dans les clusters GluA1 synaptiques par rapport aux IgG ctrl (figure 5.5 C).

L'ensemble de nos résultats signifie que les IgG LGI1 augmentent l'expression synaptique des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs contrairement à ce que nous avons précédemment observé sur l'ensemble des neurones en culture.

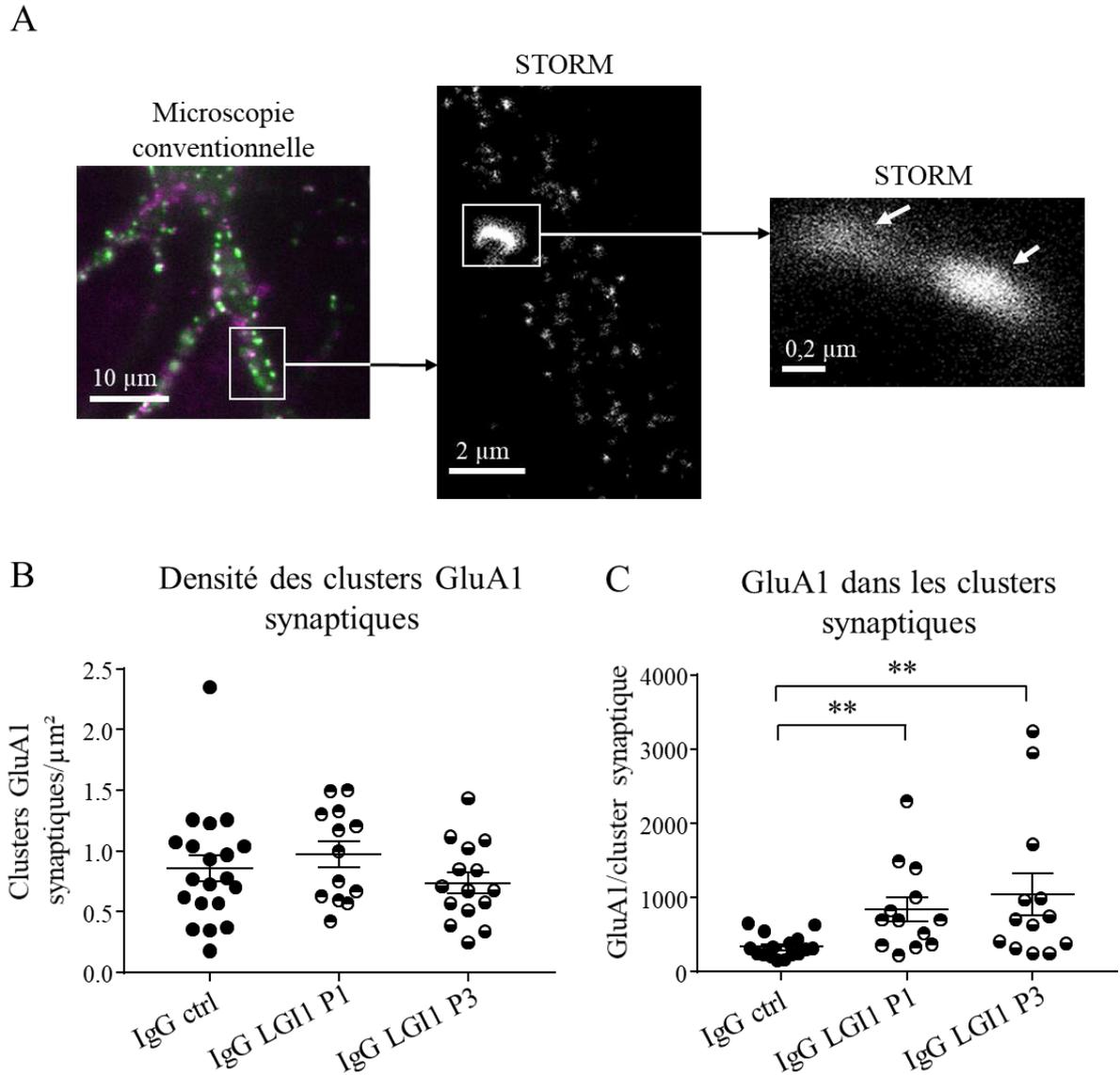


Figure 5.5. Les IgG LGI1 augmentent l'expression synaptique des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs. Immunomarquages des protéines PSD95 (vert) et des clusters des sous-unités GluA1 (violet) (flèches blanches sur l'image STORM) à la surface d'un neurone inhibiteur dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Images prises en microscopie conventionnelle (à gauche, objectif x100) ou en microscopie STORM (au milieu et à droite). (A). Les IgG LGI1 ne modifient pas le nombre de clusters des sous-unités GluA1 synaptiques exprimés sur les neurones inhibiteurs par rapport aux IgG ctrl (test Kruskal-Wallis $p=0,36$) (B). Les IgG LGI1 augmentent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées dans un cluster GluA1 synaptique à la surface des neurones inhibiteurs par rapport aux IgG ctrl (test Kruskal-Wallis $***p=0,001$, test *post Hoc* de Dunn IgG ctrl-LGI1 P1 : $**p=0,004$, IgG ctrl-LGI1 P3 $**p=0,004$) (C). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{Ctrl}=21$; $n_{P1}=13$; $n_{P2}=15$ neurones).

c) Les IgG LGI1 induisent-elle une modification fonctionnelle sur l'excitabilité du réseau neuronal *in vitro* ?

Nous avons observé que les IgG LGI1 modulent l'expression synaptique des R-AMPA à la surface des neurones dans le modèle *in vitro*. Nous avons ensuite étudié si les IgG LGI1 ont des effets fonctionnels sur l'activité spontanée du réseau neuronal. Pour cela, nous avons enregistré les courants post-synaptiques excitateurs spontanés (sCPSE) par patch-clamp en configuration cellule-entière, sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Nous avons analysé l'amplitude et la fréquence des sCPSE. Nos résultats montrent que les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'amplitude ni sur la fréquence des sCPSE par rapport aux IgG ctrl (figure 5.6). Ces résultats signifient que les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'activité basale du réseau excitateur dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Ainsi, l'effet des IgG LGI1 sur l'expression synaptique des R-AMPA ne se traduit pas par un effet fonctionnel sur l'activité du réseau neuronal.

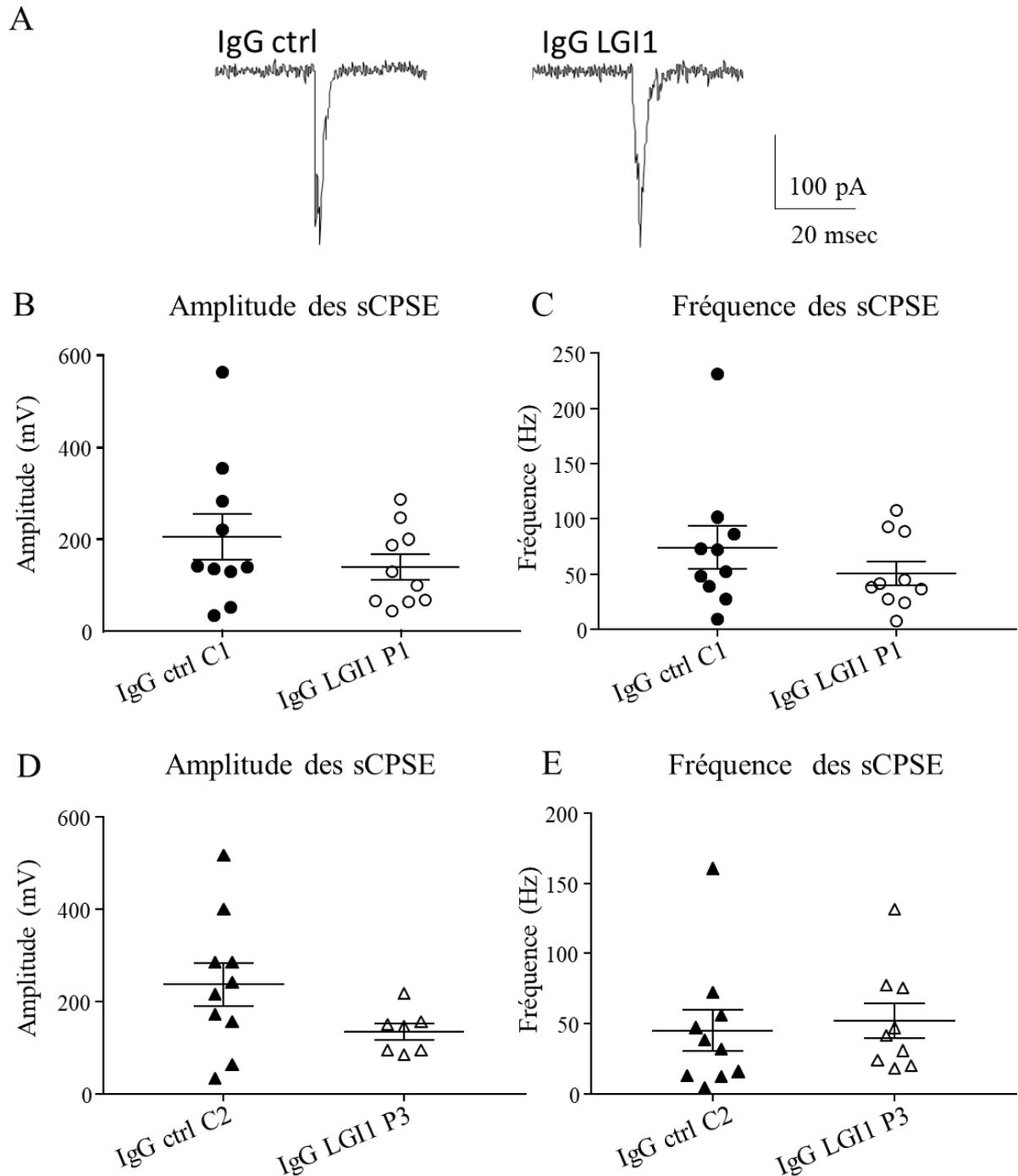


Figure 5.6. Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur les sCPSE dans des cultures primaires de neurones. Les IgG LGI1 P1 n'ont pas d'effet sur l'amplitude (test de Mann-Whitney, $p=0,44$) (A) ou la fréquence (test de Mann-Whitney, $p=0,36$) (B) des sCPSE par rapport aux IgG ctrl C1. Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur l'amplitude (test de Mann-Whitney, $p=0,55$) ou la fréquence (test de Mann-Whitney, $p=0,14$) des sCPSE par rapport aux IgG ctrl C2 (C-D). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C1}= 10$, $n_{P1}= 10$, $n_{C2}= 12$, $n_{P2}= 12$ neurones).

Pour conclure sur la partie 1), les effets des IgG LGI1 sont hétérogènes. Dans cette section, nous avons présenté les résultats les plus pertinents dans notre étude. D'autres résultats ont été obtenus mais leur hétérogénéité et la forte variabilité ne nous permettaient pas de conclure de façon claire. Alors que certaines IgG LGI1 ont des effets sur l'expression des R-AMPA, d'autres IgG LGI1 n'ont pas d'effet. De plus, au cours de notre étude, nous avons observé une grande variabilité entre les cultures neuronales. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'étudier l'effet des IgG LGI1 dans un modèle *ex vivo* à partir de tranches d'hippocampe de souris infusées avec les IgG LGI1 ou les IgG ctrl.

2) Les IgG LGI1 modulent-elles l'expression des R-AMPA dans l'hippocampe de souris ?

En raison du manque d'effet fonctionnel des IgG LGI1 dans les cultures neuronales, nous avons étudié l'effet des IgG LGI1 dans un modèle *ex-vivo*. Nous avons réalisé des immunomarquages des sous-unités GluA1 des R-AMPA dans des tranches d'hippocampe provenant de souris infusées avec les IgG LGI1 P3 ou les IgG ctrl C2. Des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente td-tomato ont été utilisées afin de distinguer les neurones inhibiteurs et les neurones excitateurs. La microscopie super-résolution STORM nous a permis de quantifier spécifiquement le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des neurones. Des contraintes techniques ne nous ont pas permis de réaliser un immun marquage des protéines PSD95 afin d'analyser l'expression synaptique des sous-unités GluA1 des R-AMPA.

a) Les IgG LGI1 ont-elles un effet sur l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs ?

Nous avons analysé l'expression des sous-unités GluA1 des R-AMPA à la surface des prolongements des neurones inhibiteurs exprimant la protéine td-tomato (GAD+) dans 3 régions de l'hippocampe : la couche moléculaire du GD, et les couches *stratum radiatum* et

stratum lacunosum moleculare des régions CA1 et CA3. Dans le GD, nos résultats montrent que les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité ou sur la taille des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl (figure 5.7 B-C). En revanche, les IgG LGI1 réduisent la densité totale de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des neurones inhibiteurs du GD par rapport aux IgG ctrl (figure 5.7 D). De plus, dans le GD, les IgG LGI1 réduisent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster à la surface des neurones inhibiteurs par rapport aux IgG ctrl (figure 5.7 E).

Dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, nos résultats montrent que les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité ou sur la taille des clusters des sous-unités GluA1 par rapport aux IgG ctrl exprimés à la surface des neurones inhibiteurs (figure 5.8 B-C, figure 5.9 B-C). De plus, les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité totale de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des neurones inhibiteurs, ni sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster par rapport aux IgG ctrl, dans les régions CA3 (figure 5.8 D-E) et CA1 (figure 5.9 D-E).

L'ensemble de nos résultats signifie que les IgG LGI1 diminuent l'expression des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs par rapport aux IgG ctrl uniquement dans le GD. Nos résultats suggèrent que l'action des IgG LGI1 n'est pas homogène dans l'hippocampe et cible principalement la région du GD.

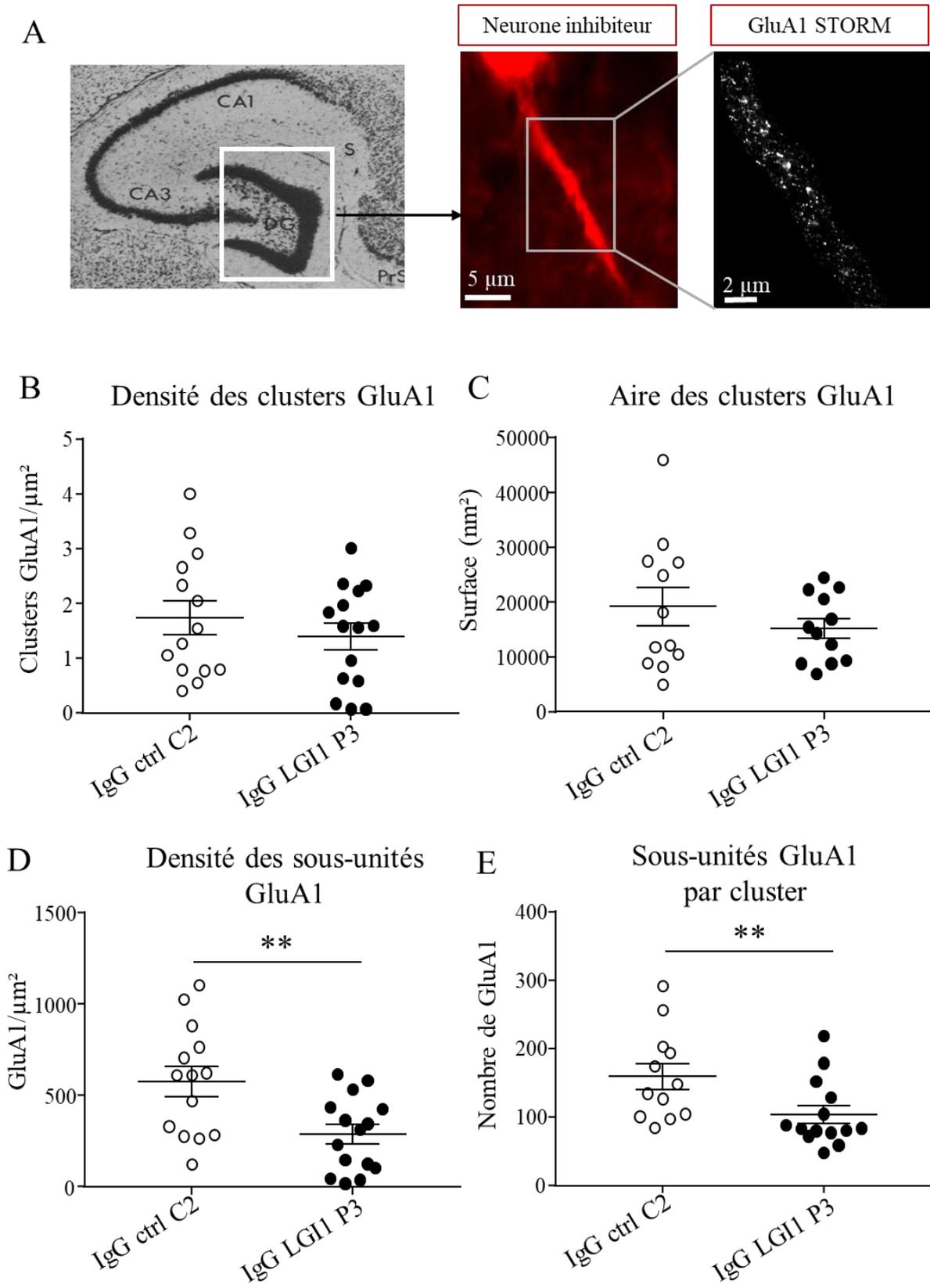


Figure 5.7. Les IgG LGI1 réduisent l'expression des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs du GD. Image STORM de l'expression des sous-unités GluA1 (à droite) dans le GD de l'hippocampe à la surface d'un neurone inhibiteur GAD⁺ (au milieu, microscopie conventionnelle, objectif x100) (image de l'hippocampe adaptée de Amaral and Witter, 1989)

(A). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la densité des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $p=0,38$) (B) Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la taille des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des neurones GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney $p=0,51$) (C). Les IgG LGI1 P3 diminuent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées sur les neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $**p=0,0053$) (D). Les IgG LGI1 P3 diminuent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster GluA1 sur les neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney, $**p=0,0091$) (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C2}=4$, $n_{P3}= 3$ souris).

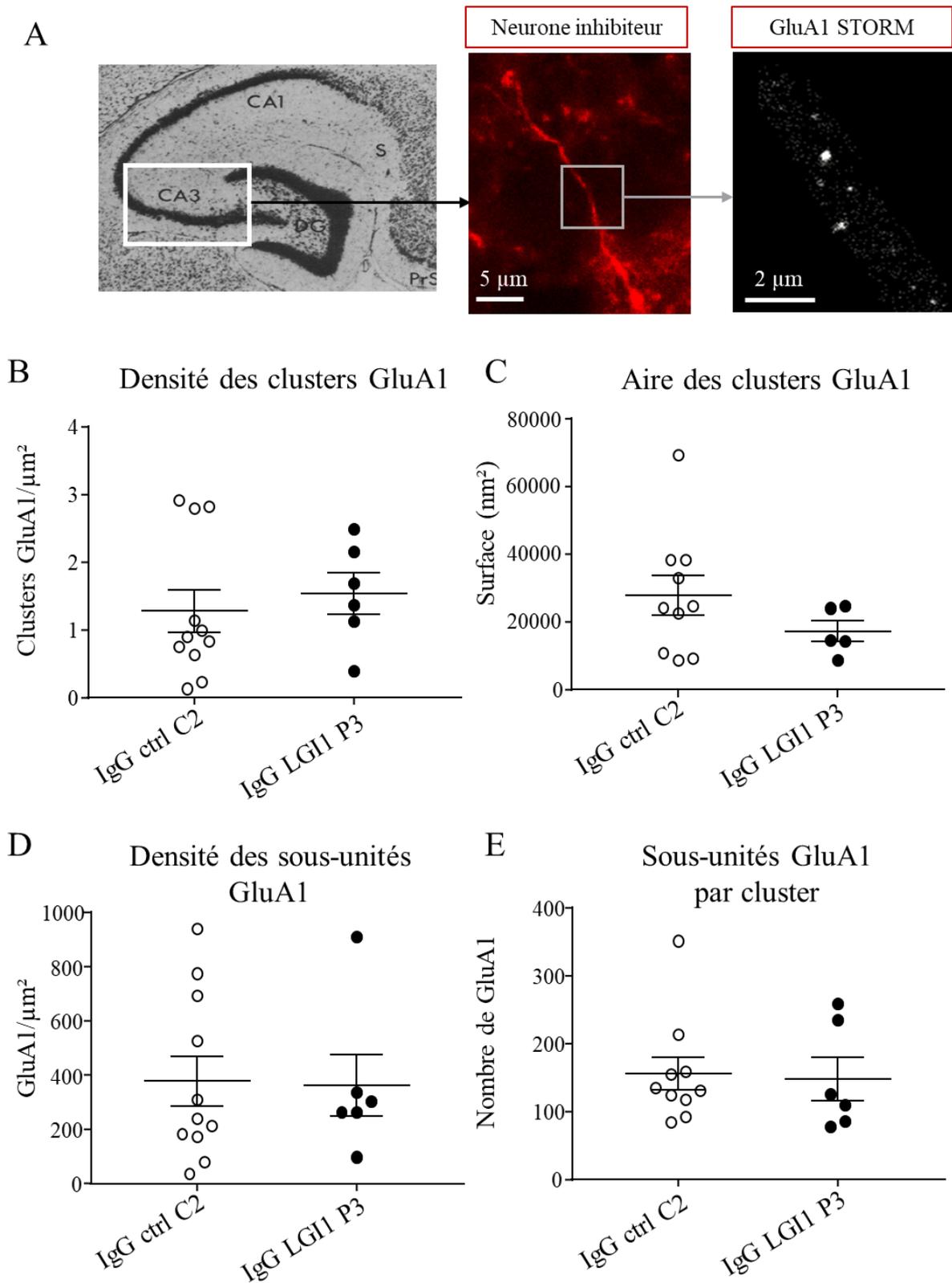


Figure 5.8. Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs de la région CA3. Image STORM de l'expression des sous-unités GluA1 (à droite) dans le GD de l'hippocampe à la surface d'un neurone inhibiteur GAD⁺ (au milieu, microscopie conventionnelle, objectif x100) (image de l'hippocampe adaptée de Amaral and Witter, 1989) (A). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la densité (test t-Student, $p=0,61$) (B) ou la taille

des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney, $p=0,31$) (C). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney, $p=0,73$) (D). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster (test de Mann-Whitney, $p=0,63$) par rapport aux IgG ctrl C2 (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C2}=4$, $n_{P3}= 3$ souris).

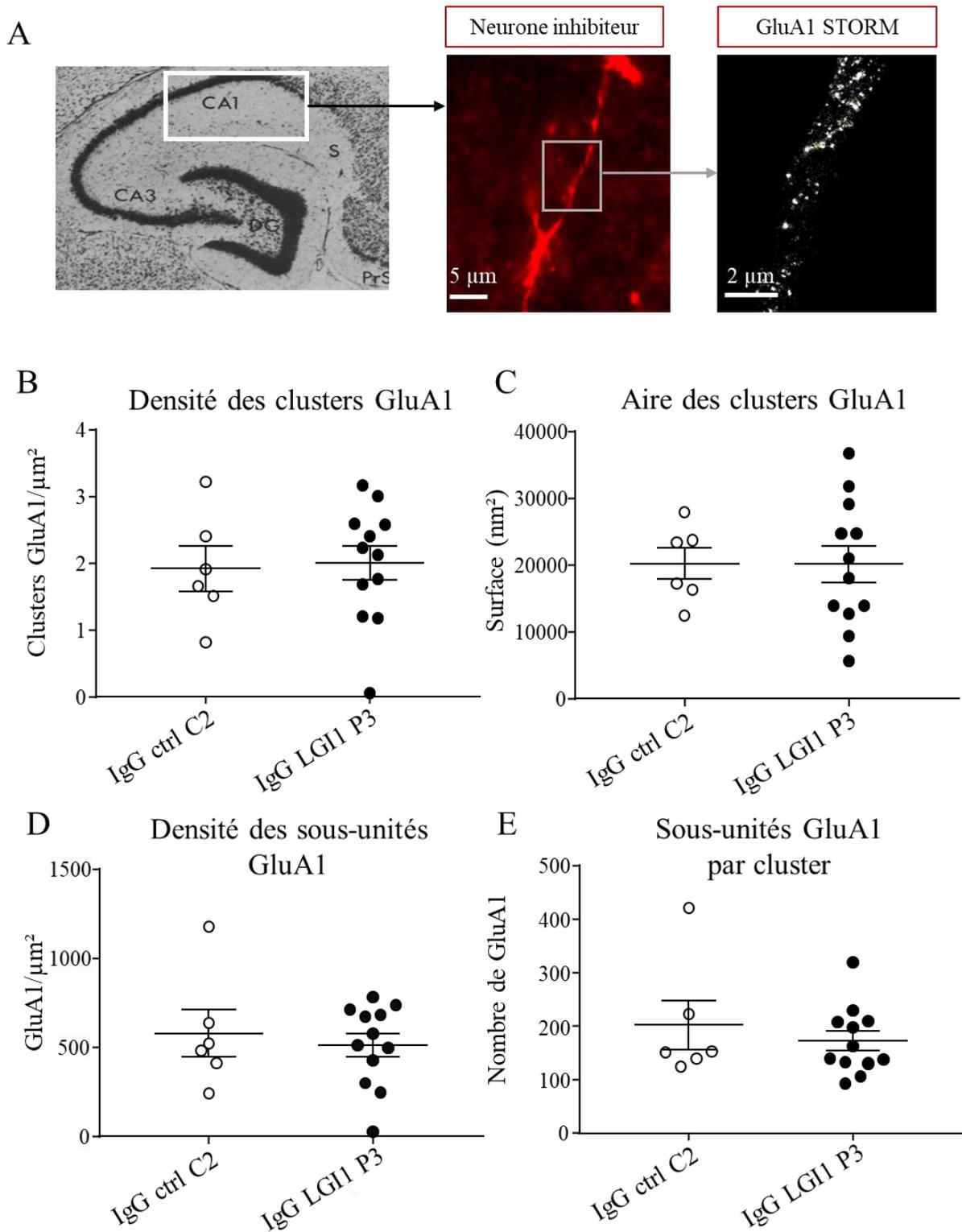


Figure 5.9. Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs dans la région CA1. Image STORM de l'expression des sous-unités GluA1 (à droite) dans le GD de l'hippocampe à la surface d'un neurone inhibiteur GAD⁺ (au milieu, microscopie conventionnelle, objectif x100) (image de l'hippocampe adaptée de Amaral and Witter, 1989) (A). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la densité (test t-Student, $p=0,85$) ou sur la taille (test t-Student, $p=0,99$) des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface

des neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (B-C). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées sur les neurones inhibiteurs GAD+ par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $p=0,62$) (D). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster par rapport aux IgG ctrl C2 (test Mann-Whitney, $p=0,68$) (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C2}=4$, $n_{P3}= 3$ souris).

b) Les IgG LGI1 ont-elles des effets sur l'expression des R-AMPA sur les neurones excitateurs ?

Nous avons étudié l'expression des sous-unités GluA1 des R-AMPA sur les neurones excitateurs dans l'hippocampe de souris Gad-RT. Pour cela, notre analyse a été réalisée dans une région où l'expression de la protéine td-tomato n'a pas été détectée (GAD-), en estimant que cette région GAD- représente majoritairement l'expression des sous-unités GluA1 à la surface des neurones excitateurs.

Nos résultats montrent que dans le GD, les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité ni sur la taille des clusters des sous-unités GluA1 des R-AMPA par rapport aux IgG ctrl, à la surface des cellules GAD- (figure 5.10 B-C). Les IgG LGI1 diminuent la densité totale de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl (figure 5.10 D). De plus, les IgG LGI1 diminuent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur des clusters GluA1 par rapport aux IgG ctrl, sur les cellules GAD- (figure 5.10 E). Dans les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe, nos résultats montrent que les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité ou sur la taille des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl (figure 5.11 B-C et 5.12 B-C). D'autre part, les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la densité totale de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des cellules GAD-, ni sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur des clusters GluA1 à la surface des cellules GAD-, par rapport aux IgG ctrl dans les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe (figure 5.11 D-E et 5.12 D-E).

Ces résultats signifient que les IgG LGI1 réduisent l'expression des R-AMPA exprimés à la surface des neurones excitateurs du GD par rapport aux IgG ctrl. En revanche, les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur les neurones excitateurs des régions CA3 et CA1 par rapport aux IgG ctrl. L'ensemble de nos résultats obtenus par microscopie super-résolution STORM signifie que la perturbation de la fonction de la protéine LGI1 réduit l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs et excitateurs dans le GD de l'hippocampe.

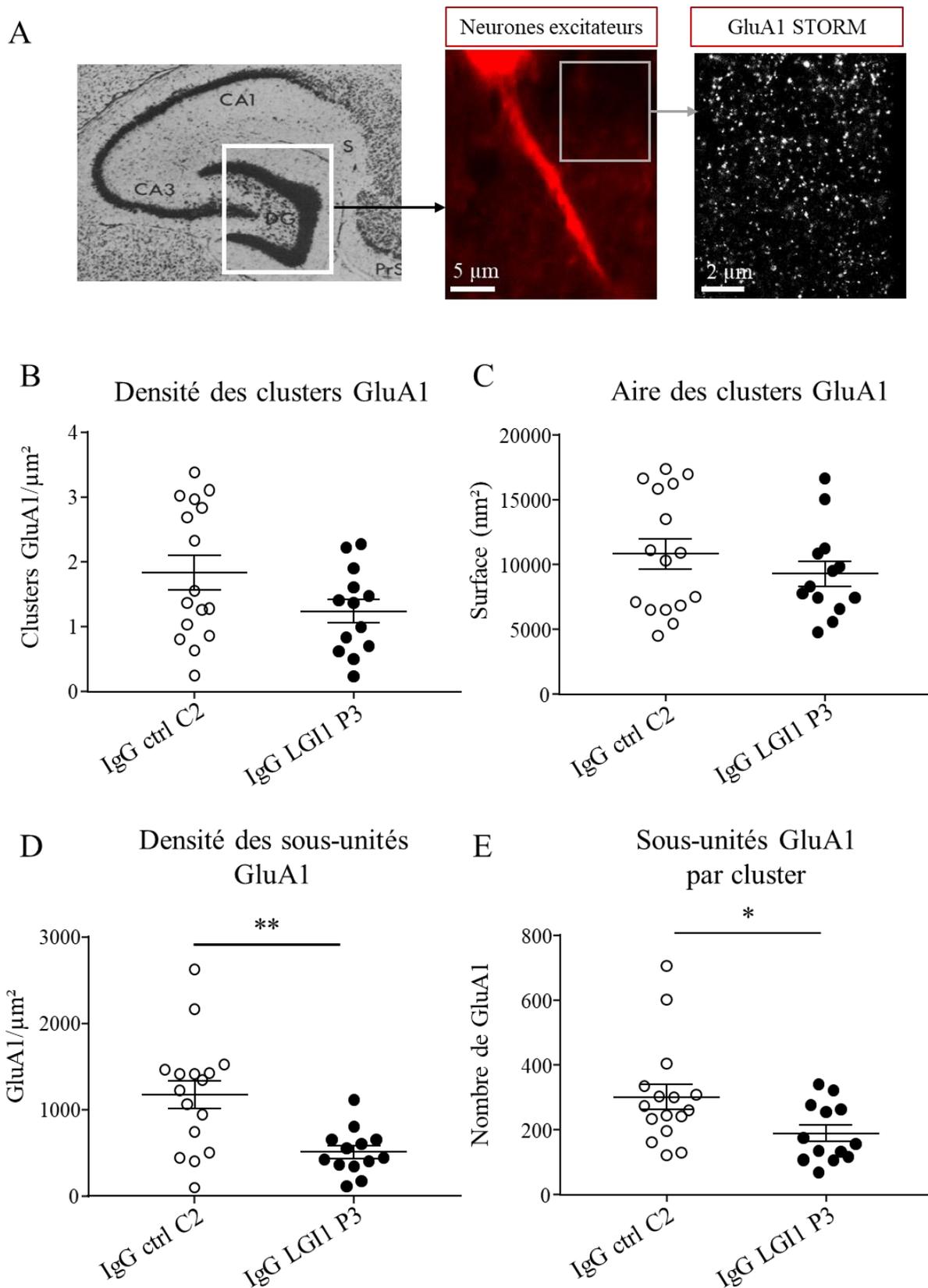


Figure 5.10. Les IgG LGI1 diminuent l'expression des R-AMPA sur les neurones excitateurs dans le GD. Image STORM de l'expression des sous-unités GluA1 (à droite), à la surface des neurones excitateurs GAD- (au milieu) (image réalisée en microscopie conventionnelle, objectif x100) dans la région du GD de l'hippocampe (image de l'hippocampe

adaptée de Amaral and Witter, 1989) (A). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la densité (test de Mann-Whitney $p=0,15$) ni sur la taille (test Mann-Whitney, $p=0,53$) des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des cellules GAD- dans le GD par rapport aux IgG ctrl C2 (B-C). Les IgG LGI1 P3 diminuent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 dans le GD (test Mann-Whitney, $**p=0,003$) (D). Les IgG LGI1 P3 diminuent le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster GluA1 par rapport aux IgG ctrl C2 à la surface des cellules GAD- (test-t-Student, $*p=0,031$) (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C2}=4$, $n_{P3}= 3$ souris).

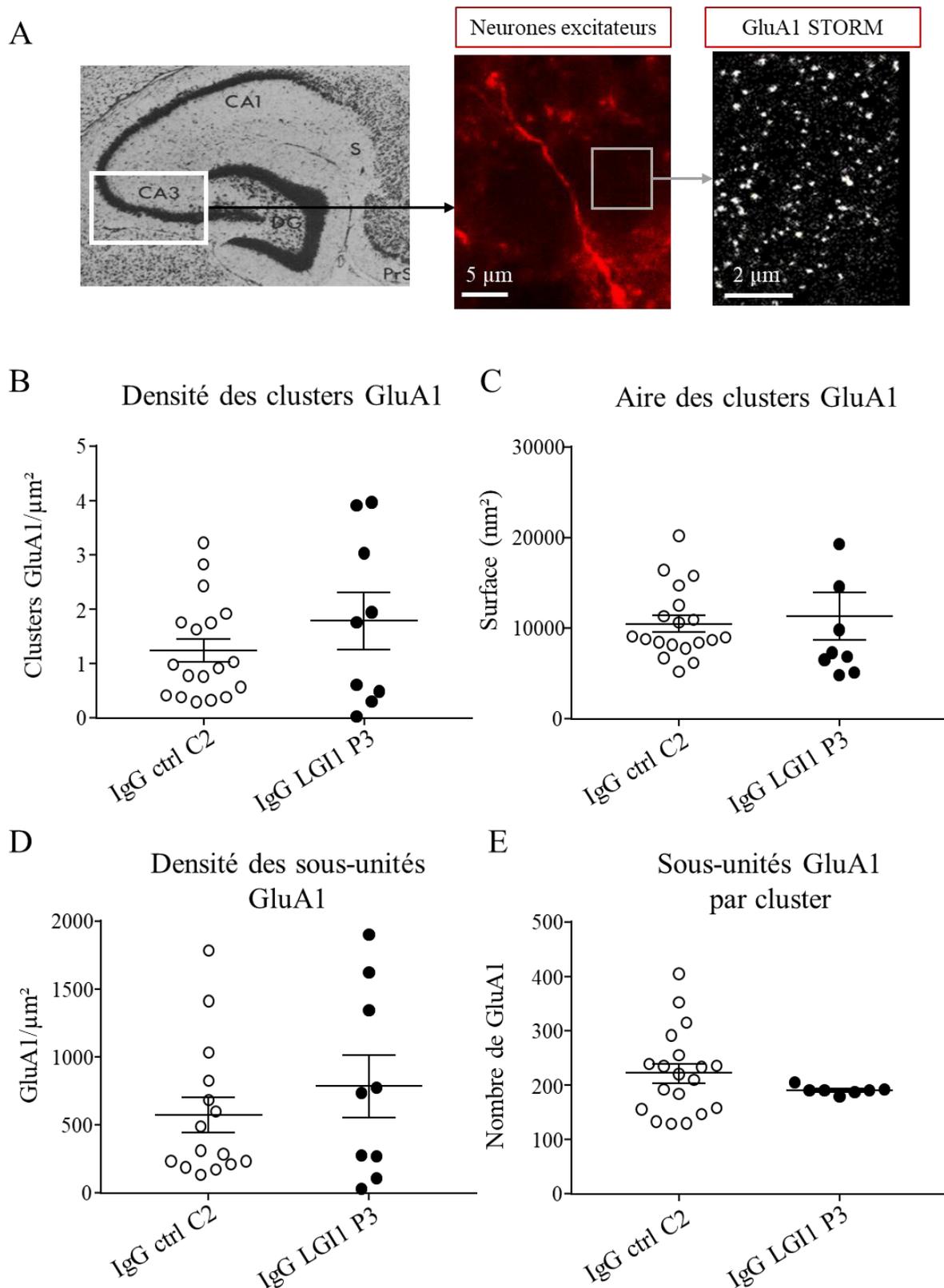


Figure 5.11. Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'expression des R-AMPA à la surface des neurones excitateurs de la région CA3. Image STORM de l'expression des sous-unités GluA1 (à droite), à la surface des neurones excitateurs GAD- (au milieu) (image réalisée en microscopie conventionnelle, objectif x100) dans la région du GD de l'hippocampe (image de

l'hippocampe adaptée de Amaral and Witter, 1989) (A). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la densité (test de Mann-Whitney, $p=0,53$) ni sur la taille (test de Mann-Whitney, $p=0,50$) des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 (B-C). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney, $p=0,64$) (D). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster GluA1 sur les cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney, $p=0,33$) (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C2}=4$, $n_{P3}= 3$ souris).

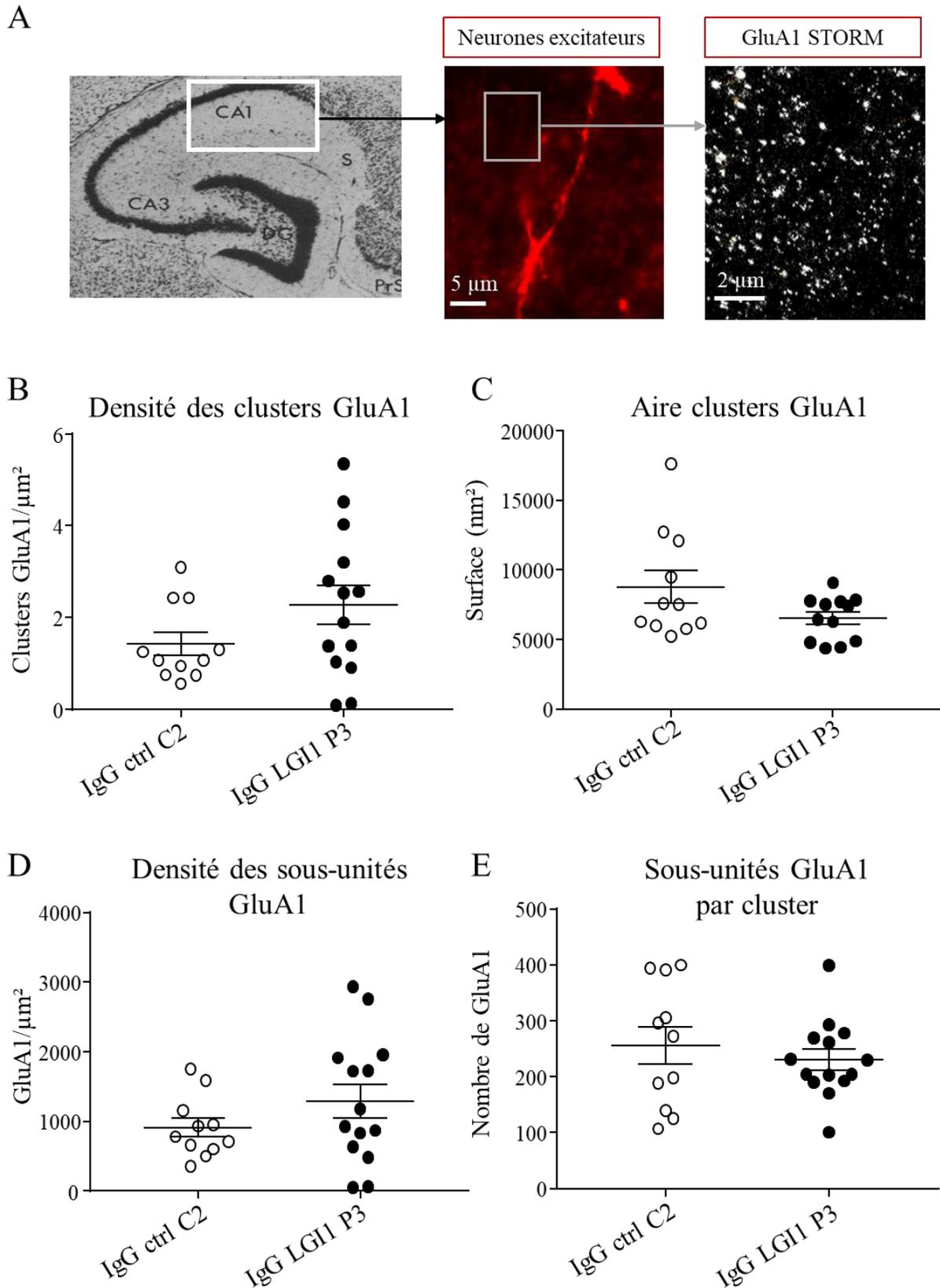


Figure 5.12. Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'expression des R-AMPA sur les neurones excitateurs dans la région CA1. Image STORM de l'expression des sous-unités GluA1 (à droite), à la surface des neurones excitateurs GAD- (au milieu) (image réalisée en microscopie conventionnelle, objectif x100) dans la région du GD de l'hippocampe (image de l'hippocampe

adaptée de Amaral and Witter, 1989) (A). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur la densité (test de Mann-Whitney, $p=0,13$) ni sur la taille (test de Mann-Whitney, $p=0,26$) des clusters des sous-unités GluA1 exprimés à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 (B-C). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à la surface des cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $p=0,22$) (D). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur le nombre de sous-unités GluA1 exprimées à l'intérieur d'un cluster GluA1 sur les cellules GAD- par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $p=0,49$) (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C2}=4$, $n_{P3}= 3$ souris).

3) Quel est l'effet des IgG sur la régulation de l'activité du réseau neuronal dans l'hippocampe ?

a) Les IgG LGI1 ont-elles un effet sur l'excitabilité neuronale dans l'hippocampe ?

i. *L'hyperexcitabilité dans l'hippocampe est-elle modulée par les IgG LGI1 ?*

Nous avons étudié l'effet des IgG LGI1 sur la régulation de l'excitabilité neuronale, par électrophysiologie. Nous avons enregistré les potentiels de champs locaux (PCL) dans la région CA1 de tranches aiguës d'hippocampe de souris infusées avec les IgG LGI1 ou les IgG ctrl.

En condition basale, nous n'avons pas observé d'activité épileptique dans les tranches d'hippocampe des souris infusées avec les IgG LGI1 ou les IgG ctrl. Nous avons donc ajouté de la 4-aminopyridine (4-AP) ($40\mu\text{M}$), un antagoniste des canaux potassiques voltage-dépendants, afin d'induire une hyperexcitabilité du réseau neuronal. Dans ces conditions, nous avons observé des décharges de type ictales qui correspondent à une activité synchrone du réseau neuronal.

Nos résultats indiquent que les IgG LGI1 de deux patients (P1 et P3) augmentent l'hyperexcitabilité du réseau neuronal, alors les IgG LGI1 de deux autres patients (P2 et P4) n'ont pas d'effet sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal par rapport aux IgG ctrl (figure 5.13).

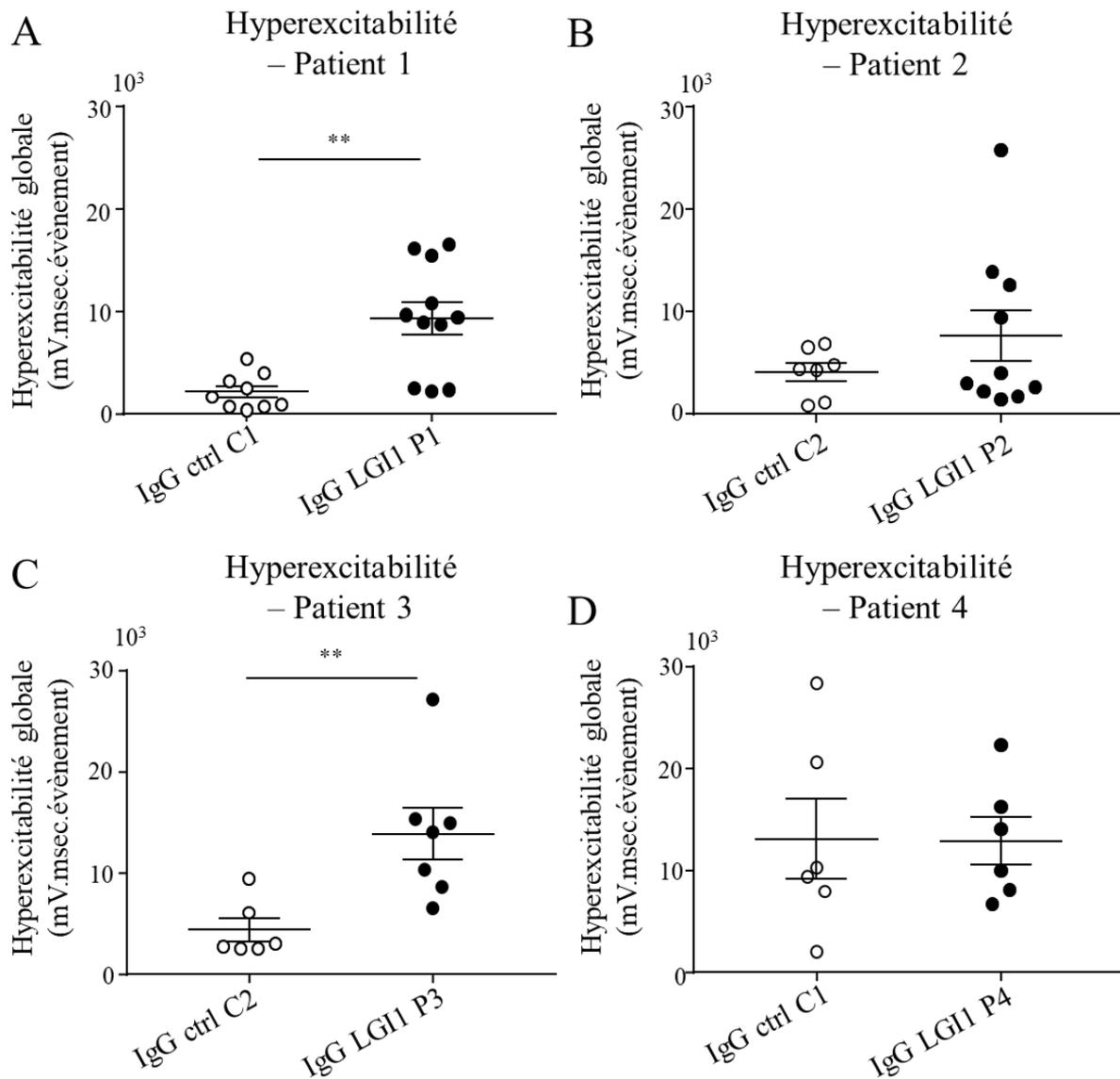


Figure 5.13. Les IgG LGI1 augmentent l'hyperexcitabilité globale du réseau neuronal dans l'hippocampe. L'hyperexcitabilité globale du réseau neuronal hippocampique est augmentée après une infusion des IgG LGI1 P1 par rapport aux IgG ctrl C1 (test t-Student, $**p=0,0011$, $n_{C1}=9$; $n_{P1}=11$ souris) (A) et des IgG LGI1 P3 par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $**p=0,0087$, $n_{C2}=6$; $n_{P3}=7$ souris) (C). L'hyperexcitabilité globale n'est pas modifiée par l'infusion des IgG LGI1 P2 par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney, $p=0,67$; $n_{C2}=8$; $n_{P2}=10$ souris) (B) ou des IgG LGI1 P4 par rapport aux IgG ctrl C1 (test t-Student, $p=0,96$; $n_{C1}=6$; $n_{P4}=6$ souris) (D). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM.

ii. *Comment l'hyperexcitabilité du réseau neuronal est-elle modulée par les IgG LGI1 ?*

Nous avons mis en évidence que les IgG LGI1 augmentent l'hyperexcitabilité neuronale dans l'hippocampe de souris par rapport aux IgG ctrl. Nous avons étudié plus précisément, les effets des IgG LGI1 P1 sur l'excitabilité du réseau neuronal sur des tranches aiguës d'hippocampe de souris.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des IgG LGI1 P1 sur la transmission basale. Pour cela, nous avons stimulé les collatérales de Schaffer par des stimulations d'intensité croissante, et nous avons analysé la pente des réponses évoquées dans la région CA1. Nous n'avons pas observé d'effet sur la courbe « d'entrée-sortie » ou « Input-Output (IO) » après une infusion avec les IgG LGI1 par rapport aux IgG ctrl (figure 5.14 A). Ces résultats signifient que les IgG LGI1 P1 ne modifient pas la transmission basale dans la région CA1 de l'hippocampe.

Dans un second temps, nous avons étudié plus spécifiquement l'effet des IgG LGI1 P1 sur l'hyperexcitabilité induite par la 4-AP (40 μ M). Nous avons analysé l'aire et la fréquence des ictus. Nos résultats montrent que les IgG LGI1 augmentent l'aire des ictus par rapport aux IgG ctrl (figure 5.14 C). Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur la fréquence des ictus par rapport aux IgG ctrl (figure 5.14 D). Nos résultats suggèrent que les IgG LGI1 P1 agissent sur un mécanisme impliqué dans le contrôle du réseau neuronal lors du déclenchement d'une hyperexcitabilité neuronale.

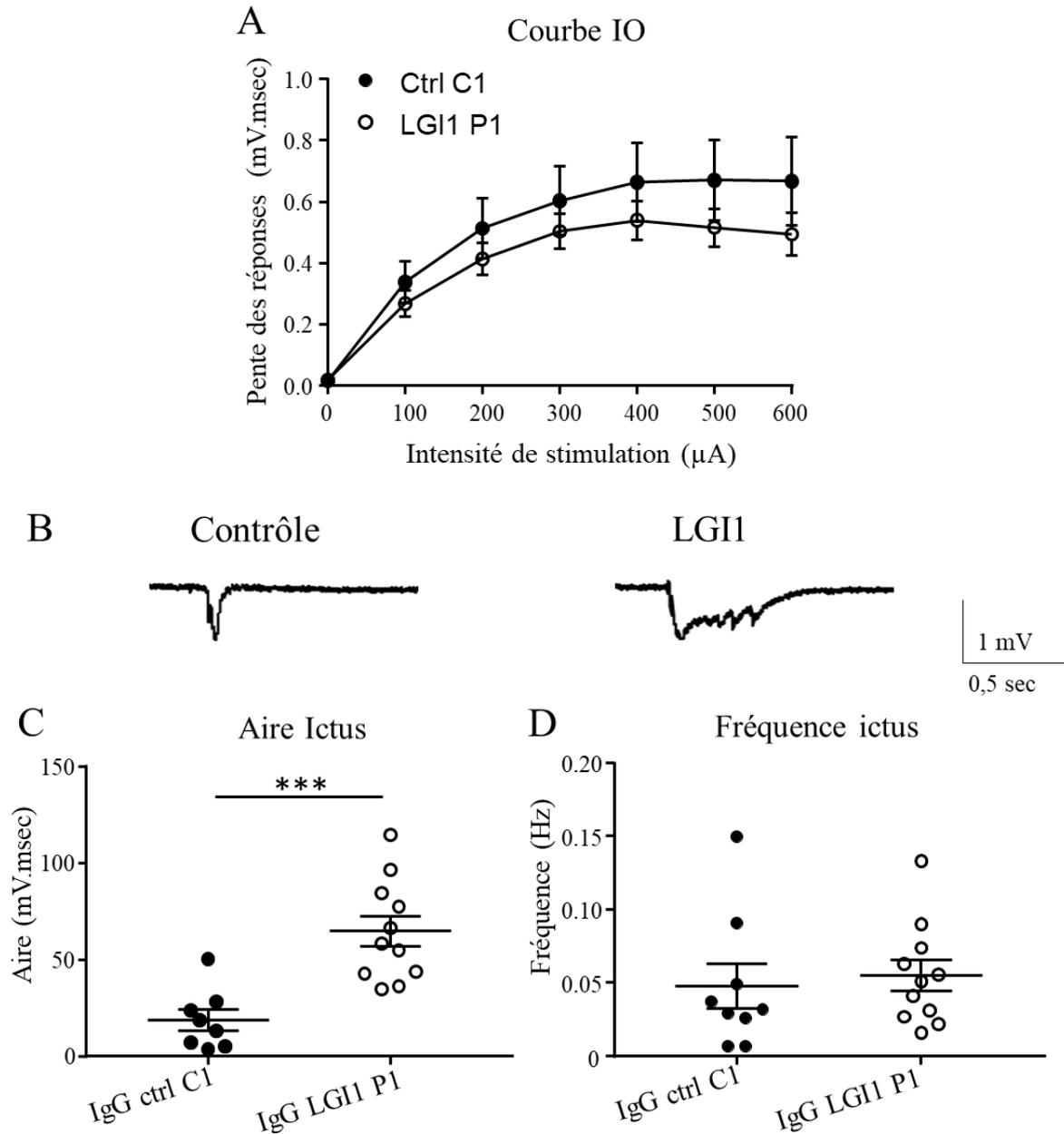


Figure 5.14. Les IgG LGI1 augmentent l'aire des ictus dans l'hippocampe. Des stimulations d'intensité croissante ont été délivrées dans les collatérales de Schaeffer et la pente des réponses évoquées dans la région CA1 a été analysée. Les IgG LGI1 P1 n'ont pas d'effet sur la courbe IO par rapport aux IgG ctrl C1 (test de Mann-Whitney, 400µA : $p=0,53$; 500µA : $p=0,68$; 600µA : $p=0,52$) (A). Exemple de tracés d'ictus induits par l'ajout de 4-AP enregistrés dans la région CA1 de tranches d'hippocampe de souris infusées avec les IgG ctrl (contrôle) ou les IgG LGI1 (LGI1) (B). Les IgG LGI1 P1 augmentent l'aire des ictus par rapport aux IgG ctrl C2 (test t-Student, $***p=0,0004$) (C). Les IgG LGI1 P1 n'ont pas d'effet sur la fréquence des ictus par rapport aux IgG ctrl C1 (test de Mann-Whitney, $p=0,46$) (D). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n_{C1}=9$; $n_{P1}=11$ souris).

iii. *L'augmentation de l'hyperexcitabilité neuronale par les IgG LGI1 est-elle due à un effet sur les canaux kv1.1 ?*

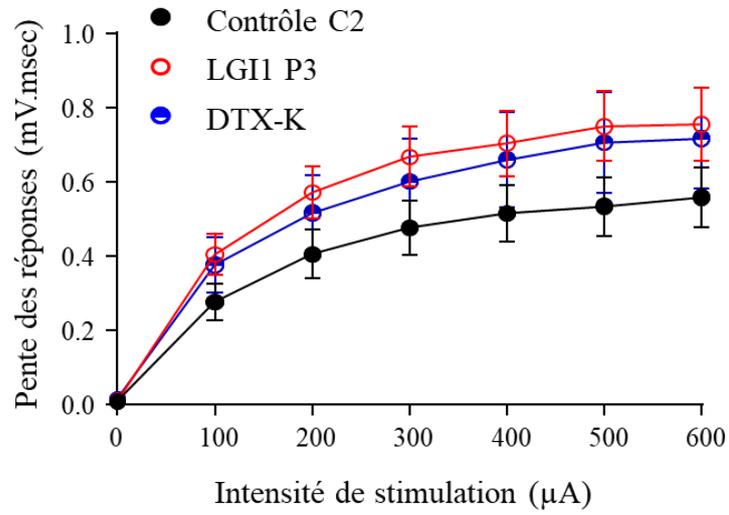
Nous observons un effet des IgG LGI1 sur l'hyperexcitabilité neuronale alors que les canaux kv1.1 sont bloqués par la 4-AP. Cependant, certains auteurs ont suggéré que les effets fonctionnels des IgG LGI1 seraient la conséquence d'une régulation homéostatique due, en premier lieu, à la diminution de l'expression des canaux kv1.1 (Seagar et al., 2017). Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié si un blocage spécifique et prolongé des canaux kv1.1 par la dendrotoxine-K (DTX-K), un antagoniste spécifique des canaux kv1.1 dans l'hippocampe aurait les mêmes effets sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal que ceux observés avec les IgG LGI1. Nous avons étudié l'effet de l'infusion de la DTX-K sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal par rapport à l'infusion des IgG LGI1 P3 et des IgG ctrl C2.

En condition basale, de manière identique aux tranches d'hippocampe de souris infusées avec les IgG LGI1 ou les IgG ctrl, nous n'avons pas observé le déclenchement spontané d'ictus dans les tranches d'hippocampe des souris infusées avec la DTX-K. Nous avons analysé la courbe IO et nous n'observons pas de différence entre l'infusion avec la DTX-K, les IgG LGI1 ou les IgG ctrl (figure 5.15 A). Comme précédemment décrit, les IgG LGI1 augmentent l'hyperexcitabilité globale du réseau neuronal par rapport aux IgG ctrl (figure 5.15 C). L'infusion avec la DTX-K, tend à augmenter l'hyperexcitabilité globale du réseau neuronal de l'hippocampe par rapport aux IgG ctrl, mais n'est statistiquement pas significative (figure 5.15 C). Lorsque nous analysons plus spécifiquement l'aire et la fréquence des ictus, nous observons que la DTX-K n'a pas d'effet sur l'aire des ictus par rapport aux IgG ctrl mais que les IgG LGI1 augmentent l'aire des ictus par rapport à la DTX-K et aux IgG ctrl (figure 5.15 D). La fréquence des ictus n'est pas modifiée par l'infusion avec la DTX-K, les IgG ctrl ou les IgG LGI1 (figure 5.15 E).

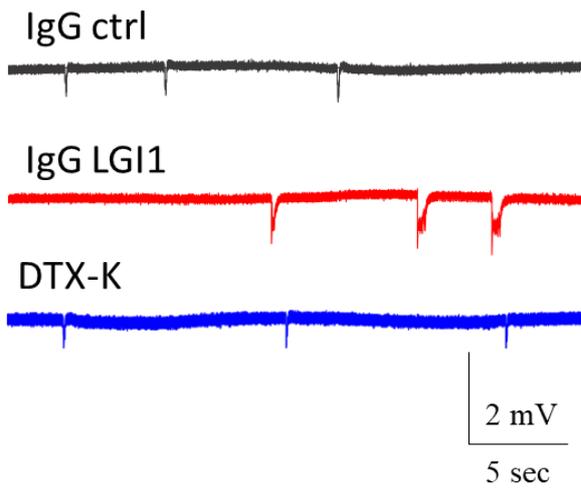
L'ensemble de ces résultats montre que les IgG LGI1 augmentent l'hyperexcitabilité du réseau neuronal en augmentant l'aire des ictus par rapport aux IgG ctrl mais également par rapport à la DTX-K. Le blocage prolongé des canaux kv1.1 par la DTX-K n'a pas d'effet sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal induite par la 4-AP. Ces résultats signifient que les effets des IgG LGI1 sur l'augmentation de l'hyperexcitabilité du réseau neuronal n'est pas la conséquence d'un effet unique et prolongé sur les canaux kv1.1. Cela suggère que les IgG LGI1 perturbent l'équilibre du réseau neuronal en agissant sur un mécanisme indépendant des canaux potassiques kv1.1.

A

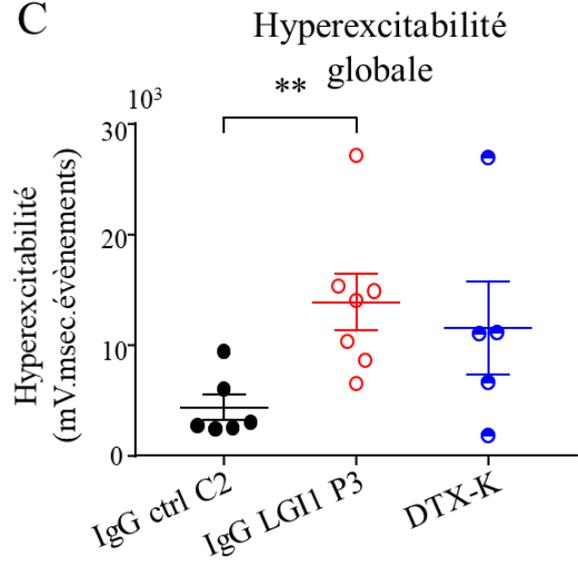
Courbe IO



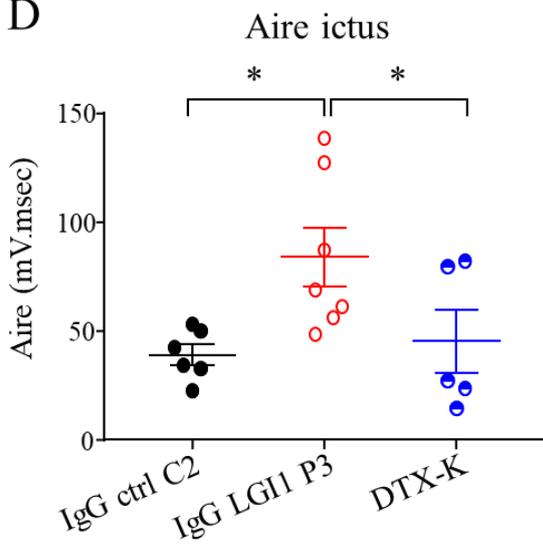
B



C



D



E

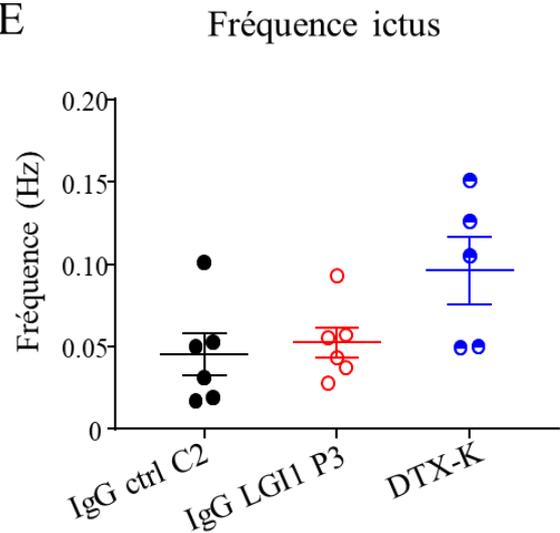


Figure 5.15. Les IgG LGI1 P3 augmentent l'hyperexcitabilité dans l'hippocampe mais pas la DTX-K. Des stimulations d'intensité croissante ont été injectées dans les collatérales de Schaffer et la pente des réponses évoquées dans la région CA1 a été analysée. La courbe IO n'est pas différente entre les souris infusées avec les IgG ctrl C2, les IgG LGI1 P3 ou la DTX-K (ANOVA 1 facteur et test *post Hoc* de Tukey, 400 μ A : p=0,44 ; 500 μ A : p=0,42 ; 600 μ A : p=0,45) (A). Exemple de tracés d'ictus enregistrés dans les tranches infusées avec les IgG ctrl C2, les IgG LGI1 P3 ou la DTX-K (B). Les IgG LGI1 P3 augmentent l'hyperexcitabilité globale par rapport aux IgG ctrl C2. La DTX-K ne modifie pas l'hyperexcitabilité globale par rapport aux IgG ctrl C2 ou aux IgG LGI1 P3 (test de Kruskal-Wallis et test *post Hoc* de Dunn, *p=0,02 ; LGI1-Ctrl **p=0,0082 ; LGI1-DTX-K p=0,40 ; DTX-K- Ctrl p=0,11) (C). Les IgG LGI1 P3 augmentent l'aire des ictus par rapport aux IgG ctrl C2 et à la DTX-K. La DTX-K n'a pas d'effet sur l'aire des ictus par rapport aux IgG ctrl C2 (ANOVA 1 facteur et test *post Hoc* de Fisher LSD, *p=0,03 LGI1- Ctrl *p=0,014 ; LGI1-DTX-K *p=0,04 ; Ctrl-DTX-K p=0,73) (D). La fréquence des ictus n'est pas différente entre les IgG LGI1 P3, IgG ctrl C2 et la DTX-K (test de Kruskal-Wallis, p=0,13) (E). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM (n_{C2}= 6 ; n_{P2}= 7 ; n_{DTX-K}= 5 souris).

b) L'effet des IgG LGI1 sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal passe-t-il par la perturbation du réseau inhibiteur ?

Nous avons étudié l'implication du réseau inhibiteur dans l'augmentation de l'hyperexcitabilité du réseau neuronal. Nous avons enregistré les potentiels de champ locaux par électrophysiologie, dans la région CA1 de tranches aiguës d'hippocampe de souris infusées avec les IgG LGI1 P1 ou P3, ou les IgG ctrl C1 ou C2. Nous avons étudié l'hyperexcitabilité du réseau neuronal en présence de 4-AP (40 μ M) et de picrotoxine (100 μ M), un antagoniste des récepteurs GABA. Nos résultats montrent que lorsque le réseau inhibiteur est bloqué par la présence de picrotoxine, l'hyperexcitabilité du réseau neuronal n'est plus différente entre les IgG LGI1 par rapport aux IgG ctrl (figure 5.16 B-C). Plus spécifiquement, nous observons que le blocage de la transmission inhibitrice par l'ajout de picrotoxine n'a pas d'effet sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal hippocampique des souris infusées avec les IgG LGI1, mais semble augmenter l'hyperexcitabilité du réseau neuronal hippocampique des souris infusées avec les IgG ctrl. Ces résultats signifient que l'hyperexcitabilité est augmentée par les IgG LGI1 en raison d'un défaut d'activité du réseau inhibiteur qui ne parvient plus à contrôler

cette hyperexcitabilité du réseau neuronal. Cela suggère que la réduction de l'activité inhibitrice serait un mécanisme à l'origine des crises d'épilepsie observées chez les patients atteints d'EL LGI1.

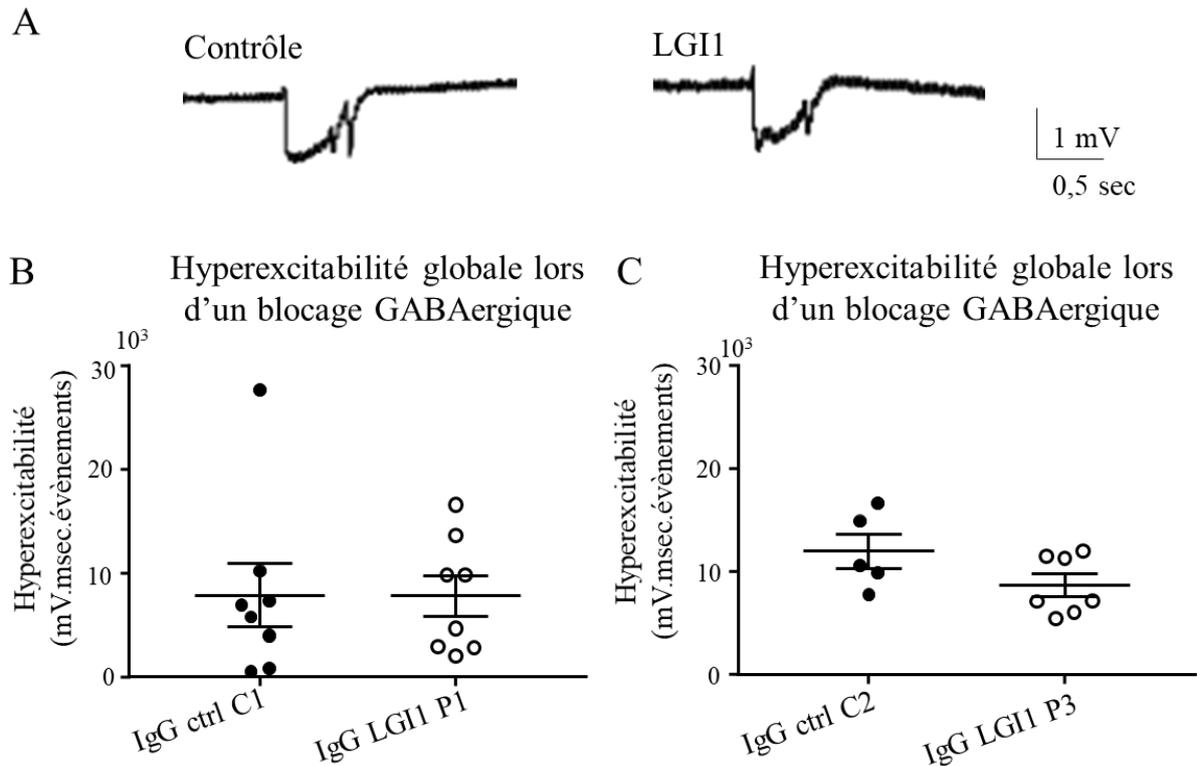


Figure 5.16. Les IgG LGI1 n'ont pas d'effet sur l'hyperexcitabilité du réseau neuronal lorsque le réseau inhibiteur est bloqué. Exemples de tracés d'ictus déclenchés par l'ajout de 4-AP ($40\mu\text{M}$) et picrotoxine ($100\mu\text{M}$) dans la région CA1 de tranches aigues d'hippocampe de souris infusées avec les IgG ctrl (contrôle) ou les IgG LGI1 (LGI1) (A). Les IgG LGI1 P1 n'ont pas d'effet sur l'hyperexcitabilité induite dans la région CA1 de l'hippocampe par rapport aux IgG ctrl C1 (test de Mann-Whitney, $p=0,80$; $n_{C1}= 8$; $n_{P1}= 8$ souris) (B). Les IgG LGI1 P3 n'ont pas d'effet sur l'hyperexcitabilité induite dans la région CA1 de l'hippocampe par rapport aux IgG ctrl C2 (test de Mann-Whitney $p=0,20$, $p=0,11$ $n_{C1}= 5$; $n_{P1}= 7$ souris) (C). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Partie III : L'expression des protéines ADAM22 et ADAM23 partenaires de la protéine LGI1 à la surface des synapses.

Il a été admis que la protéine LGI1 forme un complexe trans-synaptique incluant son partenaire transmembranaire post-synaptique ADAM22 et présynaptique ADAM23 (Fukata, 2006; Fukata et al., 2010). L'expression synaptique des protéines ADAM22 et ADAM23 spécifiquement dans l'hippocampe n'a pas été clairement étudiée. Nous avons donc étudié l'expression des protéines ADAM22 et ADAM23 dans les compartiments présynaptiques et postsynaptiques *in vitro* dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe, et *ex-vivo* dans l'hippocampe de souris. Pour cela, nous avons purifié les densités présynaptiques et postsynaptiques à partir de ces deux modèles et nous avons déterminé l'expression des protéines ADAM22 et ADAM23 par Western Blot.

Dans un premier temps, nous avons contrôlé la pureté des purifications en analysant l'expression de la protéine PSD95, la protéine d'échafaudage des synapses excitatrices, et la protéine synaptophysine, une protéine présente à la surface des vésicules synaptiques. Dans les deux modèles, nous observons une forte expression des protéines PSD95 dans la fraction PSD, et une forte expression de la synaptophysine dans la fraction non-PSD (figure 5.17 A-B). Ces résultats valident la pureté des purifications.

Nous avons ensuite analysé l'expression des protéines ADAM22 et ADAM23 dans les fractions PSD et non-PSD. Dans le modèle *in vitro* de culture neuronale, nous avons observé une forte expression de la protéine ADAM22 dans la fraction PSD et une très faible expression dans la fraction non-PSD. La protéine ADAM23, quant à elle, est fortement exprimée dans la fraction non-PSD et très faiblement exprimée dans la fraction PSD (figure 5.17 A). Ce résultat signifie que dans les cultures neuronales, la protéine ADAM22 est exprimée à la surface de la membrane postsynaptique alors que la protéine ADAM23 est exprimée à la surface de la membrane présynaptique.

Dans le modèle de tranches d'hippocampe de souris, nous avons observé que la protéine ADAM22 est fortement exprimée dans les fractions PSD et non-PSD alors que ADAM23 n'est exprimée dans aucune des deux fractions (figure 5.19 B). Ce résultat signifie que dans l'hippocampe de souris, la protéine ADAM22 est exprimée à la surface des membranes présynaptiques et postsynaptiques mais pas la protéine ADAM23.

Nos résultats montrent qu'il y a une différence d'expression des protéines ADAM22 et ADAM23 entre les modèles de cultures neuronales et d'hippocampe de souris, à la surface des membranes présynaptiques et postsynaptiques.

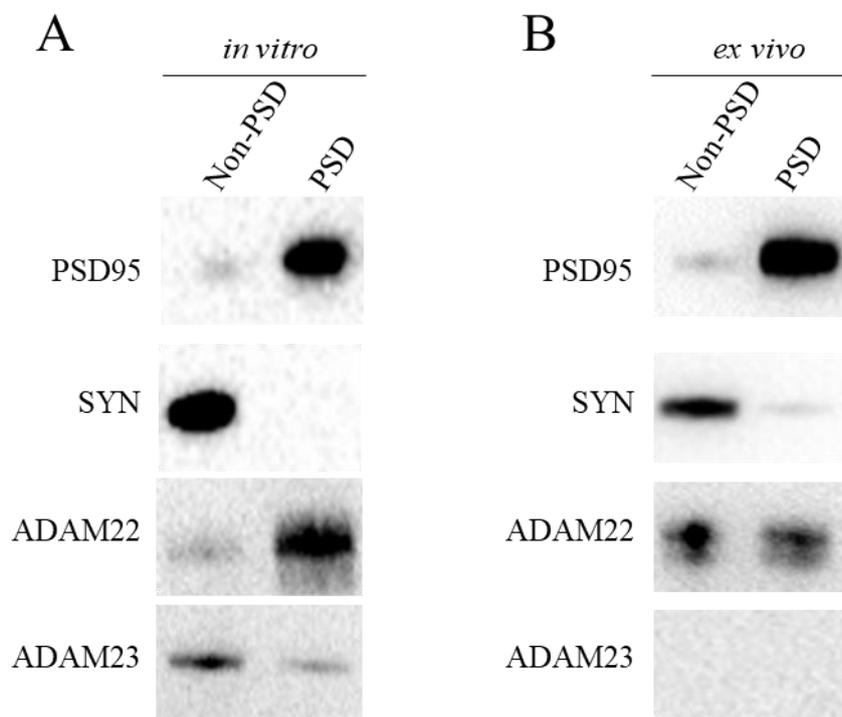


Figure 5.17. La localisation des protéines ADAM22 et ADAM23 à la surface des membranes synaptiques est différente entre le modèle *in vitro* et *ex vivo*. Western blot réalisé à partir de cultures primaires de neurones d'hippocampe montrant une forte expression de la protéine PSD95 dans la fraction PSD et une forte expression de la protéine synaptophysine (SYN) dans la fraction non-PSD. La protéine ADAM22 est fortement exprimée dans la fraction PSD et très faiblement exprimée dans la fraction non-PSD. La protéine ADAM23 est fortement exprimée dans la fraction non-PSD et très faiblement exprimée dans la fraction PSD (A). Western blot réalisé à partir de tranches d'hippocampes. La protéine PSD95 est fortement exprimée dans la fraction PSD et la protéine synaptophysine (SYN) est fortement exprimée dans la partie non-PSD. La protéine ADAM22 est fortement exprimée dans les fractions PSD

et non-PSD, alors que la protéine ADAM23 n'est pas exprimée dans les fractions PSD et non-PSD (B).

Résumé des résultats

Notre étude réalisée à partir de culture neuronale ou d'hippocampe de souris infusées montre des discordances entre ces deux modèles. En culture neuronale, les IgG LGI1 augmentent l'expression des sous-unités GluA1 des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs. Au contraire, dans l'hippocampe de souris, les IgG LGI1 diminuent l'expression des sous-unités GluA1 des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs. Par électrophysiologie, les IgG LGI1 n'induisent pas d'effet fonctionnel sur l'activité du réseau neuronal en culture alors que le réseau neuronal dans les tranches d'hippocampe de souris est perturbé par les IgG LGI1. D'une manière générale, ces différences semblent indiquer que le modèle de culture neuronale n'est peut-être pas adapté à l'étude de la fonction de la protéine LGI1 par l'utilisation d'ac anti-LGI1. Il existe également une hétérogénéité entre les patients. Alors que certaines IgG LGI1 modulent l'expression des R-AMPA ou l'hyperexcitabilité du réseau neuronal, d'autres IgG LGI1 n'ont pas d'effet. Ces différents problèmes seront discutés plus largement dans la section suivante.

Discussion

Dans mon projet de thèse, j'ai étudié l'effet des IgG LGI1 provenant du sérum de 4 patients atteints d'EL LGI1 et nous avons observé des hétérogénéités. En raison de la faible disponibilité des IgG LGI1, l'intégralité de l'étude n'a pas pu être réalisée avec tous les IgG LGI1. Notamment, une partie de l'étude *ex vivo* a été réalisée avec les IgG LGI1 provenant du sérum du seul patient P3, mais les similarités observées avec d'autres IgG LGI1 dans le reste de l'étude laisse penser que mes résultats peuvent être extrapolés et nous permet de discuter des effets généraux des IgG LGI1 pour comprendre le rôle de la protéine LGI1 dans la régulation du réseau neuronal. J'ai montré que le blocage de la fonction de la protéine LGI1 par les ac anti-LGI1 réduit l'expression des R-AMPA à la surface des neurones excitateurs et inhibiteurs dans le GD de l'hippocampe de souris. Cela résulte en un déséquilibre du réseau neuronal en faveur de l'excitation qui favorise le déclenchement d'une hyperexcitabilité, que le réseau inhibiteur ne parvient pas à contrôler. De plus, le réseau inhibiteur est perturbé par le blocage de la protéine LGI1 indépendamment d'une réduction des canaux kv1.1. Mon étude suggère donc que le réseau inhibiteur est potentiellement impliqué dans les mécanismes sous-tendant les crises d'épilepsie chez les patients atteints d'EL LGI1. Enfin, nous mettons en évidence des différences entre les modèles *in vitro* et *ex vivo* sur lesquels nous nous sommes appuyés, qui pourraient en partie être dues à une différence d'expression des protéines ADAM23 et ADAM22. En effet, mes résultats indiquent qu'*ex vivo*, les IgG LGI1 réduisent l'expression des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs, alors que *in vitro* les IgG LGI1 augmentent l'expression des R-AMPA à la surface des neurones inhibiteurs. Dans des cultures neuronales, les IgG LGI1 n'induisent pas d'effet fonctionnel sur l'activité du réseau neuronal.

Dans cette partie, nous allons discuter de ces différents points et mettre en lumière ce que mon étude apporte à la compréhension des mécanismes d'action de la protéine LGI1. En raison des résultats peu concluants obtenus sur le modèle *in vitro*, je vais essentiellement concentrer cette discussion sur les résultats obtenus à partir du modèle *ex vivo* de souris infusées.

1) La régulation de l'expression des R-AMPA par la protéine LGI1

Dans la littérature, il a été rapporté que le dysfonctionnement de la protéine LGI1 dû à des mutations génétiques ou à la présence d'IgG LGI1, réduit l'expression des R-AMPA dans l'hippocampe (Fukata, 2006; Ohkawa et al., 2013; Lovero et al., 2015; Petit-Pedrol et al., 2018). Dans mon étude, nous avons confirmé, par microscopie super-résolution STORM, que l'expression des R-AMPA est diminuée lors d'un blocage de la protéine LGI1 par les IgG LGI1 dans l'hippocampe de souris. La proportion de neurones excitateurs est très nettement supérieure à celle des neurones inhibiteurs qui représentent 10 à 15% de la totalité des cellules neuronales dans l'hippocampe (Caeser & Aertsen, 1991; Pelkey et al., 2017). Dans les précédentes études, la distinction entre ces deux types de neurones n'ayant pas été faite, il est très probable que la réduction des R-AMPA rapportée reflétait principalement l'expression dans les neurones excitateurs (Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015; Petit-Pedrol et al., 2018). Dans mon étude, nous mettons en évidence pour la première fois, que la réduction de l'expression des R-AMPA se produit également à la surface des neurones inhibiteurs. Cependant, des limites techniques liées à nos conditions de microscopie super-résolution et aux marquages immunohistochimiques, n'ont pas permis d'étudier spécifiquement l'expression synaptique des R-AMPA. Les R-AMPA sont des protéines dynamiques qui diffusent latéralement à la surface de la membrane plasmique et peuvent entrer ou sortir de la synapse en fonction de l'activité synaptique (Groc & Choquet, 2006; Compans et al., 2016; Penn et al., 2017; Choquet & Hosy, 2020). De ce fait, les R-AMPA extrasynaptiques exprimés à la surface des neurones, constituent une réserve disponible pouvant rapidement être recrutée à la synapse, un des mécanismes

impliqués dans la plasticité (Penn et al., 2017; Choquet & Hosy, 2020). Dans une étude s'intéressant à l'effet des IgG LGI1 sur l'expression des R-AMPA dans l'hippocampe, il a été observé, par microscopie confocale, une réduction de l'expression totale et synaptique des R-AMPA à la surface des neurones (Petit-Pedrol et al., 2018). Cela suggère que les modifications de l'expression totale des R-AMPA à la surface des neurones est généralement en accord avec les modifications de l'expression des R-AMPA synaptiques. Ainsi, il est probable que dans mon étude, la réduction de l'expression des R-AMPA observée à la surface des neurones reflèterait une réduction synaptique des R-AMPA.

2) L'effet des IgG LGI1 sur l'expression des R-AMPA est localisé dans le gyrus denté

Dans mon projet, j'ai observé que la réduction des R-AMPA par les IgG LGI1 est localisée dans le GD de l'hippocampe. La protéine LGI1 étant exprimée dans la totalité de l'hippocampe, cela pourrait suggérer que les IgG ne diffusent pas suffisamment et donc n'atteignent pas les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe. Toutefois, la présence d'IgG humaines dans notre modèle *ex vivo* a été observée par immunohistochimie dans la totalité de l'hippocampe, avec une expression plus marquée dans la partie médiane au niveau du GD et de la région CA1 de l'hippocampe. L'hypothèse d'un défaut de diffusion dans les régions CA1 et CA3 est donc très peu probable. L'expression de la protéine LGI1 est plus importante dans la région du GD par rapport aux régions CA3 et CA1 de l'hippocampe (Senechal et al., 2005; Fukata et al., 2010). Cette différence d'expression pourrait expliquer que la réduction de l'expression des R-AMPA soit localisée dans la région du GD.

Petit-Pedrol et al., 2018 ont montré que l'infusion des IgG LGI1 de souris réduit l'expression des R-AMPA dans le GD et dans la région CA1 de l'hippocampe après 18 jours d'infusion mais aucun effet n'a été montré après 7 jours d'infusion. Dans ce modèle, des IgG purifiées ont été infusées au niveau des ventricules, contrairement à notre modèle où les IgG ont été infusées

dans le septum-médian. De plus, cette étude a été réalisée en microscopie conventionnelle, une technique moins précise que la microscopie super-résolution STORM, utilisée dans mon projet. Cela pourrait expliquer qu'aucune modification de l'expression des R-AMPA n'a été observée après 7 jours d'infusion. Dans mon étude, il serait intéressant d'étudier l'effet des IgG LGI1 durant un temps d'infusion plus long. Cela permettrait de savoir si l'effet des IgG LGI1 reste localisé au niveau du GD de l'hippocampe, ou si les altérations observées débutent au niveau du GD pour se propager vers le reste de l'hippocampe notamment dans la région CA1 de l'hippocampe.

Il s'avère que dans notre étude, comme dans celle de Petit-Pedrol et collaborateurs en 2018, la région CA3 est épargnée par la diminution des R-AMPA par les IgG. Les dendrites des cellules pyramidales de la région CA3 sont contactées par les synapses des fibres moussues des cellules granulaires du GD (Blaabjerg & Zimmer, 2007). Les synapses des fibres moussues diffèrent des autres synapses de l'hippocampe par leur morphologie plus large et irrégulière, et par les différentes propriétés intrinsèques et extrinsèques qui régulent leur transmission synaptique (Blaabjerg & Zimmer, 2007; Kobayashi, 2010). Par exemple, la transmission synaptique des fibres moussues peut être influencée par des neuromodulateurs tels que les neuropeptides dynorphines ou encéphalines, fortement concentrés dans les fibres moussues (Kobayashi, 2010). L'influence de ces nombreux paramètres pourrait expliquer que le blocage de la protéine LGI1 n'ait pas d'effet sur les synapses des neurones la région CA3.

Notre modèle de souris GAD-RT nous a permis d'identifier les neurones GABAergiques par l'expression de la protéine td-tomato sous le contrôle du promoteur du gène *Gad2*. Ce modèle, précédemment décrit dans la littérature, permet l'expression de la protéine td-tomato dans 90% des neurones GABAergiques dans l'hippocampe (Besser et al., 2015). Cependant, différents sous-types d'interneurones composent la région du GD, et les régions CA3 et CA1, telles que les cellules en corbeille ou les cellules chandeliers qui n'ont pas été distinguées dans notre

modèle (Amaral et al., 2007; Houser, 2007; Pelkey et al., 2017; Schultz & Engelhardt, 2014). Dans mon projet, la couche moléculaire du GD a été la région analysée. La couche moléculaire est principalement composée des dendrites des cellules granulaires, des dendrites des interneurons de la région polymorphique, telles que les cellules « *hilar perforant-path* (HIPP) », et est également composée d'interneurones notamment les cellules « *molecular layer perforant path-associated* (MOOP) » et les cellules chandeliers (Amaral et al., 2007; Houser, 2007). Les résultats obtenus dans ce travail de thèse suggèrent donc que les IgG LGI1 ont un effet ciblé sur les cellules granulaires et sur les neurones inhibiteurs du GD de l'hippocampe. Dans des études futures, il serait intéressant d'étudier si les effets des IgG LGI1 ciblent principalement certains sous-types d'interneurones.

3) Le déséquilibre du réseau neuronal par les IgG LGI1

Dans ce travail de thèse, nous avons observé que les IgG LGI1 augmentent l'hyperexcitabilité du réseau neuronal en accord avec les crises d'épilepsie observées lors d'un dysfonctionnement de la protéine LGI1 (Fukata et al., 2010; Irani et al., 2010; Vogrig et al., 2019; Zhou et al., 2009). Connaissant les fonctions de la protéine LGI1 décrites dans la littérature, l'augmentation de l'hyperexcitabilité pouvait être due à une réduction des canaux potassiques kv1.1 (Petit-Pedrol et al., 2018 ; Seagar et al., 2017) ou à une diminution de l'activité du réseau inhibiteur qui ne parviendrait plus à contrôler l'excitabilité neuronale. La diminution des canaux kv1.1 empêche les neurones dépolarisés de revenir à leur potentiel membranaire à la suite d'une dépolarisation, favorisant le déclenchement rapide d'un second potentiel action. Cette augmentation de la fréquence de décharge favorise la libération des neurotransmetteurs, augmentant l'activité du réseau neuronal (Simeone et al., 2013 ; D'Adamo et al., 2020). Cependant, les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales montrent que l'augmentation de l'hyperexcitabilité observée par les IgG LGI1 est indépendante d'un effet sur les canaux kv1.1, contrairement à ce qui a été suggéré dans la littérature (Seagar et al., 2017).

Nous avons donc étudié l'implication du réseau inhibiteur sur l'augmentation de l'hyperexcitabilité du réseau neuronal induit par les IgG LGI1. Nos résultats ont alors confirmé la réduction de l'activité du réseau inhibiteur lorsque la protéine LGI1 est bloquée. Ainsi, bien que nous ayons précédemment observé une réduction des R-AMPA au niveau des neurones excitateurs et des neurones inhibiteurs, notre étude suggère que les conséquences fonctionnelles induites sur le réseau inhibiteur sont plus drastiques que celles induites sur le réseau excitateur par le blocage de la protéine LGI1. De nombreux paramètres différencient les neurones excitateurs des neurones inhibiteurs telle que l'expression différentielle des canaux voltage-dépendants à la surface des neurones (Pelkey et al., 2017). Une différence notable pouvant expliquer l'effet plus drastique de la réduction des R-AMPA sur le réseau inhibiteur est la connectivité beaucoup plus développée des neurones inhibiteurs par rapport aux neurones excitateurs. En effet, les neurones inhibiteurs sont moins nombreux que les neurones excitateurs mais envoient des projections synaptiques sur de nombreux neurones excitateurs différents. Un seul neurone inhibiteur forme un nombre élevé de connections synaptiques. Par exemple, dans le GD, une cellule inhibitrice en corbeille contacte en moyenne 10 000 cellules granulaires, et un neurone inhibiteur HIPP génère en moyenne 100 000 terminaisons synaptiques (Amaral et al., 2007) alors que les fibres mossues des cellules granulaires contactent seulement 11 à 15 cellules pyramidales de la région CA3 (Acsády et al., 1998). Ainsi, malgré leur faible proportion dans l'hippocampe, un seul neurone inhibiteur contrôle un nombre élevé de neurones excitateurs. Cette haute connectivité par les neurones inhibiteurs pourrait expliquer que le déséquilibre du réseau neuronal résultant de l'effet des IgG LGI1, est en défaveur de l'inhibition.

Précédemment, nous avons observé que l'effet des IgG LGI1 sur l'expression des R-AMPA est localisé dans le GD de l'hippocampe. Dans la littérature, le rôle épileptogène du GD a été identifié dans des formes d'épilepsie du lobe temporal (Dudek & Sutula, 2007). De manière

intéressante, des études montrent que la réduction de l'activité inhibitrice dans le GD conduit à la génération de crises d'épilepsie (Dengler et al., 2017; Dudek & Sutula, 2007). Le GD est une région où l'environnement inhibiteur est très important en raison des sous-types variés d'interneurones qui composent cette région, et de la haute concentration en synapses GABAergiques (Amaral et al., 2007; Houser, 2007; Dengler & Coulter, 2016). De ce fait, dans notre étude, il est tout à fait possible que la seule atteinte des neurones inhibiteurs localisés dans le GD, soit suffisante pour induire une augmentation de l'hyperexcitabilité dans le réseau neuronal de l'hippocampe.

Il est important de souligner que notre étude n'exclut pas, en condition pathologique, un mécanisme supplémentaire conduisant à une hyperexcitabilité du réseau neuronal par une atteinte des canaux kv1.1 par les IgG LGI1. Cependant, l'ensemble de nos résultats suggère qu'une réduction de l'activité inhibitrice dans le GD de l'hippocampe serait un des mécanismes à l'origine du déclenchement des crises d'épilepsie chez les patients atteints d'EL LGI1, comme observé dans des modèles d'épilepsie du lobe temporal (Kobayashi & Buckmaster, 2003; Dengler et al., 2017). Notre étude montre qu'il existe des mécanismes d'action indépendants des canaux kv1.1. En effet, dans les précédentes études réalisées dans la littérature, il était difficile de distinguer si les effets observés lors d'une perturbation de la protéine LGI1 étaient associés ou non aux canaux kv1.1. Ainsi, il est possible que les IgG LGI1 perturbent l'activité du réseau neuronal par plusieurs mécanismes d'action.

4) L'expression synaptique de la protéine ADAM22

Dans la littérature, il a été établi que la protéine LGI1 forme un complexe trans-synaptique avec son partenaire post-synaptique ADAM22 (Fukata, 2006; Fukata et al., 2010; Yamagata et al., 2018) et son partenaire présynaptique ADAM23 (Fukata et al., 2010). Dans notre étude, nous montrons que la protéine ADAM22 est exprimée dans les compartiments présynaptiques et postsynaptiques dans l'hippocampe de souris. En revanche la protéine ADAM23 n'est pas

exprimée dans les compartiments synaptiques dans l'hippocampe de souris. Notre étude suggère que la protéine ADAM23 ne serait pas le partenaire synaptique de la protéine LGI1 dans l'hippocampe contrairement à ce qui a été affirmé dans la littérature (Fukata et al., 2010). Toutefois, l'interaction de la protéine LGI1 avec son partenaire ADAM23 reste possible dans d'autres compartiments cellulaires exprimant ADAM23, notamment le long des prolongements axonaux et dendritiques (Hivert et al., 2018) ou dans d'autres aires cérébrales tels que le néocortex ou le cervelet où la protéine LGI1 est également exprimée (Fukata et al., 2010; Navarro et al., 2016). Récemment, une étude a identifié l'ensemble des protéines synaptiques associées à ADAM22 dans le cerveau de souris par spectrométrie de masse (Fukata et al., 2021). Les protéines LGI1 et PSD95 ont notamment été identifiées en très forte concentration. Les protéines ADAM23 et ADAM11, qui ont la capacité d'interagir avec la protéine LGI1 *in vitro* (Sagane et al., 2008), ont été identifiées en faible proportion. Ces résultats de la littérature montrent que le complexe LGI1-ADAM22 est très large et inclut un très grand nombre de protéines. De ce fait, cela suggère que la protéine LGI1 pourrait avoir des effets différents en fonction de la localisation et de la nature de ses partenaires et des protéines qui leur sont associées.

Le rôle fonctionnel du complexe trans-synaptique LGI1-ADAM22 reste encore incompris. L'étude réalisée par Fukata et collaborateurs en 2021, met en évidence que l'inhibition de l'interaction entre la protéine LGI1 et son partenaire ADAM22 entraîne un désalignement des compartiments présynaptiques et postsynaptiques. Cette étude suggère que ce défaut d'alignement synaptique serait à l'origine de la réduction de l'expression des R-AMPA à la surface des synapses excitatrices. D'autres études sont nécessaires afin de comprendre si le rôle du complexe trans-synaptique LGI1-ADAM22 permet uniquement l'alignement structurel des compartiments synaptiques, ou si l'interaction de LGI1 avec ADAM22 a également un effet fonctionnel direct sur la transmission synaptique.

5) Le modèle *in vitro* : un modèle inadapté ?

Une partie de mon travail a été réalisée à partir de cultures primaires de neurones d'hippocampe dont l'utilisation présente certains avantages. Les cultures neuronales permettent de réduire les volumes d'utilisation des IgG purifiées dont la disponibilité est très limitée. De plus, la simplicité du réseau neuronal était favorable aux études réalisées par immunomarquage du fait de l'isolement des prolongements neuronaux. Toutefois, nous avons observé des différences entre le modèle *in vitro* et *ex vivo* notamment sur l'expression synaptique des protéines ADAM22 et ADAM23. De plus, au cours de notre étude, nous avons noté une forte variabilité entre les cultures neuronales conduisant à un manque de reproductibilité qui ne nous permettait pas de conclure de manière fiable sur les effets des IgG LGI1 sur ce réseau neuronal.

Le modèle *in vitro*, est un modèle simplifié du réseau neuronal, très différent du réseau complexe de l'hippocampe. En raison de cette simplicité, de nombreux sous types cellulaires ne sont pas présents. Certains interneurons telles que les cellules bistratifiées ou les cellules à cholécystokinine sont présentes en très faible proportion, inférieure à 1% dans l'hippocampe (Pelkey et al., 2017). Etant donné les faibles quantités de neurones présents dans les cultures cellulaires comparé à l'hippocampe, il est peu probable que ces sous-types neuronaux soient retrouvés dans le modèle *in vitro*. De plus, notre protocole est optimisé afin d'obtenir des cultures les plus pures possible en cellules neuronales, ce qui réduit considérablement le nombre de cellules gliales présentes dans ce modèle. L'ensemble de ces paramètres pourrait expliquer les différences, notamment sur l'expression protéique, entre les modèles *in vitro* et *ex vivo*.

Nous avons concentré notre discussion sur le modèle *ex vivo*. Dans l'hippocampe, les structures sont finement organisées et connectées entre le GD et les 3 régions de la corne d'Ammon, qui sont elles-mêmes subdivisées en sous-couches. Ces sous-couches sont composées de neurones excitateurs et inhibiteurs ayant des localisations bien identifiées, et des afférences et efférences précises (Schultz & Engelhardt, 2014; Knierim, 2015; Pelkey et al., 2017). Les cellules gliales

sont présentes dans l'hippocampe et jouent un rôle prépondérant dans l'activité du réseau neuronal (Angulo, 2004; Volterra & Steinhäuser, 2004). Ce modèle prend donc en compte le réseau neuronal dans son intégralité. Cependant, le modèle *ex vivo* est un modèle invasif qui nécessite l'implantation d'une canule directement dans le cerveau des animaux induisant des lésions neuronales. Dans notre cas, l'implantation de la canule dans le septum permet de ne pas altérer la structure de l'hippocampe tout en permettant la diffusion des IgG dans cette structure. Dans notre modèle *ex vivo*, aucune crise d'épilepsie n'a été observée chez les animaux infusés avec les IgG purifiées contrairement aux symptômes décrits chez les patients atteints d'EL LGI1 (Ariño et al., 2016; Muñoz-Castrillo et al., 2021; van Sonderen et al., 2016). Nous n'avons cependant pas enregistré, par électrophysiologie *ex vivo*, l'activité du réseau neuronal. Cette observation est confortée par la littérature puisque aucune crise d'épilepsie n'a été observée dans un modèle *ex vivo* très similaire au nôtre (Petit-Pedrol et al., 2018). Il est important de souligner que l'absence de crise d'épilepsie est un élément favorable à nos expérimentations puisque les crises d'épilepsie conduisent à des modifications du réseau neuronal, notamment à une forte mort neuronale et à la formation de connexions aberrantes (Cui et al., 2020; Long et al., 2014; Sloviter, 1999). Ces modifications sont favorables au déclenchement de nouvelles crises d'épilepsie. Dans ces conditions, il aurait été difficile d'isoler les conséquences directes de l'effet des IgG LGI1, des conséquences indirectes liées aux crises d'épilepsies.

Ainsi, les modèles d'étude *in vitro* et *ex vivo* présentent des avantages et des inconvénients. L'ensemble de ces arguments suggère que le modèle *in vitro* n'est pas adapté à l'étude fonctionnelle de l'effet des IgG LGI1 sur l'activité du réseau neuronal et justifie que nous nous sommes concentrés sur le modèle *ex vivo*. Le modèle *ex vivo* de souris infusée est adapté à l'étude fonctionnelle des effets des IgG LGI1 sur la régulation du réseau neuronal. Il est important de prendre en considération que le modèle *ex vivo* permet de mieux comprendre les mécanismes d'action des IgG LGI1 mais n'est pas optimal pour l'étude de la pathologie des

encéphalites limbiques à ac anti-LGI1. En effet, il n'existe actuellement pas de modèle reproduisant fidèlement cette pathologie dont les origines et l'évolution restent encore incomprises. Notamment, la présence d'IgG dans le LCR des patients implique une rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE) dont les mécanismes n'ont pas été élucidés.

6) Les effets hétérogènes des IgG LGI1 des différents patients

Nous avons étudié l'effet des IgG purifiées à partir du sérum de 4 patients atteints d'EL LGI1. Nous avons mis en évidence que les IgG LGI1 ont des effets hétérogènes sur l'activité du réseau neuronal dans l'hippocampe de souris. En effet, certaines IgG LGI1 induisent des modulations fonctionnelles, notamment observées en électrophysiologie, contrairement à d'autres IgG LGI1 qui n'en induisent pas. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces différents effets. Tout d'abord, il est important de rappeler que les patients atteints d'EL LGI1 ne présentent pas tous les mêmes symptômes cliniques. En effet, les troubles cognitifs sont plus ou moins sévères et certains patients ne présentent pas de crises FBDS ou d'épilepsie (Ariño et al., 2016; van Sonderen et al., 2016; Muñoz-Castrillo et al., 2021). Nous avons donc examiné les symptômes que présentaient les patients P1-4 au moment des prélèvements sanguins. Nous avons observé que les patients P1 et P3 présentaient des troubles cognitifs sévères et une épilepsie. Les patients P2 et P4 présentaient des crises FBDS mais pas de trouble cognitif sévère. Ces données suggèrent que les patients P1 et P3 étaient à des stades avancés de la maladie, alors que les patients P2 et P4 étaient à des stades plus précoces (Irani et al., 2011; van Sonderen et al., 2016; S. N. M. Binks et al., 2018). De manière intéressante, les IgG LGI1 P1 et P3 augmentent l'hyperexcitabilité neuronale dans l'hippocampe des souris alors que les IgG LGI1 P2 et P4 n'augmentent pas l'hyperexcitabilité du réseau neuronal dans l'hippocampe. Ces résultats suggèrent que certains paramètres diffèrent dans les échantillons d'IgG LGI1 des patients en fonction de l'avancement de la pathologie, que nous allons développer dans cette partie.

Dans notre étude, nous avons utilisé une concentration d'IgG humaines homogène dans le but de s'affranchir de potentiels biais dus à des effets des IgG non spécifiques de la protéine LGI1. Cependant, la concentration spécifique en IgG LGI1 présente dans chaque échantillon n'a pas été définie. Il est donc possible que la concentration d'IgG dirigées spécifiquement contre la protéine LGI1 ne soient pas équivalentes entre les patients. De plus, une étude a mis en évidence que des taux plus élevés en IgG LGI1 dans le sérum et dans le LCR des patients atteints d'EL LGI1, étaient associés à une évolution plus sévère de la maladie (Gadoth et al., 2017). Cela suggère que des concentrations élevées en IgG LGI1 agiraient plus sévèrement sur l'activité du réseau neuronal. Il serait donc intéressant de déterminer la concentration d'IgG LGI1 contenue dans nos échantillons d'IgG purifiées afin de déterminer si ce paramètre peut expliquer les différences que nous observons.

Les IgG existent sous 4 formes différentes d'isotypes. Bien que les IgG LGI1 soient majoritairement des IgG4, les IgG1 sont également souvent présents dans les sérums et les LCR des patients (van Sonderen, Petit-Pedrol, et al., 2017; Dubey et al., 2018; Gadoth et al., 2018; Thompson et al., 2018; Muñoz-Castrillo et al., 2021). Des études montrent notamment que les patients souffrant de crises FBDS ont presque exclusivement des IgG4 présents dans leur sérum (Dubey et al., 2018; Thompson et al., 2018). Alors qu'une étude met en évidence que les patients ayant des troubles cognitifs sévères ont plus d'IgG1 dans leur sérum, qui activent le système du complément contrairement aux IgG4 (Thompson et al., 2018), d'autres études n'ont pas confirmé ces résultats (Dubey et al., 2020; Muñoz-Castrillo et al., 2021). Ainsi, dans notre étude, il serait intéressant de déterminer les concentrations d'IgG LGI1 présentes dans les sérums des patients P1-4 et de déterminer les taux d'IgG1 et d'IgG4 présents dans chacun de nos échantillons. Cela permettrait de savoir si l'augmentation de l'hyperexcitabilité neuronale dans l'hippocampe de souris est associée aux isotypes et à la concentration d'IgG LGI1 présente dans nos échantillons.

Les IgG LGI1 sont des ac polyclonaux qui ciblent le domaine LRR et EPTP de la protéine LGI1 (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). Dans la littérature, il a été montré que les IgG réactives au domaine LRR et les IgG réactives au domaine EPTP ne neutralisent pas la protéine LGI1 de la même manière et ne semblent pas entraîner les mêmes effets sur l'excitabilité neuronale (Ohkawa et al., 2013; Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). En effet, les IgG anti-LRR empêchent la protéine LGI1 de se fixer à une autre protéine LGI1 mais ne l'empêchent pas d'interagir avec ses partenaires transmembranaires contrairement aux IgG anti-EPTP (Ohkawa et al., 2013; Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). De plus, il semble que les IgG anti-EPTP réduiraient fortement l'expression des canaux kv1.1 exprimés dans l'hippocampe mais ne modifieraient pas l'expression des R-AMPA, ni l'activité neuronale. En revanche, les IgG anti-LRR réduiraient l'expression des canaux kv1.1, mais augmenteraient également l'expression des R-AMPA et l'activité neuronale (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). Ces résultats sont surprenants au vu de la littérature et de nos résultats qui mettent en évidence une diminution de l'expression des R-AMPA en présence d'IgG LGI1, et nécessitent donc des études plus approfondies (Fukata et al., 2010; Ohkawa et al., 2013; Lovero et al., 2015; Petit-Pedrol et al., 2018). Ces différents effets relevés en fonction du domaine ciblé suggèrent que des proportions différentes en IgG anti-LRR et en IgG anti-EPTP dans nos échantillons, pourraient entraîner des effets hétérogènes. Cependant, une étude réalisée à partir du sérum de 31 patients atteints d'EL LGI1, montre que les concentrations en IgG anti-EPTP et en IgG anti-LRR sont proportionnelles dans le sérum des patients atteints d'EL LGI1 (Ramberger et al., 2020). Il est donc peu probable que de telles différences de proportions entre les IgG LGI1 soient à l'origine des effets hétérogènes que nous avons observés.

Ainsi, différents facteurs peuvent expliquer les effets différentiels observés entre nos échantillons. Il est probable que la concentration spécifique en IgG LGI1 et que les isotypes

soient les causes des effets hétérogènes. Il serait donc important de déterminer ces paramètres afin de mieux comprendre les différences relevées dans notre étude.

7) L'utilisation des IgG provenant du sérum constitue-t-elle une limite ?

Les EL LGI1 correspondent à des troubles neurologiques dus à l'inflammation du SNC par les IgG LGI1 présents dans le LCR (Irani et al., 2010; M. Lai et al., 2010; van Sonderen et al., 2016). Dans notre étude, nous avons utilisé des IgG purifiées à partir de sérum et non à partir de LCR de patients. Plusieurs raisons expliquent ce choix. Les volumes de sérum disponibles sont plus importants que les volumes de LCR. Dans ce projet, les quantités de LCR disponibles pour un même patient ne nous auraient pas permis de réaliser toutes les expériences nécessaires à la compréhension des fonctions de la protéine LGI1 sur la régulation du réseau neuronal. De plus, les IgG LGI1 présentes dans le sérum sont jusqu'à 100 fois plus concentrées que les IgG LGI1 présentes dans le LCR (Gadoth et al., 2017; Lehmann-Horn et al., 2020; Ramberger et al., 2020) rendant la quantité d'IgG disponible plus grande par l'utilisation du sérum par rapport au LCR. D'autre part, en condition non pathologique, il n'y a pas d'IgG dans le LCR des sujets sains, limitant ainsi l'utilisation d'un contrôle adapté. Des études visant à mieux comprendre les mécanismes d'action d'autres types d'encéphalites auto-immunes, telles que les encéphalites à auto-ac anti-NMDA-R, ont été réalisées à partir du LCR de patients (Planagumà et al., 2016). Dans cette étude, les LCR utilisés comme contrôles provenaient de patients souffrant de troubles cognitifs mais n'ayant pas d'inflammation ni d'ac dans le LCR. De ce fait, il est difficile de savoir si les effets observés sont dus au blocage de la protéine cible par les ac, ou à la simple présence d'IgG. En effet, des études précédemment réalisées au sein de notre laboratoire, menées par les docteurs Chloé Bost et Aude Chefdeville, mettent en évidence des modulations du réseau neuronal dues à un effet des IgG contrôles par rapport à une condition sans IgG. Dans nos études, il est donc essentiel de prendre en compte cet effet non-spécifique

des IgG, et d'utiliser des IgG contrôles pour déduire l'effet de la cible antigénique, qu'est la protéine LGI1 dans notre cas.

Il est important de confirmer nos résultats en étudiant les effets des IgG LGI1 provenant du LCR de patients atteints d'EL LGI1. En effet, la question de l'origine commune des IgG LGI1 dans le sérum et dans le LCR des patients n'est pas totalement élucidée. Récemment, des études se sont penchées sur la question et suggèrent que la maturation des cellules B sécrétrices d'anticorps, se fait indépendamment dans le LCR et dans le sérum des patients atteints d'EL LGI1 (Lehmann-Horn et al., 2020; Ramberger et al., 2020). Cela suggère que les IgG LGI1 ont une origine différente dans le LCR et dans le sérum des patients, et donc que leurs mécanismes d'action pourraient être différents, par exemple en raison de différences dans les cibles antigéniques. A l'heure actuelle, la majorité des études s'intéressant aux effets des IgG LGI1 sur l'activité du réseau neuronal ont utilisé des IgG provenant du sérum de patients atteints d'EL LGI1 (Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Ramberger et al., 2020). Il serait donc intéressant que des prochaines études soient réalisées à partir du LCR de patients afin d'identifier si les effets des IgG LGI1 du sérum sont identiques aux effets des IgG LGI1 du LCR.

De nombreuses questions restent encore à être résolues afin de mieux comprendre la pathologie des EL LGI1. Notamment, la présence d'IgG dans le LCR des patients suggère une rupture de la BHE qui permet le passage des cellules B et/ou des IgG du sérum vers le LCR. Toutefois, les mécanismes menant à cette rupture de la BHE restent encore incompris. De plus, chez certains patients atteints d'EL LGI1, aucune IgG n'est détectée dans le LCR malgré la présence de symptômes sévères (Kornau et al., 2020; Muñiz-Castrillo et al., 2021). Bien qu'il soit difficile de déterminer si cette absence de détection est due à un défaut dans la sensibilité des tests réalisés ou à une véritable absence des IgG LGI1 dans le LCR des patients, cela pourrait suggérer que les IgG LGI1 ne seraient pas les seules responsables de la pathologie des EL LGI1.

Cependant, dans notre étude, nous mettons en évidence que certaines IgG LGI1 ont bien des effets pathogènes directs sur l'activité neuronale.

Conclusion générale :

Nous mettons en évidence que les IgG LGI1 diminuent plus drastiquement l'activité du réseau inhibiteur qui peine à contrôler l'excitabilité neuronale, spécifiquement au niveau du GD de l'hippocampe. Nos résultats suggèrent que la réduction de l'activité inhibitrice dans le GD de l'hippocampe est un mécanisme conduisant au déclenchement de crises d'épilepsie chez les patients atteints d'EL LGI1.

Dans des études futures, il serait intéressant d'étudier les causes mécanistiques de la diminution de l'expression des R-AMPA. L'identification de ces mécanismes de régulation pourrait permettre de mieux comprendre comment la protéine LGI1 régule les protéines composant le large complexe trans-synaptique formé par LGI1-ADAM22 et donc par extension, comment la protéine LGI1 régule la transmission synaptique. De plus, il serait intéressant d'étudier plus largement l'ensemble des mécanismes perturbés par le dysfonctionnement de la protéine LGI1 et qui conduisent au déclenchement de crises d'épilepsie. Enfin, il est important de définir précisément l'action des IgG LGI1 sur le réseau inhibiteur afin de mieux comprendre les mécanismes précis sous-tendant la dérégulation observée dans notre projet.

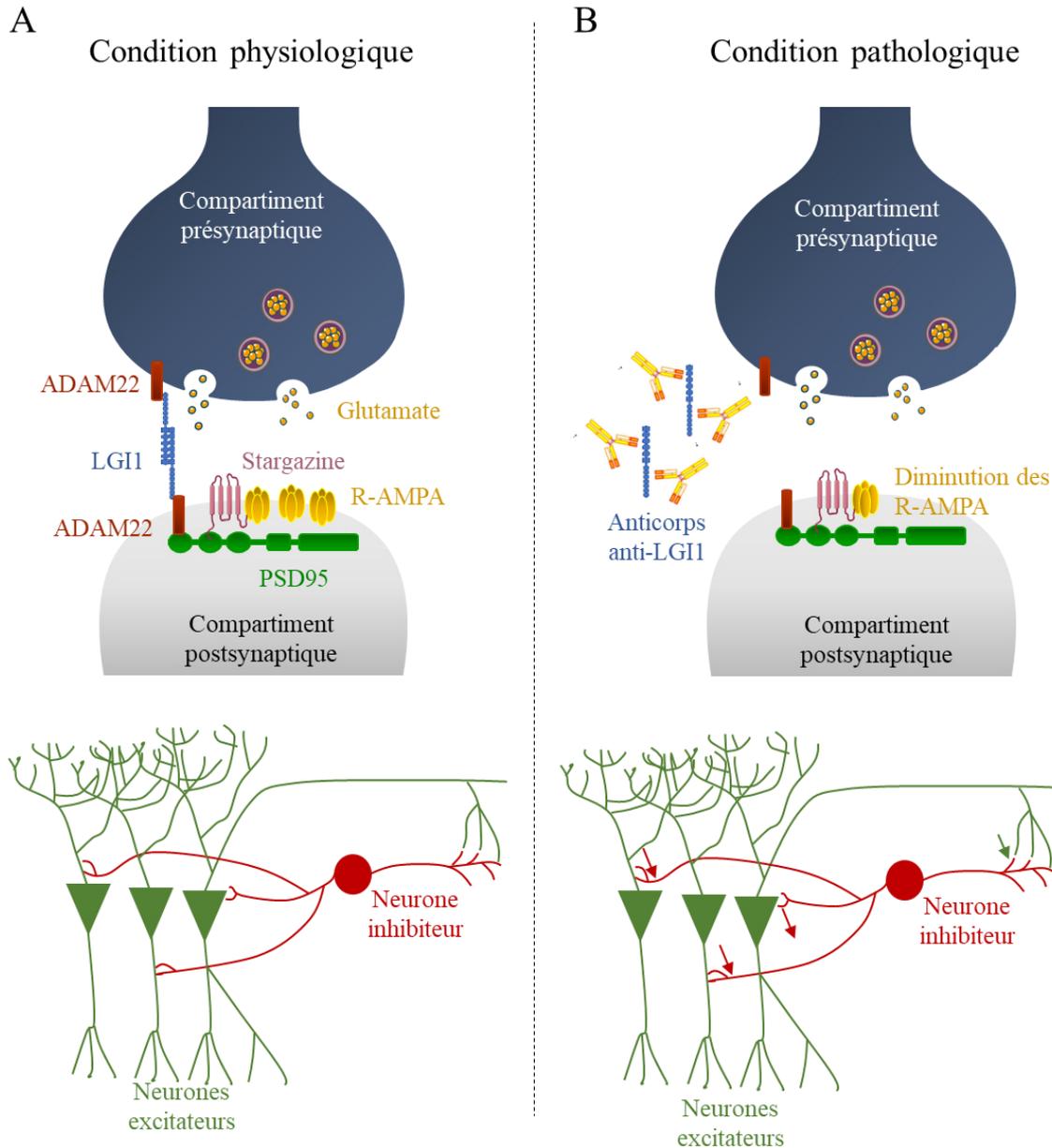


Figure 6.1. L'effet des IgG LGI1 sur l'activité du réseau neuronal. En condition physiologique, la protéine LGI1 interagit au niveau des synapses excitatrices avec son partenaire la protéine ADAM22. La protéine ADAM22 semble être le partenaire de la protéine LGI1 exprimée à la surface des membranes présynaptiques et postsynaptiques. Par la formation de ce complexe trans-synaptique, la protéine LGI1 régule l'expression des R-AMPA. Dans ces conditions, il y a un équilibre entre le réseau neuronal excitateur et le réseau neuronal inhibiteur (A). En condition pathologique, la présence d'ac anti-LGI1 empêche l'interaction de la protéine LGI1 avec ses partenaires transmembranaires. L'inhibition de la formation du complexe trans-synaptique LGI1-ADAM22, réduit l'expression des R-AMPA à la surface des synapses excitatrices sur les neurones excitateurs et inhibiteurs. Cela résulte en un déséquilibre de l'activité du réseau neuronal qui semble diminuer plus drastiquement le réseau inhibiteur (B).

Références

- Alsrouji, O., & Memon, A. B. (2021). Encéphalite auto-immune séronégative. *Canadian Medical Association Journal*, 193(8), E300-E301. <https://doi.org/10.1503/cmaj.200424-f>
- Althaus, A. L., Moore, S. J., Zhang, H., Du, X., Murphy, G. G., & Parent, J. M. (2019). Altered Synaptic Drive onto Birthdated Dentate Granule Cells in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 39(38), 7604-7614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-18.2019>
- Aly, M., & Ranganath, C. (2018). New perspectives on the hippocampus and memory. *Neuroscience Letters*, 680, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.047>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus : Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In *Progress in Brain Research* (Vol. 163, p. 3-790). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation : A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Anderson, N. E., & Barber, P. A. (2008). Limbic encephalitis – a review. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15(9), 961-971. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2007.12.003>
- Angulo, M. C. (2004). Glutamate Released from Glial Cells Synchronizes Neuronal Activity in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24(31), 6920-6927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004>
- Ariño, H., Armangué, T., Petit-Pedrol, M., Sabater, L., Martinez-Hernandez, E., Hara, M., Lancaster, E., Saiz, A., Dalmau, J., & Graus, F. (2016). Anti-LGI1–associated cognitive impairment : Presentation and long-term outcome. *Neurology*, 87(8), 759-765. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003009>
- Awasthi, A., Ramachandran, B., Ahmed, S., Benito, E., Shinoda, Y., Nitzan, N., Heukamp, A., Rannio, S., Martens, H., Barth, J., Burk, K., Wang, Y. T., Fischer, A., & Dean, C. (2019). Synaptotagmin-3 drives AMPA receptor endocytosis, depression of synapse strength, and forgetting. *Science*, 363(6422), eaav1483. <https://doi.org/10.1126/science.aav1483>

- Bak, T. H., Antoun, N., Balan, K. K., & Hodges, J. R. (2001). *Memory lost, memory regained : Neuropsychological findings and neuroimaging in two cases of paraneoplastic limbic encephalitis with radically diVerent outcomes*. 8.
- Barria, A. (1997). Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII During Long-Term Potentiation. *Science*, 276(5321), 2042-2045. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2042>
- Bartesaghi, R., Migliore, M., & Gessi, T. (2006). Input–output relations in the entorhinal cortex–dentate–hippocampal system : Evidence for a non-linear transfer of signals. *Neuroscience*, 142(1), 247-265. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.001>
- Bats, C., Groc, L., & Choquet, D. (2007). The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, 53(5), 719-734. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.030>
- Benarroch, E. E. (2012). ADAM proteins, their ligands, and clinical implications. *Neurology*, 78(12), 914-920. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824c4728>
- Benes, F. M. (1999). Evidence for altered trisynaptic circuitry in schizophrenic hippocampus. *Biological Psychiatry*, 46(5), 589-599. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00136-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00136-5)
- Benoy, A., Dasgupta, A., & Sajikumar, S. (2018). Hippocampal area CA2 : An emerging modulatory gateway in the hippocampal circuit. *Experimental Brain Research*, 236(4), 919-931. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5187-5>
- Besser, S., Sicker, M., Marx, G., Winkler, U., Eulenburg, V., Hülsmann, S., & Hirrlinger, J. (2015). A Transgenic Mouse Line Expressing the Red Fluorescent Protein tdTomato in GABAergic Neurons. *PLOS ONE*, 10(6), e0129934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129934>
- Bierley, R. A., Kesner, R. P., & Novak, J. M. (s. d.). *Episodic Long-Term Memory in the Rat : Effects of Hippocampal Stimulation*. 7.
- Binks, S. N. M., Klein, C. J., Waters, P., Pittock, S. J., & Irani, S. R. (2018). LGI1, CASPR2 and related antibodies : A molecular evolution of the phenotypes. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 89(5), 526-534. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-315720>
- Binks, S., Varley, J., Lee, W., Makuch, M., Elliott, K., Gelfand, J. M., Jacob, S., Leite, M. I., Maddison, P., Chen, M., Geschwind, M. D., Grant, E., Sen, A., Waters, P., McCormack, M., Cavalleri, G. L., Barnardo, M., Knight, J. C., & Irani, S. R. (2018). Distinct HLA associations of LGI1 and CASPR2-antibody diseases. *Brain*, 141(8), 2263-2271. <https://doi.org/10.1093/brain/awy109>

- Bissen, D., Foss, F., & Acker-Palmer, A. (2019). AMPA receptors and their minions : Auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(11), 2133-2169. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03068-7>
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331-356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bloch, K. C., & Glaser, C. A. (2015). Encephalitis Surveillance through the Emerging Infections Program, 1997–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 21(9). <https://doi.org/10.3201/eid2109.150295>
- Bloss, E. B., & Hunter, R. G. (2010). Hippocampal Kainate Receptors. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 82, p. 167-184). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82009-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82009-6)
- Boillot, M., Huneau, C., Marsan, E., Lehongre, K., Navarro, V., Ishida, S., Dufresnois, B., Ozkaynak, E., Garrigue, J., Miles, R., Martin, B., Leguern, E., Anderson, M. P., & Baulac, S. (2014). Glutamatergic neuron-targeted loss of LGI1 epilepsy gene results in seizures. *Brain*, 137(11), 2984-2996. <https://doi.org/10.1093/brain/awu259>
- Boillot, M., Lee, C.-Y., Allene, C., Leguern, E., Baulac, S., & Rouach, N. (2016). LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. *Scientific Reports*, 6(1), 21769. <https://doi.org/10.1038/srep21769>
- Bolshakov, V., & Siegelbaum, S. (1995). Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science*, 269(5231), 1730-1734. <https://doi.org/10.1126/science.7569903>
- Brazel, C. Y., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., & Levison, S. W. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress in Neurobiology*, 69(1), 49-69. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00002-9)
- Brodtkorb, E., Nakken, K. O., & Steinlein, O. K. (2003). No evidence for a seriously increased malignancy risk in LGI1-caused epilepsy. *Epilepsy Research*, 56(2-3), 205-208. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2003.09.006>
- Brunger, A. T., Choi, U. B., Lai, Y., Leitz, J., White, K. I., & Zhou, Q. (2019). The pre-synaptic fusion machinery. *Current Opinion in Structural Biology*, 54, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.007>

- Budhram, A., Leung, A., Nicolle, M. W., & Burneo, J. G. (2019). Diagnosing autoimmune limbic encephalitis. *Canadian Medical Association Journal*, *191*(19), E529-E534. <https://doi.org/10.1503/cmaj.181548>
- Buzsáki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, *33*(3), 325-340. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00586-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00586-X)
- Caeser, M., & Aertsen, A. (1991). Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *The Journal of Comparative Neurology*, *307*(1), 87-106. <https://doi.org/10.1002/cne.903070109>
- Cameron, H. A., & Glover, L. R. (2015). Adult Neurogenesis : Beyond Learning and Memory. *Annual Review of Psychology*, *66*(1), 53-81. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015006>
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? *Neural Plasticity*, *2008*, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2008/381243>
- Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S., & Siekevitz, P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions : Enrichment of different types of postsynaptic densities. *Journal of Cell Biology*, *86*(3), 831-845. <https://doi.org/10.1083/jcb.86.3.831>
- Catani, M., Dell'Acqua, F., & Thiebaut de Schotten, M. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1724-1737. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.001>
- Chabrol, E., Navarro, V., Provenzano, G., Cohen, I., Dinocourt, C., Rivaud-Péchoux, S., Fricker, D., Baulac, M., Miles, R., LeGuern, E., & Baulac, S. (2010). Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice. *Brain*, *133*(9), 2749-2762. <https://doi.org/10.1093/brain/awq171>
- Chang, K.-J., & Rasband, M. N. (2013). Excitable Domains of Myelinated Nerves. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 72, p. 159-192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417027-8.00005-2>
- Chernova, O. B., Somerville, R. P., & Cowell, J. K. (1998). A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene*, *17*(22), 2873-2881. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202481>
- Chevalyere, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 Pyramidal Neuron Synapses Define a Powerful Disynaptic Cortico-Hippocampal Loop. *Neuron*, *66*(4), 560-572. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013>

- Cho, K.-O., Lybrand, Z. R., Ito, N., Brulet, R., Tafacory, F., Zhang, L., Good, L., Ure, K., Kerner, S. G., Birnbaum, S. G., Scharfman, H. E., Eisch, A. J., & Hsieh, J. (2015). Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nature Communications*, 6(1), 6606. <https://doi.org/10.1038/ncomms7606>
- Choquet, D. (2018). Linking Nanoscale Dynamics of AMPA Receptor Organization to Plasticity of Excitatory Synapses and Learning. *The Journal of Neuroscience*, 38(44), 9318-9329. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-18.2018>
- Choquet, D., & Hosy, E. (2020). AMPA receptor nanoscale dynamic organization and synaptic plasticities. *Current Opinion in Neurobiology*, 63, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.04.003>
- Cianci, V., Labate, A., Lanza, P., Vincent, A., Gambardella, A., Branca, D., Arcudi, L., & Aguglia, U. (2010). Non-paraneoplastic limbic encephalitis characterized by mesio-temporal seizures and extratemporal lesions : A case report. *Seizure*, 19(7), 446-449. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.06.002>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity : Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18-41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., & Bussey, T. J. (2009). A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science*, 325(5937), 210-213. <https://doi.org/10.1126/science.1173215>
- Coan, E. J., & Collingridge, G. L. (1985). *MAGNESIUM IONS BLOCK AN N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR-MEDIATED COMPONENT OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN RAT HIPPOCAMPUS*. 6.
- Cobar, L. F., Yuan, L., & Tashiro, A. (2017). Place cells and long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.10.010>
- Compans, B., Choquet, D., & Hosy, E. (2016). Review on the role of AMPA receptor nano-organization and dynamic in the properties of synaptic transmission. *Neurophotonics*, 3(4), 041811. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.4.041811>
- Connors, B. W. (2017). Synchrony and so much more : Diverse roles for electrical synapses in neural circuits: Diverse Roles for Electrical Synapses. *Developmental Neurobiology*, 77(5), 610-624. <https://doi.org/10.1002/dneu.22493>

- Connors, B. W., & Long, M. A. (2004). ELECTRICAL SYNAPSES IN THE MAMMALIAN BRAIN. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 393-418. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128>
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 153-160. <https://doi.org/10.1038/nrn726>
- Corsellis, J. A. N., Goldberg, G. J., & Norton, A. R. (1968). "LIMBIC ENCEPHALITIS" AND ITS ASSOCIATION WITH CARCINOMA. *Brain*, 91(3), 481-496. <https://doi.org/10.1093/brain/91.3.481>
- Cui, Y., Liu, J., Luo, Y., He, S., Xia, Y., Zhang, Y., Yao, D., & Guo, D. (2020). Aberrant Connectivity During Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *International Journal of Neural Systems*, 30(05), 1950029. <https://doi.org/10.1142/S0129065719500291>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits : Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327-335. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Curti, S., & O'Brien, J. (2016). Characteristics and plasticity of electrical synaptic transmission. *BMC Cell Biology*, 17(S1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0091-y>
- D'Adamo, M. C., Liantonio, A., Rolland, J.-F., Pessia, M., & Imbrici, P. (2020). Kv1.1 Channelopathies : Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2935. <https://doi.org/10.3390/ijms21082935>
- Darnell, R. B. (2003). Paraneoplastic Syndromes Involving the Nervous System. *The New England Journal of Medicine*, 12.
- Dengler, C. G., Yue, C., Takano, H., & Coulter, D. A. (2017). Massively augmented hippocampal dentate granule cell activation accompanies epilepsy development. *Scientific Reports*, 7(1), 42090. <https://doi.org/10.1038/srep42090>
- Dharani, K. (2015). Memory. In *The Biology of Thought* (p. 53-74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800900-0.00003-8>
- Didelot, A., & Honnorat, J. (2009). Les encéphalites limbiques – Limbic encephalitis. *MISE AU POINT*, 6.
- Diering, G. H., Heo, S., Hussain, N. K., Liu, B., & Huganir, R. L. (2016). Extensive phosphorylation of AMPA receptors in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33), E4920-E4927. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610631113>
- Diering, G. H., & Huganir, R. L. (2018). The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron*, 100(2), 314-329. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018>

- Dodson, P. D., & Forsythe, I. D. (2004). Presynaptic K⁺ channels : Electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends in Neurosciences*, 27(4), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.02.012>
- Dogan Onugoren, M., Golombeck, K. S., Bien, C., Abu-Tair, M., Brand, M., Bulla-Hellwig, M., Lohmann, H., Münstermann, D., Pavenstädt, H., Thölking, G., Valentin, R., Wiendl, H., Melzer, N., & Bien, C. G. (2016). Immunoabsorption therapy in autoimmune encephalitides. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 3(2), e207. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000207>
- Duan, X., Kang, E., Liu, C. Y., Ming, G., & Song, H. (2008). Development of neural stem cell in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(1), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.04.001>
- Dubey, D., Britton, J., McKeon, A., Gadoth, A., Zekeridou, A., Lopez Chiriboga, S. A., Devine, M., Cerhan, J. H., Dunlay, K., Sagen, J., Ramberger, M., Waters, P., Irani, S. R., & Pittock, S. J. (2020). Randomized Placebo-Controlled Trial of Intravenous Immunoglobulin in Autoimmune LGI1/CASPR2 Epilepsy. *Annals of Neurology*, 87(2), 313-323. <https://doi.org/10.1002/ana.25655>
- Dubey, D., Pittock, S. J., Kelly, C. R., McKeon, A., Lopez-Chiriboga, A. S., Lennon, V. A., Gadoth, A., Smith, C. Y., Bryant, S. C., Klein, C. J., Aksamit, A. J., Toledano, M., Boeve, B. F., Tillema, J.-M., & Flanagan, E. P. (2018). Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis : Autoimmune Encephalitis. *Annals of Neurology*, 83(1), 166-177. <https://doi.org/10.1002/ana.25131>
- Dudek, F. E., & Sutula, T. P. (2007). Epileptogenesis in the dentate gyrus : A critical perspective. In *Progress in Brain Research* (Vol. 163, p. 755-773). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63041-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63041-6)
- Eichenbaum, H. (2017). On the Integration of Space, Time, and Memory. *Neuron*, 95(5), 1007-1018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.036>
- Eisch, A. J., Cameron, H. A., Encinas, J. M., Meltzer, L. A., Ming, G.-L., & Overstreet-Wadiche, L. S. (2008). Adult Neurogenesis, Mental Health, and Mental Illness : Hope or Hype? *Journal of Neuroscience*, 28(46), 11785-11791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3798-08.2008>
- Emperador-Melero, J., & Kaeser, P. S. (2020). Assembly of the presynaptic active zone. *Current Opinion in Neurobiology*, 63, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.03.008>

- Fares, J., Bou Diab, Z., Nabha, S., & Fares, Y. (2019). Neurogenesis in the adult hippocampus : History, regulation, and prospective roles. *International Journal of Neuroscience*, *129*(6), 598-611. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1545771>
- Feng, W., & Zhang, M. (2009). Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(2), 87-99. <https://doi.org/10.1038/nrn2540>
- Finke, C., Prüss, H., Heine, J., Reuter, S., Kopp, U. A., Wegner, F., Then Bergh, F., Koch, S., Jansen, O., Münte, T., Deuschl, G., Ruprecht, K., Stöcker, W., Wandinger, K.-P., Paul, F., & Bartsch, T. (2017). Evaluation of Cognitive Deficits and Structural Hippocampal Damage in Encephalitis With Leucine-Rich, Glioma-Inactivated 1 Antibodies. *JAMA Neurology*, *74*(1), 50. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4226>
- Fossati, M., & Charrier, C. (2021). Trans-synaptic interactions of ionotropic glutamate receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, *66*, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.09.001>
- Foster, A. R., & Caplan, J. P. (2009). Paraneoplastic Limbic Encephalitis. *Psychosomatics*, *50*(2), 108-113. <https://doi.org/10.1176/appi.psy.50.2.108>
- Frotscher, M., & Léránth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry : A combined light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, *239*(2), 237-246. <https://doi.org/10.1002/cne.902390210>
- Fukata, Y. (2006). Epilepsy-Related Ligand/Receptor Complex LGI1 and ADAM22 Regulate Synaptic Transmission. *Science*, *313*(5794), 1792-1795. <https://doi.org/10.1126/science.1129947>
- Fukata, Y., Chen, X., Chiken, S., Hirano, Y., Yamagata, A., Inahashi, H., Sanbo, M., Sano, H., Goto, T., Hirabayashi, M., Kornau, H.-C., Prüss, H., Nambu, A., Fukai, S., Nicoll, R. A., & Fukata, M. (2021). LGI1–ADAM22–MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(3), e2022580118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022580118>
- Fukata, Y., Lovero, K. L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R. A., & Fukata, M. (2010). Disruption of LGI1–linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(8), 3799-3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914537107>

- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., & Hisatsune, T. (2003). Two Distinct Subpopulations of Nestin-Positive Cells in Adult Mouse Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience*, *23*(28), 9357-9366. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09357.2003>
- Gabellini, N., & Masola, V. (2009). Expression of LGI1 Impairs Proliferation and Survival of HeLa Cells. *International Journal of Cell Biology*, *2009*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2009/417197>
- Gadoth, A., Pittock, S. J., Dubey, D., McKeon, A., Britton, J. W., Schmeling, J. E., Smith, A., Kotsenas, A. L., Watson, R. E., Lachance, D. H., Flanagan, E. P., Lennon, V. A., & Klein, C. J. (2017). Expanded phenotypes and outcomes among 256 LGI1/CASPR2-IgG-positive patients: LGI1/CASPR2-IgG⁺ Patients. *Annals of Neurology*, *82*(1), 79-92. <https://doi.org/10.1002/ana.24979>
- Gadoth, A., Zekeridou, A., Klein, C. J., Thoreson, C. J., Majed, M., Dubey, D., Flanagan, E. P., McKeon, A., Jenkins, S. M., Lennon, V. A., & Pittock, S. J. (2018). Elevated LGI1-IgG CSF index predicts worse neurological outcome. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *5*(5), 646-650. <https://doi.org/10.1002/acn3.561>
- Gielen, M. (2010). Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate: Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *médecine/sciences*, *26*(1), 65-72. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026165>
- Goode, T. D., Tanaka, K. Z., Sahay, A., & McHugh, T. J. (2020). An Integrated Index: Engrams, Place Cells, and Hippocampal Memory. *Neuron*, *107*(5), 805-820. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.011>
- Granerod, J., Ambrose, H. E., Davies, N. W., Clewley, J. P., Walsh, A. L., Morgan, D., Cunningham, R., Zuckerman, M., Mutton, K. J., Solomon, T., Ward, K. N., Lunn, M. P., Irani, S. R., Vincent, A., Brown, D. W., & Crowcroft, N. S. (2010). Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: A multicentre, population-based prospective study. *The Lancet Infectious Diseases*, *10*(12), 835-844. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70222-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70222-X)
- Graus, F. (2001). Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: Analysis of 200 patients. *Brain*, *124*(6), 1138-1148. <https://doi.org/10.1093/brain/124.6.1138>
- Graus, F., & Dalmau, J. (2019). Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *16*(9), 535-548. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0194-4>

- Graus, F., Titulaer, M. J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C. G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R. C., Gelfand, J. M., Geschwind, M., Glaser, C. A., Honnorat, J., Höftberger, R., Iizuka, T., Irani, S. R., Lancaster, E., Leyboldt, F., Prüss, H., Rae-Grant, A., ... Dalmau, J. (2016). A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *The Lancet Neurology*, *15*(4), 391-404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9)
- Groc, L., & Choquet, D. (2006). AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking : Multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell and Tissue Research*, *326*(2), 423-438. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0254-9>
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F. A., Lounis, B., & Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, *7*(7), 695-696. <https://doi.org/10.1038/nn1270>
- Gu, W., Brodtkorb, E., Piepoli, T., Finocchiaro, G., & Steinlein, O. K. (2005). LGI1 : A gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics*, *6*(2), 59-66. <https://doi.org/10.1007/s10048-005-0216-5>
- Harris, K. P., & Littleton, J. T. (2015). Transmission, Development, and Plasticity of Synapses. *Genetics*, *201*(2), 345-375. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176529>
- Hébert, J., Riche, B., Vogrig, A., Muñoz-Castrillo, S., Joubert, B., Picard, G., Rogemond, V., Psimaras, D., Alentorn, A., Berzero, G., Desestret, V., Rabilloud, M., & Honnorat, J. (2020). Epidemiology of paraneoplastic neurologic syndromes and autoimmune encephalitides in France. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, *7*(6), e883. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000883>
- Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(6), 337-350. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37>
- Hermetter, C., Fazekas, F., & Hochmeister, S. (2018). Systematic Review : Syndromes, Early Diagnosis, and Treatment in Autoimmune Encephalitis. *Frontiers in Neurology*, *9*, 706. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00706>
- Herranz-Pérez, V., Olucha-Bordonau, F. E., Morante-Redolat, J. M., & 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>
- Hiester, B. G., Becker, M. I., Bowen, A. B., Schwartz, S. L., & Kennedy, M. J. (2018). Mechanisms and Role of Dendritic Membrane Trafficking for Long-Term Potentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 391. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00391>

- Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, 508(7494), 88-92. <https://doi.org/10.1038/nature13028>
- Hivert, B., Marien, L., Agbam, K. N., & Faivre-Sarrailh, C. (2018). ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *Journal of Cell Science*, jcs.219774. <https://doi.org/10.1242/jcs.219774>
- Hoehne, A., McFadden, M. H., & DiGregorio, D. A. (2020). Feed-forward recruitment of electrical synapses enhances synchronous spiking in the mouse cerebellar cortex. *eLife*, 9, e57344. <https://doi.org/10.7554/eLife.57344>
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). *Cloned Glutamate Receptors*. 78.
- Honorat, J. (2010). Autoimmune limbic encephalitis: An expanding concept. *The Lancet Neurology*, 9(1), 24-25. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70333-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70333-3)
- Honorat, J., Cartalat-Carel, S., Ricard, D., Camdessanche, J. P., Carpentier, A. F., Rogemond, V., Chapuis, F., Aguera, M., Decullier, E., Duchemin, A. M., Graus, F., & Antoine, J. C. (2008). Onco-neural antibodies and tumour type determine survival and neurological symptoms in paraneoplastic neurological syndromes with Hu or CV2/CRMP5 antibodies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 80(4), 412-416. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.138016>
- Hosy, E., Butler, C., & Sibarita, J.-B. (2014). Organization and dynamics of AMPA receptors inside synapses—Nano-organization of AMPA receptors and main synaptic scaffolding proteins revealed by super-resolution imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 20, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.017>
- Houser, C. R. (2007). *Interneurons of the dentate gyrus: An overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity*. 17.
- Hsia, H.-E., Tüshaus, J., Brummer, T., Zheng, Y., Scilabra, S. D., & Lichtenthaler, S. F. (2019). Functions of ‘A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)’ in the mammalian nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(16), 3055-3081. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03173-7>
- Iorio, R., Spagni, G., & Masi, G. (2019). Paraneoplastic neurological syndromes. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 36(4), 279-292. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2019.06.005>
- Irani, S. R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K. A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B., & Vincent, A. (2010). Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan’s syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*, 133(9), 2734-2748. <https://doi.org/10.1093/brain/awq213>

- Irani, S. R., Michell, A. W., Lang, B., Pettingill, P., Waters, P., Johnson, M. R., Schott, J. M., Armstrong, R. J. E., S. Zagami, A., Bleasel, A., Somerville, E. R., Smith, S. M. J., & Vincent, A. (2011). Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Annals of Neurology*, *69*(5), 892-900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307>
- Irani, S. R., Michell, A. W., Lang, B., Pettingill, P., Waters, P., Johnson, M. R., Schott, J. M., Armstrong, R. J. E., S. Zagami, A., Bleasel, A., Somerville, E. R., Smith, S. M. J., & Vincent, A. (2011). Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Annals of Neurology*, *69*(5), 892-900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307>
- Irani, S. R., Stagg, C. J., Schott, J. M., Rosenthal, C. R., Schneider, S. A., Pettingill, P., Pettingill, R., Waters, P., Thomas, A., Voets, N. L., Cardoso, M. J., Cash, D. M., Manning, E. N., Lang, B., Smith, S. J. M., Vincent, A., & Johnson, M. R. (2013). Faciobrachial dystonic seizures : The influence of immunotherapy on seizure control and prevention of cognitive impairment in a broadening phenotype. *Brain*, *136*(10), 3151-3162. <https://doi.org/10.1093/brain/awt212>
- Isaac, J. T. R., Ashby, M. C., & McBain, C. J. (2007). The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron*, *54*(6), 859-871. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001>
- Jakubs, K., Nanobashvili, A., Bonde, S., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., Kokaia, M., & Lindvall, O. (2006). Environment Matters : Synaptic Properties of Neurons Born in the Epileptic Adult Brain Develop to Reduce Excitability. *Neuron*, *52*(6), 1047-1059. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.004>
- Jefferis, R., & Kumararatne, D. S. (2008). Selective IgG subclass deficiency : Quantification and clinical relevance. *Clinical & Experimental Immunology*, *81*(3), 357-367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05339.x>
- Jorquera, R. A., Huntwork-Rodriguez, S., Akbergenova, Y., Cho, R. W., & Littleton, J. T. (2012). Complexin Controls Spontaneous and Evoked Neurotransmitter Release by Regulating the Timing and Properties of Synaptotagmin Activity. *Journal of Neuroscience*, *32*(50), 18234-18245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3212-12.2012>
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J., & Südhof, T. C. (2011). RIM Proteins Tether Ca²⁺ Channels to Presynaptic Active Zones via a Direct PDZ-Domain Interaction. *Cell*, *144*(2), 282-295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.029>
- Kakegawa, W., Katoh, A., Narumi, S., Miura, E., Motohashi, J., Takahashi, A., Kohda, K., Fukazawa, Y., Yuzaki, M., & Matsuda, S. (2018). Optogenetic Control of Synaptic

- AMPA Receptor Endocytosis Reveals Roles of LTD in Motor Learning. *Neuron*, 99(5), 985-998.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.034>
- Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., Winawer, M., Barker-Cummings, C., Boneschi, F. M., Choi, C., Morozov, P., Das, K., Teplitskaya, E., Yu, A., Cayanis, E., Penchaszadeh, G., Kottmann, A. H., Pedley, T. A., Hauser, W. A., Ottman, R., & Gilliam, T. C. (2002). Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nature Genetics*, 30(3), 335-341. <https://doi.org/10.1038/ng832>
- Kamalova, A., & Nakagawa, T. (2021). AMPA receptor structure and auxiliary subunits. *The Journal of Physiology*, 599(2), 453-469. <https://doi.org/10.1113/JP278701>
- Kedzierska, K., & Koutsakos, M. (2020). The ABC of Major Histocompatibility Complexes and T Cell Receptors in Health and Disease. *Viral Immunology*, 33(3), 160-178. <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0184>
- Kegel, L., Aunin, E., Meijer, D., & Bermingham, J. R. (2013). LGI Proteins in the Nervous System. *ASN Neuro*, 5(3), AN20120095. <https://doi.org/10.1042/AN20120095>
- Kelley, B. P., Patel, S. C., Marin, H. L., Corrigan, J. J., Mitsias, P. D., & Griffith, B. (2017). Autoimmune Encephalitis : Pathophysiology and Imaging Review of an Overlooked Diagnosis. *American Journal of Neuroradiology*, 38(6), 1070-1078. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5086>
- Kim, T.-J., Lee, S.-T., Moon, J., Sunwoo, J.-S., Byun, J.-I., Lim, J.-A., Shin, Y.-W., Jun, J.-S., Lee, H. S., Lee, W.-J., Yang, A. R., Choi, Y., Park, K.-I., Jung, K.-H., Jung, K.-Y., Kim, M., Lee, S. K., & Chu, K. (2017). Anti-LGI1 encephalitis is associated with unique HLA subtypes : HLA Subtypes in Anti-LGI1 Encephalitis. *Annals of Neurology*, 81(2), 183-192. <https://doi.org/10.1002/ana.24860>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116-R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Ko, J., & Kim, E. (2007). Leucine-rich repeat proteins of synapses. *Journal of Neuroscience Research*, 85(13), 2824-2832. <https://doi.org/10.1002/jnr.21306>
- Kobayashi, K. S., & van den Elsen, P. J. (2012). NLRC5 : A key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 12(12), 813-820. <https://doi.org/10.1038/nri3339>
- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H.-Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I. R., & Tonegawa, S. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature Neuroscience*, 17(2), 269-279. <https://doi.org/10.1038/nn.3614>

- Kornau, H., Kreye, J., Stumpf, A., Fukata, Y., Parthier, D., Sammons, R. P., Imbrosci, B., Kurpjuweit, S., Kowski, A. B., Fukata, M., Prüss, H., & Schmitz, D. (2020). Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGI1 Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *Annals of Neurology*, *87*(3), 405-418. <https://doi.org/10.1002/ana.25666>
- Kuhn, H. G., Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Adult Hippocampal Neurogenesis : A Coming-of-Age Story. *The Journal of Neuroscience*, *38*(49), 10401-10410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2144-18.2018>
- Kunapuli, P., Chitta, K. S., & Cowell, J. K. (2003). Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene*, *22*(26), 3985-3991. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206584>
- Kusuzawa, S., Honda, T., Fukata, Y., Fukata, M., Kanatani, S., Tanaka, D. H., & Nakajima, K. (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*(3), 2284-2292. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08129.x>
- Lai, M., Huijbers, M. G., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J. K., & Dalmau, J. (2010). Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels : A case series. *The Lancet Neurology*, *9*(8), 776-785. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70137-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70137-X)
- Lai, Y., Choi, U. B., Leitz, J., Rhee, H. J., Lee, C., Altas, B., Zhao, M., Pfuetzner, R. A., Wang, A. L., Brose, N., Rhee, J., & Brunger, A. T. (2017). Molecular Mechanisms of Synaptic Vesicle Priming by Munc13 and Munc18. *Neuron*, *95*(3), 591-607.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.004>
- Lancaster, E. (2016). The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *Journal of Clinical Neurology*, *12*(1), 1. <https://doi.org/10.3988/jcn.2016.12.1.1>
- 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>
- Laroche, S. (2010). Mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire. *Biologie Aujourd'hui*, *204*(2), 93-102. <https://doi.org/10.1051/jbio/2010006>
- Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Gallagher, M., & Huganir, R. L. (2003). Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic

- Plasticity and Retention of Spatial Memory. *Cell*, 112(5), 631-643.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00122-3)
- Lehmann-Horn, K., Irani, S. R., Wang, S., Palanichamy, A., Jahn, S., Greenfield, A. L., Dandekar, R., Lepennetier, G., Michael, S., Gelfand, J. M., Geschwind, M. D., Wilson, M. R., Zamvil, S. S., & von Büdingen, H.-C. (2020). Intrathecal B-cell activation in LGII antibody encephalitis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 7(2), e669. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000669>
- Lein, E. S., Callaway, E. M., Albright, T. D., & Gage, F. H. (2005). Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction. *The Journal of Comparative Neurology*, 485(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1002/cne.20426>
- Leonardi, E., Andrezza, S., Vanin, S., Busolin, G., Nobile, C., & Tosatto, S. C. E. (2011). A Computational Model of the LGII Protein Suggests a Common Binding Site for ADAM Proteins. *PLoS ONE*, 6(3), e18142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018142>
- Li, Y., Stam, F. J., Aimone, J. B., Goulding, M., Callaway, E. M., & Gage, F. H. (2013). Molecular layer perforant path-associated cells contribute to feed-forward inhibition in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9106-9111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306912110>
- Lieberwirth, C., Pan, Y., Liu, Y., Zhang, Z., & Wang, Z. (2016). Hippocampal adult neurogenesis : Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Research*, 1644, 127-140. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.015>
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Ranganath, C., & Redish, A. D. (2017). Viewpoints : How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1434-1447. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>
- Liu, G., Choi, S., & Tsien, R. W. (1999). Variability of Neurotransmitter Concentration and Nonsaturation of Postsynaptic AMPA Receptors at Synapses in Hippocampal Cultures and Slices. *Neuron*, 22(2), 395-409. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81099-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81099-5)
- Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., & Hernández, F. (2015). Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Experimental Neurology*, 263, 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.10.021>
- Long, L.-L., Song, Y.-M., Xu, L., Yi, F., Long, H.-Y., Zhou, L., Qin, X.-H., Feng, L., & Xiao, B. (2014). Aberrant neuronal synaptic connectivity in CA1 area of the hippocampus from pilocarpine-induced epileptic rats observed by fluorogold. 9.

- Lovero, K. L., Fukata, Y., Granger, A. J., Fukata, M., & Nicoll, R. A. (2015). The LGI1–ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(30), E4129–E4137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511910112>
- Luscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(6), a005710–a005710. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Ma, C., Li, W., Xu, Y., & Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin–Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(5), 542–549. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2047>
- Markovic, I., Basic, S., & Devedjija, S. (2020). Aggressive anti-LGI1 encephalitis defeated by one cycle of intravenous rituximab—A case report. *Neurological Sciences*, *41*(7), 1949–1950. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04264-1>
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic Plasticity and Memory : An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, *23*(1), 649–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
- Maximov, A., Tang, J., Yang, X., Pang, Z. P., & Sudhof, T. C. (2009). Complexin Controls the Force Transfer from SNARE Complexes to Membranes in Fusion. *Science*, *323*(5913), 516–521. <https://doi.org/10.1126/science.1166505>
- Mercer, A., Trigg, H. L., & Thomson, A. M. (2007). Characterization of Neurons in the CA2 Subfield of the Adult Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *27*(27), 7329–7338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1829-07.2007>
- Michelucci, R., Poza, J. J., Sofia, V., Feo, M. R. de, Binelli, S., Bisulli, F., Scudellaro, E., Simionati, B., Zimbello, R., D’Orsi, G., Passarelli, D., Avoni, P., Avanzini, G., Tinuper, P., Biondi, R., Valle, G., Mautner, V. F., Stephani, U., Tassinari, C. A., ... Nobile, C. (2003). Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy : Clinical Spectrum, New Epitempin Mutations, and Genetic Heterogeneity in Seven European Families: FAMILIAL LATERAL TEMPORAL EPILEPSY. *Epilepsia*, *44*(10), 1289–1297. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.20003.x>
- Milner, C. M., & Campbell, R. D. (1992). Genes and Genomes : Genes, Genes and More Genes in the Human Major Histocompatibility Complex. *BioEssays*, *14*(8), 565–571. <https://doi.org/10.1002/bies.950140814>
- Mochida, S. (2018). Presynaptic calcium channels. *Neuroscience Research*, *127*, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.012>

- Mohrmann, R., de Wit, H., Verhage, M., Neher, E., & Sorensen, J. B. (2010). Fast Vesicle Fusion in Living Cells Requires at Least Three SNARE Complexes. *Science*, 330(6003), 502-505. <https://doi.org/10.1126/science.1193134>
- Montbrió, E., & Pazó, D. (2020). Exact Mean-Field Theory Explains the Dual Role of Electrical Synapses in Collective Synchronization. *Physical Review Letters*, 125(24), 248101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.125.248101>
- Morante-Redolat, J. M. (2002). Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Human Molecular Genetics*, 11(9), 1119-1128. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1119>
- Morris, R. G. M. (2003). Long-term potentiation and memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1432), 643-647. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1230>
- Moscovitch, M., Cabeza, R., Winocur, G., & Nadel, L. (2016). Episodic Memory and Beyond : The Hippocampus and Neocortex in Transformation. *Annual Review of Psychology*, 67(1), 105-134. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143733>
- Moser, E. I., Moser, M.-B., & McNaughton, B. L. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation : A history. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1448-1464. <https://doi.org/10.1038/nn.4653>
- Muller, U., & Kubie, J. L. (1987). The Effects of Changes in the Environment on the Spatial Firing of Hippocampal Complex-Spike Cells. *The Journal of Neuroscience*, 18.
- Muñiz-Castrillo, S., Haesebaert, J., Thomas, L., Vogrig, A., Pinto, A.-L., Picard, G., Blanc, C., Do, L.-D., Joubert, B., Berzero, G., Psimaras, D., Alentorn, A., Rogemond, V., Dubois, V., Ambati, A., Tamouza, R., Mignot, E., & Honnorat, J. (2021). Clinical and Prognostic Value of Immunogenetic Characteristics in Anti-LGI1 Encephalitis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 8(3), e974. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000974>
- Muñiz-Castrillo, S., Vogrig, A., & Honnorat, J. (2020). Associations between HLA and autoimmune neurological diseases with autoantibodies. *Autoimmunity Highlights*, 11(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0124-6>
- Nair, D., Hosity, E., Petersen, J. D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., & Sibarita, J.-B. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *Journal of Neuroscience*, 33(32), 13204-13224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013>

- Navarro, V., Kas, A., Apartis, E., Chami, L., Rogemond, V., Levy, P., Psimaras, D., Habert, M.-O., Baulac, M., Delattre, J.-Y., Honnorat, J., & collaborators. (2016). Motor cortex and hippocampus are the two main cortical targets in LGI1-antibody encephalitis. *Brain*, *139*(4), 1079-1093. <https://doi.org/10.1093/brain/aww012>
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus : A neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(1), 65-75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Newman, M. P., Blum, S., Wong, R. C. W., Scott, J. G., Prain, K., Wilson, R. J., & Gillis, D. (2016). Autoimmune encephalitis: Autoimmune encephalitis. *Internal Medicine Journal*, *46*(2), 148-157. <https://doi.org/10.1111/imj.12974>
- Nguyen, L. H., & Anderson, A. E. (2018). MTOR-dependent alterations of Kv1.1 subunit expression in the neuronal subset-specific Pten knockout mouse model of cortical dysplasia with epilepsy. *Scientific Reports*, *8*(1), 3568. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21656-8>
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, *60*(3), 275-301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
- Nicoll, R. A. (2006). Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type Glutamate Receptors. *Science*, *311*(5765), 1253-1256. <https://doi.org/10.1126/science.1123339>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors : Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*(1), 295-322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>
- Ohkawa, T., Fukata, Y., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yokoi, N., Takashima, H., Watanabe, M., Watanabe, O., & Fukata, M. (2013). Autoantibodies to Epilepsy-Related LGI1 in Limbic Encephalitis Neutralize LGI1-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience*, *33*(46), 18161-18174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013>
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171-175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- O'Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, *3*(3), 317-330. <https://doi.org/10.1002/hipo.450030307>

- Opitz, B. (2014). Memory Function and the Hippocampus. In K. Szabo & M. G. Hennerici (Éds.), *Frontiers of Neurology and Neuroscience* (Vol. 34, p. 51-59). S. KARGER AG. <https://doi.org/10.1159/000356422>
- Ottman, R., Risch, N., Hauser, W. A., Pedley, T. A., Lee, J. H., Barker-Cummings, C., Lustenberger, A., Nagle, K. J., Lee, K. S., Scheuer, M. L., Neystat, M., Susser, M., & Wilhelmson, K. C. (1995). Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nature Genetics*, *10*(1), 56-60. <https://doi.org/10.1038/ng0595-56>
- Pack, A. M. (2019). Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, *25*(2), 306-321. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000707>
- Pang, C. C.-C., Kiecker, C., O'Brien, J. T., Noble, W., & Chang, R. C.-C. (2019). Ammon's Horn 2 (CA2) of the Hippocampus : A Long-Known Region with a New Potential Role in Neurodegeneration. *The Neuroscientist*, *25*(2), 167-180. <https://doi.org/10.1177/1073858418778747>
- Pavlidis, C., & Winson, J. (1989). Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes. *The Journal of Neuroscience*, *9*(8), 2907-2918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-08-02907.1989>
- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., & McBain, C. J. (2017a). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiological Reviews*, *97*(4), 1619-1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>
- Penn, A. C., Zhang, C. L., Georges, F., Royer, L., Breillat, C., Hosy, E., Petersen, J. D., Humeau, Y., & Choquet, D. (2017a). Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature*, *549*(7672), 384-388. <https://doi.org/10.1038/nature23658>
- Perugino, C. A., & Stone, J. H. (2020). IgG4-related disease : An update on pathophysiology and implications for clinical care. *Nature Reviews Rheumatology*, *16*(12), 702-714. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0500-7>
- Petit-Pedrol, M., Sell, J., Planagumà, J., Mannara, F., Radosevic, M., Haselmann, H., Ceanga, M., Sabater, L., Spatola, M., Soto, D., Gasull, X., Dalmau, J., & Geis, C. (2018). LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awy253>
- Piepoli, T., Jakupoglu, C., Gu, W., Lualdi, E., Suarez-Merino, B., Poliani, P. L., Cattaneo, M. G., Ortino, B., Goplen, D., Wang, J., Mola, R., Inverardi, F., Frassoni, C., Bjerkvig, R.,

- Steinlein, O., Vicentini, L. M., Brüstle, O., & Finocchiaro, G. (2006). Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro-Oncology*, 8(2), 96-108. <https://doi.org/10.1215/15228517-2005-006>
- Piskorowski, R. A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S. I., Siegelbaum, S. A., Gogos, J. A., & Chevaleyre, V. (2016). Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron*, 89(1), 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.036>
- Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F., Parisi, J. E., Benarroch, E. E., Mokri, B., Stephan, C. L., Kim, K.-K., Kilimann, M. W., & Lennon, V. A. (2005). Amphiphysin autoimmunity : Paraneoplastic accompaniments. *Annals of Neurology*, 58(1), 96-107. <https://doi.org/10.1002/ana.20529>
- Planagumà, J., Haselmann, H., Mannara, F., Petit-Pedrol, M., Grünewald, B., Aguilar, E., Röpke, L., Martín-García, E., Titulaer, M. J., Jercog, P., Graus, F., Maldonado, R., Geis, C., & Dalmau, J. (2016). Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. *Annals of Neurology*, 80(3), 388-400. <https://doi.org/10.1002/ana.24721>
- PosÅ, uszny, A. (2014). The contribution of electrical synapses to field potential oscillations in the hippocampal formation. *Frontiers in Neural Circuits*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00032>
- Querol Pascual, M. R. (2007). Temporal Lobe Epilepsy: Clinical Semiology and Neurophysiological Studies. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 28(6), 416-423. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2007.09.004>
- Ramberger, M., Berretta, A., Tan, J. M. M., Sun, B., Michael, S., Yeo, T., Theorell, J., Bashford-Rogers, R., Paneva, S., O'Dowd, V., Dedi, N., Topia, S., Griffin, R., Ramirez-Franco, J., El Far, O., Baulac, S., Leite, M. I., Sen, A., Jeans, A., ... Irani, S. R. (2020). Distinctive binding properties of human monoclonal LGI1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain*, 143(6), 1731-1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa104>
- Renard, D., Collombier, L., Lippi, A., Honnorat, J., & Thouvenot, E. (2016). Cyclophosphamide-responsive Lgi1-related limbic encephalitis with basal ganglia hypermetabolism. *Acta Neurologica Belgica*, 116(3), 379-381. <https://doi.org/10.1007/s13760-015-0567-0>

- Rihn, L. L., & Claiborne, B. J. (1990). Dendritic growth and regression in rat dentate granule cells during late postnatal development. *Developmental Brain Research*, *54*(1), 115-124. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90071-6](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90071-6)
- Robinson, N. T. M., Descamps, L. A. L., Russell, L. E., Buchholz, M. O., Bicknell, B. A., Antonov, G. K., Lau, J. Y. N., Nutbrown, R., Schmidt-Hieber, C., & Häusser, M. (2020). Targeted Activation of Hippocampal Place Cells Drives Memory-Guided Spatial Behavior. *Cell*, *183*(6), 1586-1599.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.061>
- Roche, K. W., O'Brien, R. J., Mammen, A. L., Bernhardt, J., & Huganir, R. L. (1996). Characterization of Multiple Phosphorylation Sites on the AMPA Receptor GluR1 Subunit. *Neuron*, *16*(6), 1179-1188. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80144-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80144-0)
- Rolls, E. T. (2019). The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain Structure and Function*, *224*(9), 3001-3018. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01945-2>
- Rosanoff, M. J., & Ottman, R. (2008). Penetrance of LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology*, *71*(8), 567-571. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000323926.77565.ee>
- Roth, R. H., Zhang, Y., & Huganir, R. L. (2017). Dynamic imaging of AMPA receptor trafficking in vitro and in vivo. *Current Opinion in Neurobiology*, *45*, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.03.008>
- Sagane, K., Ishihama, Y., & Sugimoto, H. (2008). LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *International Journal of Biological Sciences*, *387*-396. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.387>
- Scheefhals, N., & MacGillavry, H. D. (2018). Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *91*, 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.05.002>
- Schmerler, D. A., Roller, S., & Espay, A. J. (2016). Teaching Video Neuro *Images* : Faciobrachial dystonic seizures: Pathognomonic phenomenology. *Neurology*, *86*(6), e60-e61. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002359>
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S41-S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Schulte, U., Thumfart, J.-O., Klöcker, N., Sailer, C. A., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., Wangler, T., Knaus, H.-G., & Fakler, B. (2006). The Epilepsy-Linked Lgi1 Protein Assembles into Presynaptic Kv1 Channels and Inhibits

- Inactivation by Kv β 1. *Neuron*, 49(5), 697-706.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.033>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. In K. Szabo & M. G. Hennerici (Éds.), *Frontiers of Neurology and Neuroscience* (Vol. 34, p. 6-17). S. KARGER AG. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schwenk, J., Baehrens, D., Haupt, A., Bildl, W., Boudkkazi, S., Roeper, J., Fakler, B., & Schulte, U. (2014). Regional Diversity and Developmental Dynamics of the AMPA-Receptor Proteome in the Mammalian Brain. *Neuron*, 84(1), 41-54.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.044>
- Seagar, M., Russier, M., Caillard, O., Maulet, Y., Fronzaroli-Molinieres, L., De San Feliciano, M., Boumedine-Guignon, N., Rodriguez, L., Zbili, M., Usseglio, F., Formisano-Tréziny, C., Youssouf, F., Sangiardi, M., Boillot, M., Baulac, S., Benitez, M. J., Garrido, J.-J., Debanne, D., & El Far, O. (2017). LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), 7719-7724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618656114>
- Senechal, K. R., Thaller, C., & Noebels, J. L. (2005). ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Human Molecular Genetics*, 14(12), 1613-1620. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi169>
- Shackelford, P. G., Granoff, D. M., Polmar, S. H., Scott, M. G., Goskowitz, M. C., Madassery, J. V., & Nahm, M. H. (1990). Subnormal serum concentrations of IgG2 in children with frequent infections associated with varied patterns of immunologic dysfunction. *The Journal of Pediatrics*, 116(4), 529-538. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)81598-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)81598-7)
- Shaikh, S. A., Dolino, D. M., Lee, G., Chatterjee, S., MacLean, D. M., Flatebo, C., Landes, C. F., & Jayaraman, V. (2016). Stargazin Modulation of AMPA Receptors. *Cell Reports*, 17(2), 328-335. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.014>
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005678-a005678.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
- Shepherd, J. D., & Huganir, R. L. (2007). The Cell Biology of Synaptic Plasticity: AMPA Receptor Trafficking. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 613-643. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516>
- Sinha, R., Ahmed, S., Jahn, R., & Klingauf, J. (2011). Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 108(34), 14318-14323.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1101818108>
- Sinnen, B. L., Bowen, A. B., Forte, J. S., Hiester, B. G., Crosby, K. C., Gibson, E. S., Dell'Acqua, M. L., & Kennedy, M. J. (2017). Optogenetic Control of Synaptic Composition and Function. *Neuron*, 93(3), 646-660.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.037>
- Sirerol-Piquer, M. S., Ayerdi-Izquierdo, A., Morante-Redolat, J. M., Herranz-Pérez, V., Favell, K., Barker, P. A., & Pérez-Tur, J. (2006). The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Human Molecular Genetics*, 15(23), 3436-3445. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl421>
- Sloviter, R. S. (1999). Status Epilepticus-induced Neuronal Injury and Network Reorganization. *Epilepsia*, 40(s1), s34-s39. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00876.x>
- Smith, D. M., & Mizumori, S. J. Y. (2006). Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus*, 16(9), 716-729. <https://doi.org/10.1002/hipo.20208>
- Sola-Valls, N., Ariño, H., Escudero, D., Solana, E., Lladó, A., Sánchez-Valle, R., Blanco, Y., Saiz, A., Dalmau, J., & Graus, F. (2020). Telemedicine assessment of long-term cognitive and functional status in anti-leucine-rich, glioma-inactivated 1 encephalitis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 7(2), e652. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000652>
- Sollid, L. M., Pos, W., & Wucherpfennig, K. W. (2014). Molecular mechanisms for contribution of MHC molecules to autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology*, 31, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.08.005>
- Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), 39-44. <https://doi.org/10.1038/417039a>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655-669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Südhof, T. C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron*, 75(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter Release : The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron*, 80(3), 675-690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Sugar, J., & Moser, M. (2019). Episodic memory : Neuronal codes for what, where, and when. *Hippocampus*, 29(12), 1190-1205. <https://doi.org/10.1002/hipo.23132>

- Taha Abdulaziz, A., Zhang, L., Zhou, D., & Li, J. (2017). Hippocampal Sclerosis in LGI1 and CSPR2 Positive Limbic Encephalopathy: Case Report. *Neuropsychiatry*, *07*(05). <https://doi.org/10.4172/Neuropsychiatry.1000256>
- Tang, A.-H., Chen, H., Li, T. P., Metzbower, S. R., MacGillavry, H. D., & Blanpied, T. A. (2016). A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature*, *536*(7615), 210-214. <https://doi.org/10.1038/nature19058>
- Tfilin, M., & Turgeman, G. (2019). Interleukine-17 Administration Modulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Improves Spatial Learning in Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *69*(2), 254-263. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01354-4>
- Thompson, J., Bi, M., Murchison, A. G., Makuch, M., Bien, C. G., Chu, K., Farooque, P., Gelfand, J. M., Geschwind, M. D., Hirsch, L. J., Somerville, E., Lang, B., Vincent, A., Leite, M. I., Waters, P., Irani, S. R., Faciobrachial Dystonic Seizures Study Group, Dogan-Onugoren, M., Rae-Grant, A., ... Shin, Y. (2018). The importance of early immunotherapy in patients with faciobrachial dystonic seizures. *Brain*, *141*(2), 348-356. <https://doi.org/10.1093/brain/awx323>
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*, *11*(8), 901-907. <https://doi.org/10.1038/nm.2156>
- Towlson, E. K., Vértés, P. E., Yan, G., Chew, Y. L., Walker, D. S., Schafer, W. R., & Barabási, A.-L. (2018). *Caenorhabditis elegans* and the network control framework—FAQs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1758), 20170372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0372>
- Trosclair, K., Dhaibar, H. A., Gautier, N. M., Mishra, V., & Glasscock, E. (2020). Neuron-specific Kv1.1 deficiency is sufficient to cause epilepsy, premature death, and cardiorespiratory dysregulation. *Neurobiology of Disease*, *137*, 104759. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104759>
- Tunkel, A. R., Glaser, C. A., Bloch, K. C., Sejvar, J. J., Marra, C. M., Roos, K. L., Hartman, B. J., Kaplan, S. L., Scheld, W. M., & Whitley, R. J. (2008). The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *47*(3), 303-327. <https://doi.org/10.1086/589747>
- Turetsky, D. (2005). Stargazin Modulates Native AMPA Receptor Functional Properties by Two Distinct Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, *25*(32), 7438-7448. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-05.2005>

- Tüzün, E., & Dalmau, J. (2007). Limbic Encephalitis and Variants : Classification, Diagnosis and Treatment. *The Neurologist*, *13*(5), 261-271. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31813e34a5>
- van Sonderen, A., Petit-Pedrol, M., Dalmau, J., & Titulaer, M. J. (2017). The value of LGI1, Caspr2 and voltage-gated potassium channel antibodies in encephalitis. *Nature Reviews Neurology*, *13*(5), 290-301. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.43>
- van Sonderen, A., Roelen, D. L., Stoop, J. A., Verdijk, R. M., Haasnoot, G. W., Thijs, R. D., Wirtz, P. W., Schreurs, M. W. J., Claas, F. H. J., Sillevs Smitt, P. A. E., & Titulaer, M. J. (2017). Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4 : Anti-LGI1 Encephalitis. *Annals of Neurology*, *81*(2), 193-198. <https://doi.org/10.1002/ana.24858>
- van Sonderen, A., Thijs, R. D., Coenders, E. C., Jiskoot, L. C., Sanchez, E., de Bruijn, M. A. A. M., van Coevorden-Hameete, M. H., Wirtz, P. W., Schreurs, M. W. J., Sillevs Smitt, P. A. E., & Titulaer, M. J. (2016). Anti-LGI1 encephalitis : Clinical syndrome and long-term follow-up. *Neurology*, *87*(14), 1449-1456. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000003173>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *60*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Venkatesan, A., Tunkel, A. R., Bloch, K. C., Loring, A. S., Sejvar, J., Bitnun, A., Stahl, J.-P., Mailles, A., Drebot, M., Rupprecht, C. E., Yoder, J., Cope, J. R., Wilson, M. R., Whitley, R. J., Sullivan, J., Granerod, J., Jones, C., Eastwood, K., Ward, K. N., ... Cherry, J. (2013). Case Definitions, Diagnostic Algorithms, and Priorities in Encephalitis : Consensus Statement of the International Encephalitis Consortium. *Clinical Infectious Diseases*, *57*(8), 1114-1128. <https://doi.org/10.1093/cid/cit458>
- Vertes, R. P., & Mckenna, J. T. (2000). *Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus*. 13.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes : From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vogrig, A., Muñoz-Castrillo, S., Desestret, V., Joubert, B., & Honorat, J. (2020). Pathophysiology of paraneoplastic and autoimmune encephalitis : Genes, infections, and checkpoint inhibitors. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *13*, 175628642093279. <https://doi.org/10.1177/1756286420932797>

- Vogrig, A., Pauletto, G., Lettieri, C., Valente, M., & Gigli, G. L. (2019). Peculiar EEG signatures, ictal drinking and long-term follow-up in anti-LGI1 encephalitis. *Neurological Sciences, 40*(7), 1503-1505. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-3729-7>
- Volterra, A., & Steinhäuser, C. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus: Glia and Synaptic Transmission in the Hippocampus. *Glia, 47*(3), 249-257. <https://doi.org/10.1002/glia.20080>
- Wang, J. Q., Arora, A., Yang, L., Parelkar, N. K., Zhang, G., Liu, X., Choe, E. S., & Mao, L. (2005). Phosphorylation of AMPA Receptors: Mechanisms and Synaptic Plasticity. *Molecular Neurobiology, 32*(3), 237-250. <https://doi.org/10.1385/MN:32:3:237>
- Wang, S., Li, Y., Gong, J., Ye, S., Yang, X., Zhang, R., & Ma, C. (2019). Munc18 and Munc13 serve as a functional template to orchestrate neuronal SNARE complex assembly. *Nature Communications, 10*(1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08028-6>
- Wenthold, J., Petralia, S., & Niedzielski, S. (1996). *Evidence for Multiple AMPA Receptor Complexes in Hippocampal CA1/CA2 Neurons*. 8.
- Wixted, J. T., & Squire, L. R. (2011). The medial temporal lobe and the attributes of memory. *Trends in Cognitive Sciences, 15*(5), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.03.005>
- Wu, D., Bacaj, T., Morishita, W., Goswami, D., Arendt, K. L., Xu, W., Chen, L., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2017). Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. *Nature, 544*(7650), 316-321. <https://doi.org/10.1038/nature21720>
- Yamagata, A., & Fukai, S. (2020). Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1–ADAM22. *Cellular and Molecular Life Sciences, 77*(2), 267-274. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03269-0>
- Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., Maeda, A., Goto, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Shirouzu, M., Fukata, Y., Fukata, M., & Fukai, S. (2018). Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nature Communications, 9*(1), 1546. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03947-w>
- Yokoi, N., Fukata, Y., Kase, D., Miyazaki, T., Jaegle, M., Ohkawa, T., Takahashi, N., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Imoto, K., Meijer, D., Watanabe, M., & Fukata, M. (2015). Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nature Medicine, 21*(1), 19-26. <https://doi.org/10.1038/nm.3759>

- Yu, R. Q., Cooke, M., Seib, D. R., Zhao, J., & Snyder, J. S. (2019). Adult neurogenesis promotes efficient, nonspecific search strategies in a spatial alternation water maze task. *Behavioural Brain Research*, *376*, 112151. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112151>
- Yu, Y. E., Wen, L., Silva, J., Li, Z., Head, K., Sossey-Alaoui, K., Pao, A., Mei, L., & Cowell, J. K. (2010). Lgi1 null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability. *Human Molecular Genetics*, *19*(9), 1702-1711. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq047>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, *132*(4), 645-660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhao, M., Choi, Y.-S., Obrietan, K., & Dudek, S. M. (2007). Synaptic Plasticity (and the Lack Thereof) in Hippocampal CA2 Neurons. *Journal of Neuroscience*, *27*(44), 12025-12032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4094-07.2007>
- Zhou, Y.-D., Lee, S., Jin, Z., Wright, M., Smith, S. E. P., & Anderson, M. P. (2009a). Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nature Medicine*, *15*(10), 1208-1214. <https://doi.org/10.1038/nm.2019>
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., & Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation : Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nature Neuroscience*, *3*(11), 1098-1106. <https://doi.org/10.1038/80614>

Annexes

Tableaux des résultats (Annexe 1)

Liste des publications :

1. **Fels, E.**, Muñoz-Castrillo, S., Vogrig, A., Joubert, B., Honnorat, J., & Pascual, O. (2021). Role of LGI1 protein in synaptic transmission: From physiology to pathology. *Neurobiology of Disease*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105537> (Annexe 2)
2. The dysregulation of the hippocampal neuronal network by LGI1 auto-antibodies. **Elodie Fels**, Marie-Eve Mayeur, Clémentine Vincent, Estelle Wayere, Jérôme Honnorat, Olivier Pascual. En préparation. (Annexe 3)

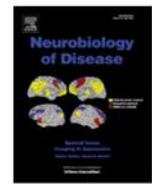
Tableaux des résultats :

		LGI1 P1	LGI1 P2	LGI1 P3	LGI1 P4
L'expression des R-AMPA sur les neurones <i>in vitro</i> est-elle modulée par les IgG LGI1 ?		Diminution (*p<0,05)	Diminution (**p<0,01)	Pas d'effet	Pas d'effet
Les IgG LGI1 modulent-elles l'expression des R-AMPA sur les neurones inhibiteurs <i>in vitro</i> ?	Densité des clusters GluA1	Pas d'effet		Pas d'effet	
	Sous-unités GluA1 synaptiques	Augmentation (**p<0,01)		Augmentation (**p<0,01)	
Les IgG LGI1 induisent-elle une modification fonctionnelle sur l'excitabilité du réseau neuronal <i>in vitro</i>		Pas d'effet		Pas d'effet	

Tableau 1. Résultats obtenus sur le modèle *in vitro* à partir de cultures primaires de neurones d'hippocampe incubées avec les IgG LGI1 P1-4. Les résultats ont été comparés à la condition contrôle avec les IgG ctrl.

		LGI1 P1	LGI1 P2	LGI1 P3	LGI1 P4
Quel est l'effet des IgG sur la régulation de l'activité du réseau neuronal dans l'hippocampe ?	Hyper-excitabilité globale	Augmentation de l'hyper-excitabilité (**p<0,01)	Pas d'effet	Augmentation de l'hyperexcitabilité (**p<0,01)	Pas d'effet
	Hyper-excitabilité globale lors du blocage du réseau inhibiteur	Annule la différence	Pas d'effet	Annule la différence	Pas d'effet
Les IgG LGI1 modulent-elles l'expression des R-AMPA dans l'hippocampe de souris ?	Densité des clusters GluA1			Pas d'effet	
	Aire des clusters GluA1			Pas d'effet	
	Densité des sous-unités GluA1			Diminution sur les neurones inhibiteurs et excitateurs du GD (**p<0,001), Pas d'effet sur les neurones des régions CA3 et CA1	
	Nombre de sous-unités GluA1 par clusters			Diminution sur les neurones inhibiteurs et excitateurs du GD (**p<0,001), Pas d'effet sur les neurones des régions CA3 et CA1	

Tableau 2. Résultats obtenus *ex vivo* à partir de tranches d'hippocampe de souris infusées avec les IgG LGI1. Les résultats ont été comparés à la condition contrôle avec les IgG ctrl.



Review

Role of LGI1 protein in synaptic transmission: From physiology to pathology

Elodie Fels^{a, b}, Sergio Muñoz-Castrillo^{a, b, c}, Alberto Vogrig^{a, b, c}, Bastien Joubert^{b, c}, Jérôme Honnorat^{a, bc, *}, Olivier Pascual^{a, b, *}

^a Synaptopathies and Auto-antibodies (SynatAc) Team, Institut NeuroMyoGène, INSERM U1217/CNRS UMR 5310, Universités de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

^b Université Claude Bernard Lyon 1, Universités de Lyon, Lyon, France

^c French Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndromes and Autoimmune Encephalitis, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Autoimmune limbic encephalitis
Autosomal dominant temporal lobe epilepsy
Trans-synaptic complex
Synaptic transmission

ABSTRACT

Leucine-Rich Glioma Inactivated protein 1 (LGI1) is a secreted neuronal protein highly expressed in the central nervous system and high amount are found in the hippocampus. An alteration of its function has been described in few families of patients with autosomal dominant temporal lobe epilepsy (ADLTE) or with autoimmune limbic encephalitis (LE), both characterized by epileptic seizures. Studies have shown that LGI1 plays an essential role during development, but also in neuronal excitability through an action on voltage-gated potassium Kv1.1 channels, and in synaptic transmission by regulating the surface expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA-R). Over the last decade, a growing number of studies investigating LGI1 functions have been published. They aimed to improve the understanding of LGI1 function in the regulation of neuronal networks using different animal and cellular models. LGI1 appears to be a major actor of synaptic regulation by modulating trans-synaptically pre- and post-synaptic proteins. In this review, we will focus on LGI1 binding partners, "A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 22 and 23", the complex they form at the synapse, and will discuss the effects of LGI1 on neuronal excitability and synaptic transmission in physiological and pathological conditions. Finally, we will highlight new insights regarding N-terminal Leucine-Rich Repeat (LRR) domain and C-terminal Epitempin repeat (EPTP) domain and their potentially distinct role in LGI1 function.

1. Introduction

Leucine-Rich Glioma Inactivated Protein 1 (LGI1) is a 60-kDa protein, highly expressed in the central nervous system (CNS), that exhibits a strong expression profile in the hippocampus (Senechal et al., 2005). LGI1 interacts with proteins of the "A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)" family such as ADAM22 and ADAM23 (Ohkawa et al., 2013; Sagane et al., 2008). LGI1 is secreted by neurons and is composed of an N-terminal domain enriched in Leucine, called Leucine-Rich Repeat domain (LRR), and a C-terminal Epitempin (EPTP) repeat domain (Fig. 1.a). Mutations of the *LGI1* gene have been found in patients with a rare

inherited form of epilepsy called autosomal dominant temporal lobe epilepsy (ADLTE) (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat, 2002). Investigations on how dysfunctions of LGI1 cause epileptic seizures attributed an essential role of LGI1 during the maturation of the neuronal network in the CNS (Zhou et al., 2009). More recently, autoantibodies (Abs) against LGI1 have been described in a subtype of adult patients with autoimmune limbic encephalitis (LE) (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010). LE with LGI1-Abs (LGI1-LE) is one of the most common type of LE and the Abs seem to play a direct role in the memory deficits and epileptic seizures characteristic of this disease (Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Hébert et al., 2020). Thereby, studying and un-

Abbreviations: LGI1, Leucine-Rich Glioma Inactivated Protein 1; ADLTE, Autosomal dominant temporal lobe epilepsy; AMPA-R, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors; ADAM, A Disintegrin And Metalloprotease; LRR, Leucine-Rich Repeat domain; EPTP, Epitempin domain; (m)Abs, (monoclonal) Auto-antibodies; (LGI1)-LE, (LGI1) limbic encephalitis; CNS, central nervous system; KO, knock-out; NMDA-R, N-methyl-D-aspartate receptors; FBDS, Facio-brachial dystonic seizures; HLA, Human leukocyte antigen; REM, Rapid eye movement; FLAIR, Temporal fluid-attenuated inversion recovery; EEG, Electroencephalogram; SLADH, Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone; ADPEAF, Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features; TARP, Transmembrane AMPA-R regulatory protein; mEPSC, Miniature excitatory post-synaptic currents; CSF, cerebrospinal fluid

* Corresponding authors at: Institut NeuroMyoGène, UCBL – CNRS UMR 5310 – INSERM U1217, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 3ème étage, Couloir AB, 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

E-mail addresses: jerome.honnorat@chu-lyon.fr (J. Honnorat), olivier.pascual@inserm.fr (O. Pascual).

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105537>

Received 30 June 2021; Received in revised form 20 October 2021; Accepted 21 October 2021
0969-9961/© 2021

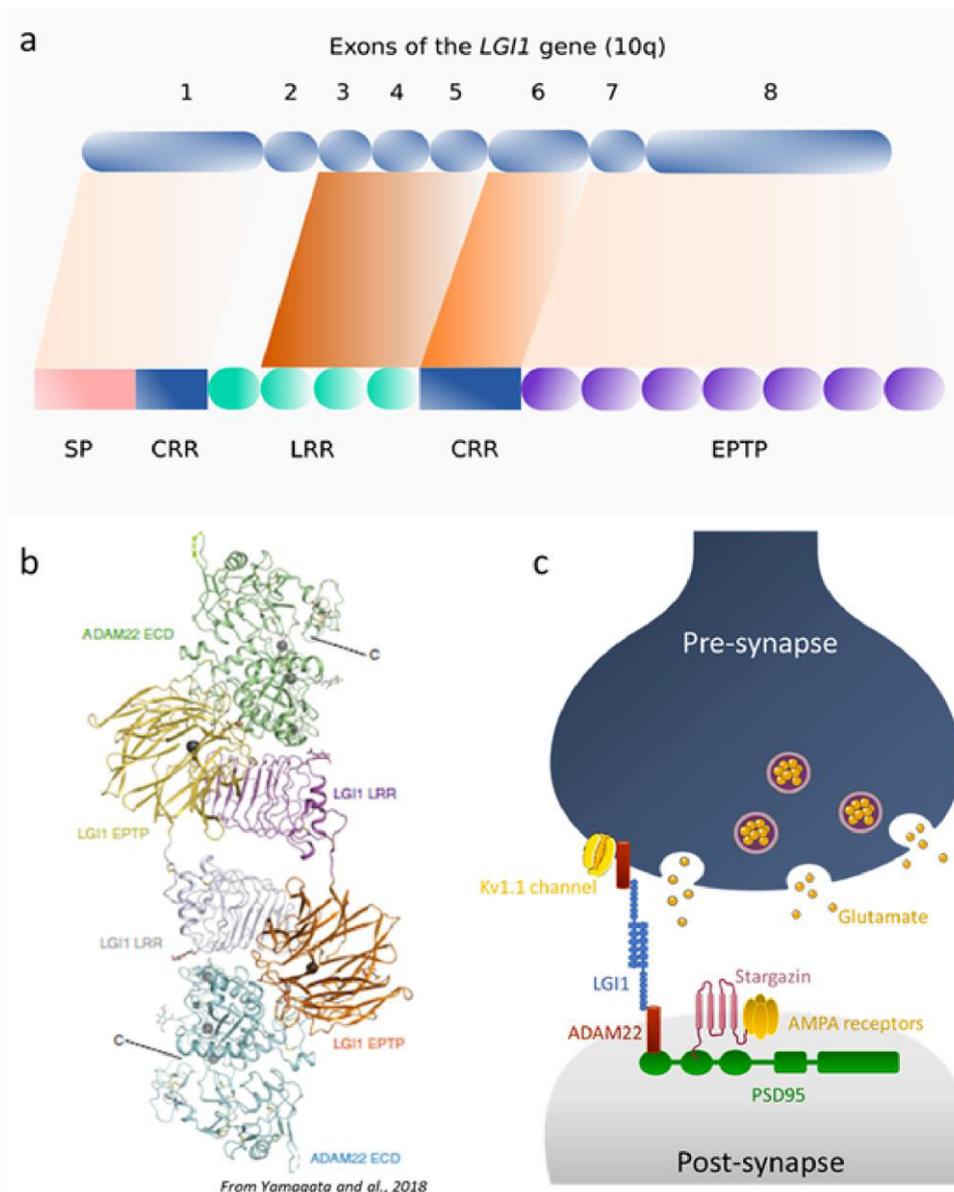


Fig. 1. *LGI1* gene structure and interaction. The *LGI1* gene is located on chromosome 10q and is composed of exon 1, encoding the signal peptide (SP) and the first cysteine-rich region (CRR), exons 2–5, encoding the LRR domain, exon 6, encoding the second CRR, and exons 7–8, encoding the EPTP domain. In *LGI1* encephalitis patients, mutations occur throughout the *LGI1* gene, but the density of mutations (illustrated here according to the intensity of the orange polygons) is particularly elevated in exon 4 and also in exons 3 and 5 (a). The *LGI1*-ADAM22 complex interaction. The LRR domain of a first *LGI1* protein interacts with the EPTP domain of a second *LGI1* protein to form a homodimeric complex. The EPTP domain of *LGI1* interacts with the ADAM22 protein. From Yamagata et al. (2018). (b) The *LGI1*-ADAM22 complex forms a trans-synaptic complex connecting pre- and post-synaptic proteins. The post-synaptic ADAM22 interacts with the PDZ-domain of PSD95 and modulates AMPA-R through the regulatory protein Stargazin, which also binds to PSD95. At the pre-synaptic side, *LGI1* binds ADAM22 or ADAM23 and modulates Kv1.1 channel (c).

Understanding the pathologies associated with *LGI1* disturbance, are essential to improve diagnosis and treatment for these diseases. For this, it is necessary to investigate the underlying mechanisms regulated by *LGI1* and to understand the processes by which *LGI1* mutations or Abs disturb these mechanisms.

Thus, to better understand how dysfunctions of *LGI1* caused by mutations or Abs lead to epileptic seizures and cognitive disorders, cellular and murine models targeting *LGI1* have been developed. Notably, mice

knocked-out (KO) for *Lgi1* have been engineered, and they exhibit epileptic seizures at 2 weeks of age leading to death at about 3 weeks of age (Fukata et al., 2010). Later on, a model of mice infused with *LGI1*-Abs has allowed improving the understanding of *LGI1* synaptic function (Petit-Pedrol et al., 2018). *LGI1* has an essential role during the maturation of the neuronal network by acting on the refinement of the dendritic tree (Zhou et al., 2009), but it is also important in the regulation of synaptic transmission in the mature neuronal network (Petit-Pedrol

et al., 2018). LGI1 regulates the neuronal network at different stage of life by modulating neuronal excitability through Kv1.1 potassium channel expression (Petit-Pedrol et al., 2018; Schulte et al., 2006; Seagar et al., 2017) and by acting on the expression of AMPA-R (Fukata, 2006; Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015; Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018). LGI1 is involved in all these mechanisms through its interaction with its transmembrane partners ADAM22 and ADAM23.

Herein, we reviewed the CNS diseases related to LGI1 alterations (Table 1) and the consequences on synaptic transmission and neuronal excitability.

2. Diseases related to LGI1

2.1. Familial LGI1 mutations: Clinical characteristics

ADLTE, also known as autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF), is an uncommon genetic focal epilepsy syndrome (Ottman et al., 1995; Poza et al., n.d.). There is no sex predominance, and the first manifestations occur usually at the age of 18 years old, although the onset may vary from the early childhood to the fifth decade of life (Table 1). Clinically, ADLTE is characterized by focal seizures originating from the lateral temporal lobe, generally concomitant with auditory symptoms that may appear before the seizures as an aura or during a seizure as part of the ictal phase; receptive aphasia may also be either part of the aura or an ictal manifestation (Brodtkorb et al., 2002; Michelucci et al., 2003; Winawer et al., 2000). Additionally, patients may often have sensory, autonomic, and emotional symptoms, while secondary generalized seizures appear in more than 90% of the cases (Brodtkorb et al., 2002; Michelucci et al., 2003; Winawer et al., 2000). No neuroimaging abnormalities have been reported and in-

Table 1

Comparison of the main characteristics of ADLTE and LGI1-antibody encephalitis. Abbreviations: ADLTE, autosomal dominant temporal lobe epilepsy; CSF, cerebrospinal fluid; EEG, electroencephalogram; FBDS, facio-brachial dystonic seizures; HLA, human leukocyte antigen; LGI1, leucine-rich glioma-inactivated 1; MRI, magnetic resonance imaging.

	ADLTE	LGI1-antibody encephalitis
Age at onset	18 years	65 years
Sex predominance	No	Men ≈65%
Pathophysiology	Genetic 30% mutations in LGI1 20% mutations in RELN or MICAL1 50% unknown	Autoimmune Autoantibodies against LGI1 Genetic predisposition ≈90% HLA-DRB1*07:01
Seizures	Lateral temporal lobe seizures (>95%), typically with auditory symptoms Generalized tonic-clonic seizures (>90%)	Medial temporal lobe focal seizures (70–90%), typically with piloerection & bradycardia Generalized tonic-clonic seizures (≈50%) Facio-brachial dystonic seizures (pathognomonic, ≈50%)
EEG abnormalities	Interictal temporal abnormalities (≈50%)	Interictal temporal abnormalities (≈30%) Contralateral slow wave & electrodecremental response (FBDS)
Other clinical features	–	Cognitive deficits (>90%) Psychiatric symptoms (60–90%) Sleep disturbances (≈40%) Hyponatremia (≈60%)
MRI	Normal	Limbic hyperintensities (≈60%)
CSF	–	Inflammatory abnormalities (≈50%)
Treatment	Antiepileptic drugs	Immunotherapy
Prognosis	Seizure-freedom ≈50% for focal seizures, ≈100% for generalized seizures	Seizure-freedom (≈90%) Cognitive deficits (60–75%)

terictal electroencephalograms (EEG) are often normal. Patients usually respond well to antiepileptic drugs, achieving complete seizure-freedom at least for generalized seizures, although nearly half of them continue to present focal seizures (Table 1) (Winawer et al., 2000; Brodtkorb et al., 2002; Michelucci et al., 2003).

Approximately 30% of families with ADLTE have mutations in the *LGI1* gene located on chromosome 10q (Fig. 1.a). The remaining patients have mutations in other loci, such as *RELN* (7q) and *MICAL1* (6q) genes, although the genetic basis is still unknown in up to 50% of cases (Dazzo et al., 2018; Michelucci et al., 2017). *RELN* mutations seem to provoke a deficit in reelin secretion; this protein regulates cytoskeleton remodeling during neural development, being also involved in dendritic growth and synaptic plasticity (Michelucci et al., 2017). Similarly, *MICAL1* mutations cause an increased activity of the MICAL1 protein, altering the assembly of the actin filaments in the neural cytoskeleton (Dazzo et al., 2018). Nevertheless, whether an interaction between these two proteins or with LGI1 exist, is still unknown. However, there is not a clear correlation between genotype and phenotype, and patients with distinct mutations are clinically indistinguishable (Dazzo et al., 2018; Michelucci et al., 2017). Every LGI1 mutation is usually present in one single family, and the average penetrance has been reported to be nearly 70%; *de novo* mutations are extremely rare (Rosanoff and Ottman, 2008). Mutations have been described to occur across the entire *LGI1* gene sequence, but their density is especially high in the exons 3–5 encoding the LRR domain (Fig. 2.a) (Ho et al., 2012). More than 40 mutations have been reported so far, nearly two thirds are missense mutations and one third corresponds to truncation and deletion mutations (Ho et al., 2012; Yamagata and Fukai, 2020). Most pathogenic mutations lead to a deficient LGI1 secretion, likely due to a misfolding of the truncated protein, while other mutations without associated secretion impairment seem to decrease the affinity of LGI1 for its partners ADAM22 and ADAM23 (Siererol-Piquer et al., 2006; Yokoi et al., 2015; Dazzo et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020).

As *LGI1* genetic mutations lead to epilepsy in patients, this protein plays probably an essential role in neuronal network regulation. Thereby, investigating the mode of action of LGI1 is crucial to understand the mechanism underlying neuronal transmission, but also to provide adapted treatments to patients suffering from ADLTE.

2.2. LGI1 limbic encephalitis

LGI1-LE represents the second most frequent type of antibody-mediated autoimmune encephalitis after *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-Abs encephalitis (Hébert et al., 2020). In contrast to NMDAR-Abs and other types of autoimmune encephalitis that typically present a subacute onset, LGI1-LE displays a more protracted and sometimes subtle presentation (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010). Furthermore, the demographic profile of LGI1-Abs encephalitis patients highly differs from the one of NMDAR-Abs encephalitis patients, since the latter are typically 65-year-old (on average) men (Ariño et al., 2016; Irani et al., 2010; Lai et al., 2010; Muñoz-Castrillo et al., 2021; van Sonderen et al., 2016). In addition, the clinical picture of LGI1-LE displays prominent involvement of limbic areas on the one hand with cognitive impairment and temporal lobe seizures, and motor cortical areas on the other hand with facio-brachial dystonic seizures (FBDS) (Navarro et al., 2016). Although the clinical phenotype of LGI1-LE is now well characterized, the pathogenic mechanisms that lead to the immune tolerance breakdown against LGI1 are still unknown. Indeed, no infectious trigger has been reported so far, and tumor associations are extremely uncommon (10%) and controversial (van Sonderen et al., 2016). However, a strong association with human leukocyte antigen (HLA) DRB1*07:01, which is carried by nearly 90% of patients, has been recently described (Binks et al., 2018; Kim et al., 2017; van Sonderen et al., 2017; Mueller et al., 2018; Muñoz-Castrillo et al., 2021), suggesting that genetic predisposition and altered LGI1-derived peptides presentation might be

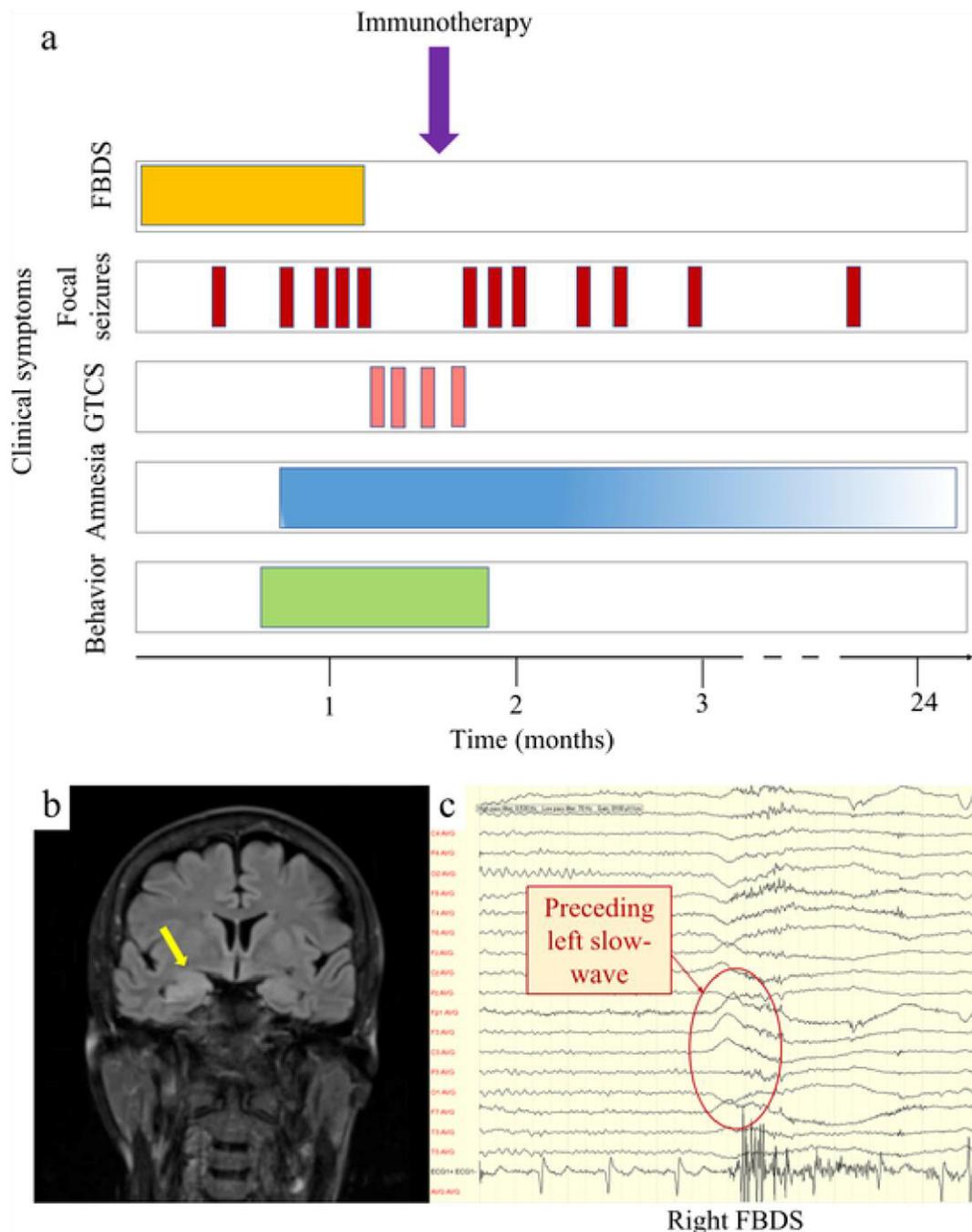


Fig. 2. Clinical vignette of a patient with LGII-Abs encephalitis. A 53-year-old woman with autoimmune thyroiditis developed frequent, stereotypical, jerky movements involving her right arm and leg. One month later, the patient developed temporal lobe seizures along with behavioral changes and prominent anterograde memory dysfunction (a). After hospital admission, a brain MRI showed FLAIR hyperintensity involving the mesial temporal lobes (R > L) (b). Video-EEG analysis permitted to characterize the abnormal movements as FBDS that were consistently preceded by a contralateral frontal slow wave (c). Immunotherapy with intravenous corticosteroids and immunoglobulin was administered with marked clinical improvement but persistence of mild memory disturbances at last follow-up (2 years after onset).

Abbreviations: FLAIR: fluid-attenuated inversion recovery; MRI: magnetic resonance imaging; FBDS: faciobrachial dystonic seizures; GTCS: generalized tonic-clonic seizures; Video-EEG: video-electroencephalogram.

important in the pathogenesis of the disease (Table 1) (Binks et al., 2018; Kim et al., 2017).

FBDS are considered as pathognomonic of LGII-LE, being a very strong clue towards this diagnosis when present (nearly half of the patients) (Irani et al., 2011, 2010; Vogrig et al., 2020). Their anatomical origin is unclear, although it seems to involve both the motor cortex and the basal ganglia based on data from magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) studies (Boesebeck et al., 2013; Flanagan et al., 2015; Navarro et al., 2016). They consist in

very brief contractions of the upper limb, often involving also the ipsilateral hemiface, and more uncommonly the lower limb, which may lead to falls. They are usually unilateral at onset but generally become bilateral later in the course of the disease, alternating from side to side (Vogrig et al., 2019). FBDS can repeat very frequently, up to several hundred episodes per day. They may appear even during sleep, and might be triggered by emotions or position changes (Irani et al., 2011). Typically, FBDS appear first, and are later followed gradually by temporal lobe focal seizures, then cognitive dysfunction, and finally tonic-

clonic seizures (Fig. 2.a) (Irani et al., 2011; van Sonderen et al., 2016). Cognitive impairment is usually severe and comprises both amnesic and executive functions (Ariño et al., 2016; Finke et al., 2017). In addition, apathy is frequent but patients may also show impulsive behavior, and even aggressiveness against themselves or their relatives (Ariño et al., 2016; Finke et al., 2017). Sleep disturbances are common, such as insomnia and rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder, as well as dysautonomia, mainly hyperhidrosis (Ariño et al., 2016; Irani et al., 2010; van Sonderen et al., 2016).

Diagnosis of LGII-LE may be challenging due to its progressive course that might be confounded with neurodegenerative disorders. Moreover, temporal fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) hyperintensities do not constitute a constant finding as they appear in approximately two thirds of patients (Fig. 2.b), while inflammatory CSF abnormalities are observed in only 50% (Ariño et al., 2016; Irani et al., 2010; van Sonderen et al., 2016; Muñiz-Castrillo et al., 2021). Similarly, at the early stages of the disease, EEG recordings can be normal even during FBDS, also hindering or delaying an accurate diagnosis. Even in cases of reportedly normal or nonspecific EEG alterations, a re-evaluation can reveal subtle but distinctive alterations prior to FBDS, usually in the form of a slow-wave contralateral to the FBDS (Fig. 2.c), or an ictal flattening of the EEG signal (electrodecremental response) (Navarro et al., 2016; Steriade et al., 2016; Vogrig et al., 2019). Hyponatremia due to a syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH) has been described as a typical finding, but is only present in 15–25% of patients (Ariño et al., 2016; Irani et al., 2010; Muñiz-Castrillo et al., 2021; van Sonderen et al., 2016). Regarding LGII-Abs, it is noteworthy that in contrast to other types of autoimmune encephalitides, the detection seems to be more sensitive in the

serum than in the CSF (Gadoth et al., 2017; Muñiz-Castrillo et al., 2020; van Sonderen et al., 2016); it is therefore of major importance to test both types of samples when there is a clinical suspicion of LGII-LE (Muñiz-Castrillo et al., 2021).

Immunotherapy is considered effective in LGII-LE, especially when administered early in the course of the disease (Fig. 3) (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010; van Sonderen et al., 2016). Steroids have been shown to prevent cognitive disturbances in patients presenting only with FBDS (Irani et al., 2013, 2011), with cessation rates of nearly 50% and 90% after 30 and 90 days of treatment, respectively (Thompson et al., 2018). Moreover, it was shown in the study that FBDS was achieved earlier with prompt immunotherapy in the absence of cognitive impairment (Thompson et al., 2018). Steroids were also the most frequently drugs used as first line immunotherapy in other large cohort, with initial response rates higher than 95%, although nearly 75% of the patients required maintenance immunosuppression (Gadoth et al., 2017). Intravenous immunoglobulin has been widely used as first line immunotherapy as well, alone or in combination with steroids (Ariño et al., 2016; Muñiz-Castrillo et al., 2020; Thompson et al., 2018; van Sonderen et al., 2016). Recently, they have been shown to have a positive effect in seizure control in a small clinical trial (Dubey et al., 2020). Rituximab and cyclophosphamide are often used as second-line treatment in up to half of patients, although they have not been associated with better outcomes, likely due to the fact that they are more commonly used in severely affected patients (Ariño et al., 2016; Finke et al., 2017; Muñiz-Castrillo et al., 2020; Sola-Valls et al., 2020). However, up to 75% of patients present some degree of long-term cognitive impairment despite (Fig. 2.a) (Ariño et al., 2016; Muñiz-Castrillo et al., 2020; Sola-Valls et al., 2020; van Sonderen et al., 2016), reflecting that cur-

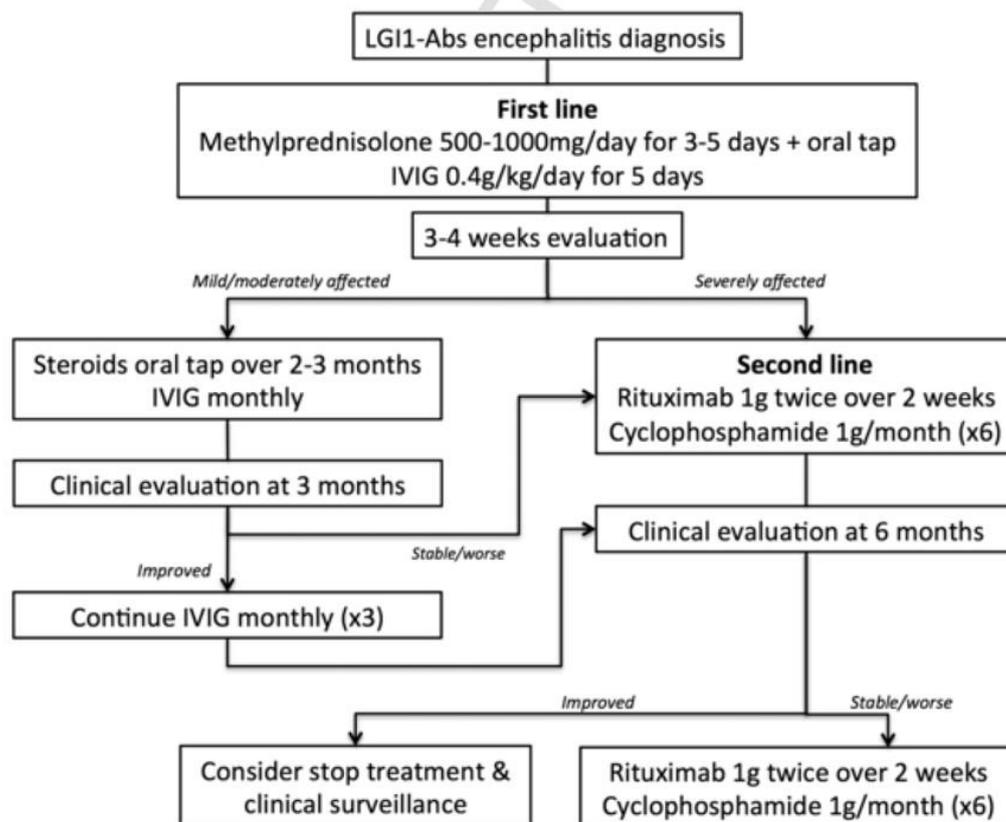


Fig. 3. Proposed therapeutic algorithm for LGII-Abs encephalitis. Abbreviations: Abs, antibodies; IVIG, intravenous immunoglobulin; LGII, leucine-rich glioma-inactivated 1.

rent management must be improved. Main cognitive sequelae include disturbances of verbal memory, fluency, and visuospatial abilities, very often accompanied by depression, anxiety, and fatigue in more than 50% of the patients (Binks et al., 2021; Sola-Valls et al., 2020). Conversely, long-term epilepsy is uncommon, being reported in nearly 10% of the cases (Table 1) (de Bruijn et al., 2019; Muñoz-Castrillo et al., 2021).

One of the remaining questions is to understand why these LGII-Abs are present in the serum and the CSF and what are their origins. Recent results are in favor of an intrathecal synthesis of monoclonal Abs (mAbs) in the CSF due to a chronic exposition to the antigen (Kornau et al., 2020; Lehmann-Horn et al., 2020). This result raised two questions to tackle: the first is to determine how LGII-Abs are produced at the periphery, and the second is to understand how B cells secreting LGII-Abs passed the blood-brain barrier to reach the CSF. Moreover, recent studies have highlighted that LGII-Abs are polyclonal and are able to react against both EPTP and LRR domains at the same ratio in the serum and, most of the time, in the CSF (Ramberger et al., 2020). Interestingly, these studies assumed both mAbs are pathogenic whereas until then, only the EPTP reactive mAbs were assumed to be pathogenic (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020).

3. The LGII synaptic complex

LGII protein is highly expressed in the CNS and particularly in the hippocampus. LGII is composed of an N-terminal LRR domain that is involved in LGII homodimerization through the residue E123. This residue interacts with the residue R474 of the C-terminal EPTP domain (Yamagata and Fukai, 2020). Thus, the C-terminal EPTP domain is essential for the homodimerization of LGII but also for its interaction with its transmembrane partners belonging to the ADAMs family members: ADAM22 and 23 (Ohkawa et al., 2013; Yamagata et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020) (Fig. 1.b). Although the ability of LGII to bind ADAM23 has been shown using ELISA tests (Sagane et al., 2008), or transfected HEK cells (Petit-Pedrol et al., 2018), the direct interaction in physiological conditions remains to be proven.

ADAM22 belongs to the PSD95 complex, found at excitatory synapses, and is anchored to PSD95 through its PDZ domain (Han and Kim, 2008; Hsia et al., 2019). It has been demonstrated that LGII indirectly regulates AMPA-R surface expression thanks to PSD95 interaction with Stargazin (Fukata, 2006). Stargazin is a transmembrane AMPA-R regulatory protein (TARP) that has been co-immunoprecipitated with LGII and ADAM22 (Fukata, 2006). Recently, it has been shown that LGII-ADAM22 complex forms a trans-synaptic heterodimer complex (Fig. 1.c) (Fukata et al., 2021; Yamagata et al., 2018). Indeed, LGII-ADAM22 pre-synaptic complex interacts with LGII-ADAM22 post-synaptic complex. This trans-synaptic complex is essential for the nano-alignment of pre-synaptic proteins with post-synaptic proteins, which is fundamental for efficient synaptic transmission (Fukata et al., 2021). Thus, the LGII-ADAM22 complex is at the center of a large protein complex including various pre- and post-synaptic proteins essential for proper synaptic organization (Fukata et al., 2021).

4. LGII function in the CNS

4.1. Developmental troubles

In order to understand the function of LGII in the regulation of the neuronal network and to investigate the causal link between LGII mutations and epileptic seizures, mouse models KO for the *Lgi1* gene have been generated (Boillot et al., 2016; Fukata et al., 2010; Zhou et al., 2009). These mouse models developed an epileptic seizure phenotype directly linking the genetic alteration of *LGII* to epilepsy (Fukata, 2006). Only homozygous mice triggered severe epileptic seizures

whereas heterozygous mice did not, even if they presented increased susceptibility to epileptogenic drugs (Fukata et al., 2010). The lack of LGII is concomitant with developmental troubles that are lethal for the animal (Zhou et al., 2009; Fukata et al., 2010). Indeed, *Lgi1* KO mice display epileptic seizures from 2 weeks after birth and die by 3 weeks after birth (Fukata et al., 2010). In other studies, mice expressing a truncated form of LGII found in patients with ADLTE were developed to investigate the specific mutations found in this disease (Yokoi et al., 2015; Zhou et al., 2009). In these transgenic lines, LGII alteration was either due to a defective secretion or to an inability to bind to its partner ADAM22 (Yokoi et al., 2015). These ADLTE mutations led to epileptic seizures and death 3 weeks after birth, as observed for the LGII-KO mice (Yokoi et al., 2015). Mice mutated in the EPTP domain of LGII displayed neuronal network development defects with an increased synaptic density due to an impairment in dendritic refinement (Zhou et al., 2009). Indeed, during the maturation of the neuronal network, the very developed dendritic tree is pruned, and some dendritic spines are removed (Rihn and Claiborne, 1990). Because of the epileptic seizures triggered by a dysfunction of LGII protein, electrophysiological recordings were performed to investigate the glutamatergic transmission in transgenic mice mutated for *Lgi1*. Studies showed that loss of LGII increased excitatory synaptic transmission whereas an overexpression of LGII decreased glutamatergic synaptic transmission (Boillot et al., 2016; Fukata, 2006; Zhou et al., 2009). Further studies investigated the molecular cause for this increase in glutamatergic transmission and revealed that the loss of LGII decreased ADAM22 overall expression (Fukata et al., 2010; Yokoi et al., 2015) but also modulated Kv1.1 channels and AMPA-R expression (Lovero et al., 2015; Zhou et al., 2009).

4.2. Neuronal excitability through kv1.1 channels

Kv1.1 channels belong to the *Shaker* family of Kv channels. Kv1.1 are highly expressed in the hippocampus where they are co-expressed with other channels of the *Shaker* family, comprising Kv1.4 channel and Kv β 1 subunit (D'Adamo et al., 2020). Kv1.1 are low-voltage activated channels that are rapidly inactivated when there are co-expressed with Kv1.4 and Kv β 1 (D'Adamo et al., 2020; Dodson and Forsythe, 2004). Kv1.1 is part of the large complex of protein formed by LGII-ADAM22 trans-synaptic complex (Fukata et al., 2021). A first study investigated the regulation of kv channels belonging to the voltage gated potassium channels complex (VGKC) by the LGII protein (Schulte et al., 2006). They transfected oocytes with plasmid expressing kv1.1, kv1.4, and kv β 1 channels and recorded by electrophysiology the potassium current when they added endogenous LGII. They observed that LGII prevents the rapid inactivation of Kv1.1 channels through Kv β 1 subunits (Schulte et al., 2006). Thereby, LGII may modulate Kv1.1 channel opening kinetics or surface expression (Schulte et al., 2006; Fukata et al., 2010). It is noteworthy that in the latter study, LGII function has been investigated on transfected oocytes that did not express ADAM22 (Schulte et al., 2006). Nevertheless, the role of LGII-ADAM22 on Kv1.1 channels has been confirmed in another study, investigating the effect of ADAM22 or ADAM23 and LGII on kv1.1 current (Lancaster et al., 2019). They showed that in HEK Ad293 cells co-transfected with ADAM22 and Kv1.1 channels, ADAM22 alone had no effect on Kv1.1 currents, while the presence of LGII with ADAM22 increased Kv1.1 currents (Lancaster et al., 2019).

Ex vivo studies investigated the underlying mechanisms of epileptic seizures in transgenic mice for *Lgi1*. Using early post-natal KO mice they have recorded an epileptiform activity due to an increase in glutamatergic synaptic transmission on CA1 region of hippocampal slices (Boillot et al., 2016). Regarding the absence of effect on the post-synaptic compartment, the authors suggested that the epileptic activity was caused by an alteration of the presynaptic compartment. Taking into account the presynaptic localization of Kv1.1 channels

(D'Adamo et al., 2020; Dodson and Forsythe, 2004), this result also supports the idea of a modulation of Kv1.1 channels by LGI1.

Altogether, these studies show that LGI1 modulates Kv1.1 channels. However, mechanisms underlying the regulation of kv1.1 expression by LGI1 are still unknown. Thus, future studies should determine if LGI1 regulates kv1.1 through ADAM22 or ADAM23, and if there are other intermediate proteins recruited in this regulation. Then, it will be important to investigate the mode of action of this regulation to know whether LGI1 directly or indirectly regulate the surface expression of kv1.1 channels. The neuronal network development abnormalities observed in transgenic mice (Fukata et al., 2010; Zhou et al., 2009) makes difficult the specific investigation of Kv1.1 channel functions in a mature neuronal network. Thus, further studies are needed to clearly decipher the mechanism of LGI1 modulation on Kv1.1 channel function.

4.3. Synaptic transmission through AMPA receptors

AMPA-R are excitatory post-synaptic receptors involved in glutamatergic synaptic transmission (Sheng and Lee, 2001). AMPA-R are regulated by LGI1-ADAM22 complex (Fukata, 2006; Lovero et al., 2015; Ohkawa et al., 2013). Indeed, ADAM22, the transmembrane partner of LGI1, interacts with PSD95, the scaffolding protein of excitatory synapses (Fukata, 2006). PSD95 interacts with Stargazin, a transmembrane AMPA-R regulatory protein (TARP) that modulates AMPA-R properties (Turetsky, 2005; Ben-Yaacov et al., 2017).

So far, investigations of LGI1 function have been focused mainly on AMPA-R regulation to understand the mechanisms leading to epileptic seizures when LGI1 function is disturbed. Immunostaining studies on the hippocampus of *Lgi1*-KO mice have found a significant decrease of the GluA1 subunit expression (Ohkawa et al., 2013). In addition, electrophysiological studies performed on hippocampal slices from *Lgi1*-KO mice have confirmed the alteration of glutamatergic currents when LGI1 was altered (Fukata, 2006; Lovero et al., 2015). Indeed, *ex vivo* recordings of glutamatergic currents on hippocampal slices from wild-type (WT) mice have shown that an addition of LGI1 increased AMPA-R currents (Fukata, 2006), whereas a deletion of LGI1 decreased AMPA-R currents (Lovero et al., 2015). Moreover, transfection of LGI1 on hippocampal slices from KO mice allows to restore AMPA-R currents (Lovero et al., 2015). However, a previous study investigating the synaptic transmission in *Lgi1*-KO mice has failed to demonstrate any post-synaptic effect (Boillot et al., 2016) when synaptic transmission was monitored before the epileptic status was installed.

This regulation of AMPA-R is quite intriguing. Indeed, AMPA-R are involved in synaptic excitatory transmission (Sheng and Lee, 2001), and LGI1-alteration diseases are characterized by epileptic seizures translated into neuronal network hyperexcitability. Although most studies have agreed on an action of LGI1 on AMPA-R, the decrease of AMPA-R expression when LGI1 function is impaired is quite unexpected and in contradiction with the hyperexcitability observed during epileptic seizures. Up until now, this contradiction remains unexplained, but two hypotheses have been proposed to explain this result. First, the reduction of AMPA-R expression in the absence of LGI1 could be due to the homeostatic regulation following the kv1.1 channels downregulation (Seagar et al., 2017). Second, the hyperexcitability of the neuronal network associated with a downregulation of AMPA-R would probably affect more the inhibitory network. This would decrease the inhibitory transmission (Ohkawa et al., 2013). Nevertheless, none of these hypotheses have been demonstrated. Recently, the specific nano-organization of AMPA-R into clusters at the surface of synapses has been shown to be more relevant in synaptic transmission than the overall expression of AMPA-R at the surface of neurons. (Nair et al., 2013; Choquet and Hosy, 2020). Future studies are required to clarify the role of LGI1 on AMPA-R regulation and, more specifically, it would be interesting to investigate the role of LGI1 on the specific organization of AMPA-R at the synapses.

5. Effect of human LGI1 auto-antibodies

5.1. Polyclonal Abs effects

Besides the pathogenicity of LGI1 Abs and their major role in the disease, they can be used as tools to study LGI1 function and structure. As studies investigating the consequences of LGI1 genetic alteration on neuronal network regulation, LGI1 Abs action on synaptic transmission has also been investigated (Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018). In accordance with findings of studies using transgenic mice (Fukata, 2006; Lovero et al., 2015; Ohkawa et al., 2013), a decrease of total and synaptic AMPA-R subunits and Kv1.1 channels has also been observed in the hippocampus of a mouse model with chronic intraventricular infusion of LGI1 Abs (Petit-Pedrol et al., 2018). Moreover, LGI1 Abs did not change mEPSC amplitude in CA1 area (Petit-Pedrol et al., 2018). The authors have also reported an increase of presynaptic release probability in dentate gyrus but not in CA1 (Petit-Pedrol et al., 2018) in accordance with studies using transgenic models (Boillot et al., 2016; Lovero et al., 2015).

Even if the effects of LGI1 Abs infusion are not as impressive as genetic modifications, the use of LGI1 Abs turns out to be effective, as this method allows to study LGI1 function on synaptic transmission with a spatio-temporal control and without genetic modulation. Moreover, infusion of Abs during adulthood avoids the developmental troubles reported in transgenic mice (Fukata et al., 2010) making the infused mouse model a very suitable model to understand LGI1-ADAM22 trans-synaptic complex.

5.2. Monoclonal Abs effects

Recently, several studies aiming at better understanding the mode of action of LGI1 Abs have highlighted the polyclonal nature of patient Abs by identifying both LRR-reactive Abs and EPTP-reactive Abs (Table 2) (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). On the one hand, EPTP-reactive monoclonal Abs (mAbs) have been produced (LGI1-EPTP-mAbs) and shown to bind LGI1 and to prevent LGI1 interaction with ADAM22 or ADAM23, leading to an absence of staining in the tissue (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Yamagata et al., 2018). On the other hand, it has been observed that LRR-reactive mAbs (LGI1-LRR-mAbs) could bind to tissues and cell cultures, and trigger the internalization of the LGI1-ADAM22 complex (Ramberger et al., 2020). A decrease in Kv1.1 α level in the hippocampus after LGI1-EPTP-mAbs in-

Table 2

Summary of EPTP and LRR domain function (Adapted from Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020).

	EPTP mAbs	LRR mAbs
Mode of action	Competing with ADAM22 for LGI1 target	Prevent LGI1 homodimerization
Structural effects	Prevent LGI1-ADAM22 interaction	Caused LGI1-ADAM22 internalization
Localisation after a cerebroventricular infusion	Positive in serum Negative in immunostaining	Negative in serum Positive in immunostaining
Behavioral test (object recognition)	No effect	No effect
LTP Effect (CA3-CA1 synapses)	Strong reduction	Reduction
Neurotransmitters release	No effect on PPF	No effect on PPF
Kv1.1 expression	Strong expression reduction	Moderate expression reduction
AMPA-R expression	No alteration of mEPSC	Increase amplitude of mEPSC
Neuronal excitability	No effect	Increase neuronal excitability

Abbreviations: mAbs, monoclonal antibodies; LTP, long term potentiation; PPF, paired-pulse facilitation; mEPSC, miniature excitatory post-synaptic currents.

jection has been observed using western-blot (Ramberger et al., 2020). A smaller decrease in Kv1.1 α level has also been observed following LGI1-LRR-mAbs infusion. Nevertheless, only high levels of LGI1-LRR-mAbs brain infusion caused physiological effects *in vivo* in mice, these effects consisted in an alteration of novel object recognition (Ramberger et al., 2020). Moreover, an acute injection of mAbs in the CA3 area induced a strong alteration of LTP at CA3-CA1 synapses for both mAbs (Ramberger et al., 2020). Nevertheless, no effect has been observed on paired-pulse facilitation with LRR or EPTP mAbs injection (Ramberger et al., 2020). Additionally, in another study, hippocampal organotypic slices have been incubated for 24 h to 48 h with either LRR or EPTP-reactive mAbs and the excitability of neurons in CA3 area has been recorded by patch-clamp: an increased excitability was observed with reactive mAbs targeting both LRR and EPTP domains, the effect was bigger following LGI1-LRR-mAbs incubation (Kornau et al., 2020). Furthermore, LGI1-LRR-mAbs also caused a reduction in the base whereas EPTP-LRR-mAbs did not (Kornau et al., 2020).

These results are very interesting, since they describe two pathogenic populations of LGI1 Abs with different mechanisms of action in patients with autoimmune LE, potentially leading to slightly different symptoms. Thus, future studies should investigate AMPA-R and continue to deepen the understanding of Kv1.1 alteration. Moreover, most studies have been focusing on LGI1-ADAM22 interaction to explain pathogenic mechanisms (Ohkawa et al., 2013) but it is now clear that the LRR domain of LGI1 is also essential for the proper functions of the LGI1 complex.

6. Conclusion and futures directions

In this review, we exposed how LGI1 synaptic functions are disrupted in ADLTE and LE diseases and we highlighted the importance of clarifying LGI1 functions in the CNS to better understand the mechanisms underlying synaptic organization and synaptic transmission. Patients with ADLTE and LE suffer from severe cognitive deficits which can persist after treatment. Thereby, understanding the cause of these diseases is necessary to improve diagnostic and to offer adaptive treatments for these pathologies. More precisely, in LE the mechanism leading to an immune tolerance breakdown are still unclear. Future studies should investigate the blood brain barrier in LE to highlight how LGI1 Abs can be produced in the CSF. Investigating these mechanisms will allow to better understand other diseases involving an immune tolerance breakdown such as multiple sclerosis.

Another important field of research is to understand the processes by which LGI1 dysfunction leads to epileptic seizures. The various approaches detailed in this review revealed that LGI1 protein plays an essential role in the formation and functioning of the network during development (Zhou et al., 2009; Fukata et al., 2010; Boillot et al., 2016) while, as observed in patient with LE, mainly synaptic functions are impacted during adulthood (Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018). Previous studies highlighted a role of LGI1 in the regulation of synaptic transmission by kv1.1 channels (Schulte et al., 2006; Petit-Pedrol et al., 2018; Lancaster et al., 2019) and AMPA-R (Fukata, 2006; Fukata et al., 2010; Ohkawa et al., 2013; Lovero et al., 2015; Petit-Pedrol et al., 2018). Nevertheless, how these proteins are downregulated when there is a dysfunction of LGI1 is still unclear. LGI1 form a trans-synaptic complex which regulates presynaptic and postsynaptic organization including many synaptic proteins (Fukata et al., 2021). Future studies should investigate the function of LGI1-ADAM22 trans-synaptic complex on the synaptic nano-organization. To reach this goal, a better knowledge of protein interactions with the LGI1-ADAM22 complex is required, as well as of the potential role of LGI1 outside the synapse. Moreover, there is a need to understand the mechanisms linking LGI1 with kv1.1 channels and AMPA-R. In particular the role of LGI1 in the regulation of the surface expression and trafficking of kv1.1 channels and AMPA-R has not yet been studied. In addition, Under-

standing regulation mechanisms of kv1.1 channels and AMPA-R will be relevant for the comprehension of other neurological diseases involving alterations of these proteins such as episodic ataxia type 1 (D'Adamo et al., 2020).

Funding

This work was supported by FRM (*Fondation pour la recherche médicale*) DQ20170336751. This work has been developed within the BETPSY project, which is supported by a public grant overseen by the ANR (*Agence nationale de la recherche*), as part of the second "Investissements d'Avenir" program (reference ANR-18-RHUS-0012). Elodie Fels is supported by a research grant from the *Université Claude Bernard Lyon 1* attributed by the doctoral school *Neurosciences et Cognition* (ED476).

Declaration of Competing Interest

The authors report that there is no conflict of interest.

References

- Ariño, H., Armangué, T., Petit-Pedrol, M., Sabater, L., Martínez-Hernández, E., Hara, M., Lancaster, E., Saiz, A., Dalmau, J., Graus, F., 2016. Anti-LGI1-associated cognitive impairment: presentation and long-term outcome. *Neurology* 87, 759–765. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003009>.
- Ben-Yaacov, A., Gillor, M., Haham, T., Parsai, A., Qneibi, M., Stern-Bach, Y., 2017. Molecular mechanism of AMPA receptor modulation by TARP/Stargazin. *Neuron* 93 1126–1137.e4 <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.032>.
- Binks, S., Varley, J., Lee, W., Makuch, M., Elliott, K., Gelfand, J.M., Jacob, S., Leite, M.I., Maddison, P., Chen, M., Geschwind, M.D., Grant, E., Sen, A., Waters, P., McCormack, M., Cavalleri, G.L., Barnardo, M., Knight, J.C., Irani, S.R., 2018. Distinct HLA associations of LGI1 and CASPR2-antibody diseases. *Brain* 141, 2263–2271. <https://doi.org/10.1093/brain/awy109>.
- Binks, S.N.M., Veldsman, M., Easton, A., Leite, M.I., Okai, D., Husain, M., Irani, S.R., 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>.
- Boesebeck, F., Schwarz, O., Dohmen, B., Graef, U., Vestring, T., Kramme, C., Bien, C.G., 2013. Faciobrachial dystonic seizures arise from cortico-subcortical abnormal brain areas. *J. Neurol.* 260, 1604–1606. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-6946-7>.
- Boillot, M., Lee, C.-Y., Allene, C., Leguern, E., Baulac, S., Rouach, N., 2016. LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. *Sci. Rep.* 6, 21769. <https://doi.org/10.1038/srep21769>.
- Brodtkorb, E., Gu, W., Nakken, K.O., Fischer, C., Steinlein, O.K., 2002. Familial temporal lobe epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24. *Epilepsia* 43, 228–235. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.32001.x>.
- Choquet, D., Hosi, E., 2020. AMPA receptor nanoscale dynamic organization and synaptic plasticities. *Curr. Opin. Neurobiol.* 63, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.04.003>.
- D'Adamo, M.C., Liantonio, A., Rolland, J.-F., Pessia, M., Imbrici, P., 2020. Kv1.1 channelopathies: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2935. <https://doi.org/10.3390/ijms21082935>.
- Dazzo, E., Rehberg, K., Michelucci, R., Passarelli, D., Boniver, C., Vianello Dri, V., Striano, P., Striano, S., Pasterkamp, R.J., Nobile, C., 2018. Mutations in *MICAL-1* cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy: *MICAL-1* mutations in ADLTE. *Ann. Neurol.* 83, 493–493. <https://doi.org/10.1002/ana.25167>.
- de Bruijn, M.A.A.M., van Sonderen, A., van Coevorden-Hameete, M.H., Bastiaansen, A.E.M., Schreurs, M.W.J., Rouh, R.P.W., van Donselaar, C.A., Majoie, M.H.J.M., Neuteboom, R.F., Sillevs Smitt, P.A.E., Thijs, R.D., Titulaer, M.J., 2019. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABA_B R encephalitis. *Neurology* 92, e2185–e2196. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007475>.
- Dodson, P.D., Forsythe, I.D., 2004. Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci.* 27, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.02.012>.
- Dubey, D., Britton, J., McKeon, A., Gadoth, A., Zekeridou, A., Lopez Chiriboga, S.A., Devine, M., Cerhan, J.H., Dunlay, K., Sagen, J., Ramberger, M., Waters, P., Irani, S.R., Pittock, S.J., 2020. Randomized placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in autoimmune LGI1/CASPR2 epilepsy. *Ann. Neurol.* 87, 313–323. <https://doi.org/10.1002/ana.25655>.
- Finke, C., Prüss, H., Heine, J., Reuter, S., Kopp, U.A., Wegner, F., Then Bergh, F., Koch, S., Jansen, O., Münte, T., Deuschl, G., Ruprecht, K., Stöcker, W., Wandinger, K.-P., Paul, F., Bartsch, T., 2017. Evaluation of cognitive deficits and

- structural hippocampal damage in encephalitis with leucine-rich, glioma-inactivated 1 antibodies. *JAMA Neurol.* 74, 50. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4226>.
- Planagan, E.P., Kotsenas, A.L., Britton, J.W., McKeon, A., Watson, R.E., Klein, C.J., Boeve, B.F., Lowe, V., Ahlskog, J.E., Shin, C., Boes, C.J., Crum, B.A., Laughlin, R.S., Pittock, S.J., 2015. Basal ganglia T1 hyperintensity in LGII1-autoantibody faciobrachial dystonic seizures. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflam.* 2, e161. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000161>.
- Fukata, Y., 2006. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGII1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 313, 1792–1795. <https://doi.org/10.1126/science.1129947>.
- Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A., Fukata, M., 2010. Disruption of LGII1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3799–3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914537107>.
- Fukata, Y., Chen, X., Chiken, S., Hirano, Y., Yamagata, A., Inahashi, H., Sanbo, M., Sano, H., Goto, T., Hirabayashi, M., Kornau, H.-C., Prüss, H., Nambu, A., Fukui, S., Nicoll, R.A., Fukata, M., 2021. LGII1-ADAM22-MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2022580118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022580118>.
- Gadoth, A., Pittock, S.J., Dubey, D., McKeon, A., Britton, J.W., Schmeling, J.E., Smith, A., Kotsenas, A.L., Watson, R.E., Lachance, D.H., Planagan, E.P., Lennon, V.A., Klein, C.J., 2017. Expanded phenotypes and outcomes among 256 LGII1/CASPR2-IgG-positive patients: LGII1/CASPR2-IgG⁺ patients. *Ann. Neurol.* 82, 79–92. <https://doi.org/10.1002/ana.24979>.
- Han, K., Kim, E., 2008. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog. Neurobiol.* 84, 263–283. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.10.011>.
- Hébert, J., Riche, B., Vogrig, A., Muñoz-Castrillo, S., Joubert, B., Picard, G., Rogemond, V., Psimaras, D., Alentom, A., Berzero, G., Desestret, V., Rabilloud, M., Honnorat, J., 2020. Epidemiology of paraneoplastic neurologic syndromes and autoimmune encephalitis in France. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflam.* 7, e893. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000893>.
- Ho, Y.-Y., Ionita-Laza, I., Ottman, R., 2012. Domain-dependent clustering and genotype-phenotype analysis of LGII1 mutations in ADPEAF. *Neurology* 78, 563–568. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318247cebf>.
- Hsia, H.-E., Tüshaus, J., Brummer, T., Zheng, Y., Scilabra, S.D., Lichtenthaler, S.F., 2019. Functions of 'A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)' in the mammalian nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3055–3081. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03173-7>.
- Irani, S.R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K.A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B., Vincent, A., 2010. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133, 2734–2746. <https://doi.org/10.1093/brain/awq213>.
- Irani, S.R., Michell, A.W., Lang, B., Pettingill, P., Waters, P., Johnson, M.R., Schott, J.M., Armstrong, R.J.E., Zagami, S., Bleasel, A., Somerville, E.R., Smith, S.M.J., Vincent, A., 2011. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgii1 antibody limbic encephalitis. *Ann. Neurol.* 69, 892–900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307>.
- Irani, S.R., Stagg, C.J., Schott, J.M., Rosenthal, C.R., Schneider, S.A., Pettingill, P., Pettingill, R., Waters, P., Thomas, A., Voets, N.L., Cardoso, M.J., Cash, D.M., Manning, E.N., Lang, B., Smith, S.J.M., Vincent, A., Johnson, M.R., 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>.
- Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., Winawer, M., Barker-Cummings, C., Boneschi, F.M., Choi, C., Morozov, P., Das, K., Teplitskaya, E., Yu, A., Cayanis, E., Pechaszadeh, G., Kottmann, A.H., Pedley, T.A., Hauser, W.A., Ottman, R., Gilliam, T.C., 2002. Mutations in LGII1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat. Genet.* 30, 335–341. <https://doi.org/10.1038/ng832>.
- Kim, T.-J., Lee, S.-T., Moon, J., Sunwoo, J.-S., Byun, J.-I., Lim, J.-A., Shin, Y.-W., Jun, J.-S., Lee, H.-S., Lee, W.-J., Yang, A.R., Choi, Y., Park, K.-I., Jung, K.-H., Jung, K.-Y., Kim, M., Lee, S.K., Chu, K., 2017. Anti-LGII1 encephalitis is associated with unique HLA subtypes: HLA subtypes in anti-LGII1 encephalitis. *Ann. Neurol.* 81, 183–192. <https://doi.org/10.1002/ana.24860>.
- Kornau, H., Kreye, J., Stumpf, A., Fukata, Y., Parthier, D., Sammons, R.P., Imbrosci, B., Kurpjuweit, S., Kowski, A.B., Fukata, M., Prüss, H., Schmitz, D., 2020. Human cerebrospinal fluid monoclonal LGII1 autoantibodies increase neuronal excitability. *Ann. Neurol.* 87, 405–418. <https://doi.org/10.1002/ana.25666>.
- Lai, M., Huijbers, M.G., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J.K., Dalmau, J., 2010. Investigation of LGII1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol.* 9, 776–785. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70137-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70137-X).
- Lancaster, Eunjo, Burnor, E., Zhang, J., Lancaster, Eric, 2019. ADAM23 is a negative regulator of Kv1.1/Kv1.4 potassium currents. *Neurosci. Lett.* 704, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.012>.
- Lehmann-Horn, K., Irani, S.R., Wang, S., Palanichamy, A., Jahn, S., Greenfield, A.L., Dandekar, R., Lepenietier, G., Michael, S., Gelfand, J.M., Geschwind, M.D., Wilson, M.R., Zamvil, S.S., von Büdingen, H.-C., 2020. Intrathecal B-cell activation in LGII1 antibody encephalitis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflam.* 7, e669. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000669>.
- Lovero, K.L., Fukata, Y., Granger, A.J., Fukata, M., Nicoll, R.A., 2015. The LGII1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E4129–E4137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511910112>.
- Michelucci, R., Poza, J.J., Sofia, V., de Feo, M.R., Binelli, S., Bisulli, F., Scudellaro, E., Simionati, B., Zimbello, R., D'Orsi, G., Passarelli, D., Avoni, P., Avanzini, G., Tinuper, P., Biondi, R., Valle, G., Mautner, V.F., Stephani, U., Tassinari, C.A., Moschonas, N.K., Siebert, R., de Munain, A.L., Perez-Tur, J., Nobile, C., 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>.
- Michelucci, R., Pulitano, P., Di Bonaventura, C., Binelli, S., Luisi, C., Pasini, E., Striano, S., Striano, P., Coppola, G., La Neve, A., Giallonardo, A.T., Mecarelli, O., Seriola, E., Dazzo, E., Fanciulli, M., Nobile, C., 2017. The clinical phenotype of autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy related to reelin mutations. *Epilepsy Behav.* 68, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.12.003>.
- Morante-Redolat, J.M., 2002. Mutations in the LGII1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1119>.
- Mueller, S.H., Färber, A., Prüss, H., Melzer, N., Golombek, K.S., Kämpfel, T., Thaler, F., Elisak, M., Lewerenz, J., Kaufmann, M., Sühs, K.-W., Ringelstein, M., Kellinghaus, C., Bien, C.G., Kraft, A., Zettl, U.K., Ehrlich, S., Handreka, R., Rostásy, K., Then Bergh, F., Faiss, J.H., Liebw, W., Franke, A., Kühlenbäumer, G., Wandinger, K.-P., Leyboldt, F., on behalf of the german network for research on autoimmune encephalitis (GENERATE), 2018. Genetic predisposition in anti-LGII1 and anti-NMDA receptor encephalitis: GWAS autoimmune encephalitis. *Ann. Neurol.* 83, 863–869. <https://doi.org/10.1002/ana.25216>.
- Muñoz-Castrillo, S., Vogrig, A., Honnorat, J., 2020. Associations between HLA and autoimmune neurological diseases with autoantibodies. *Autoimmun. Highlights* 11, 2. <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0124-6>.
- Muñoz-Castrillo, S., Haesebaert, J., Thomas, L., Vogrig, A., Pinto, A.-L., Picard, G., Blanc, C., Do, L.-D., Joubert, B., Berzero, G., Psimaras, D., Alentom, A., Rogemond, V., Dubois, V., Ambati, A., Tamouza, R., Mignot, E., Honnorat, J., 2021. Clinical and prognostic value of Immunogenetic characteristics in anti-LGII1 encephalitis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflam.* 8, e974. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000974>.
- Nair, D., Hossy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giamone, G., Choquet, D., Sibarita, J.-B., 2013. Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in Nanodomains regulated by PSD95. *J. Neurosci.* 33, 13204–13224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013>.
- Navarro, V., Kas, A., Apartis, E., Chami, L., Rogemond, V., Levy, P., Psimaras, D., Habert, M.-O., Baulac, M., Delattre, J.-Y., Honnorat, J., collaborators, 2016. Motor cortex and hippocampus are the two main cortical targets in LGII1-antibody encephalitis. *Brain* 139, 1079–1093. <https://doi.org/10.1093/brain/aww012>.
- Ohkawa, T., Fukata, Y., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yokoi, N., Takashima, H., Watanabe, M., Watanabe, O., Fukata, M., 2013. Autoantibodies to epilepsy-related LGII1 in limbic encephalitis neutralize LGII1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J. Neurosci.* 33, 18161–18174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013>.
- Ottman, R., Risch, N., Hauser, W.A., Pedley, T.A., Lee, J.H., Barker-Cummings, C., Lustenberger, A., Nagle, K.J., Lee, K.S., Scheuer, M.L., Neystat, M., Sussner, M., Wilhelmson, K.C., 1995. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat. Genet.* 10, 56–60. <https://doi.org/10.1038/ng0595-56>.
- Petit-Pedrol, M., Sell, J., Planagumà, J., Mannara, F., Radosevic, M., Haselmann, H., Geanga, M., Sabater, L., Spatola, M., Soto, D., Gasull, X., Dalmau, J., Geis, C., 2018. LGII1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain.* <https://doi.org/10.1093/brain/awy253>.
- Poza et al., n.d. Poza, J.J., Saenz, A., Martínez-Gil, A., Cheron, N., Cobo, A.M., Urtasun, M., Martí-Masso, J.F., Grid, D., Beckmann, J.S., Prud'homme, J.F., de Munain, A.L., n.d. Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: Clinical and Genetic Study of a Large Basque Pedigree Linked to Chromosome 10q 7.
- Ramberger, M., Berretta, A., Tan, J.M.M., Sun, B., Michael, S., Yeo, T., Theorell, J., Bashford-Rogers, R., Paneva, S., O'Dowd, V., Dedi, N., Topia, S., Griffin, R., Ramirez-Franco, J., El Far, O., Baulac, S., Leite, M.I., Sen, A., Jeans, A., McMillan, D., Marshall, D., Anthony, D., Lightwood, D., Waters, P., Irani, S.R., 2020. Distinctive binding properties of human monoclonal LGII1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain* 143, 1731–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa104>.
- Rihn, L.L., Claiborne, B.J., 1990. Dendritic growth and regression in rat dentate granule cells during late postnatal development. *Dev. Brain Res.* 54, 115–124. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90071-6](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90071-6).

- Rosanoff, M.J., Ottman, R., 2008. Penetrance of LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 71, 567–571. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000323926.77565.ee>.
- Sagane, K., Ishihama, Y., Sugimoto, H., 2008. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int. J. Biol. Sci.* 387–396. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.387>.
- Schulte, U., Thumfart, J.-O., Klöcker, N., Sailer, C.A., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., Wangler, T., Knaus, H.-G., Fakler, B., 2006. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvβ1. *Neuron* 49, 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.033>.
- Seagar, M., Russier, M., Caillard, O., Maulet, Y., Fronzaroli-Molinieres, L., De San Feliciano, M., Boumedine-Guignon, N., Rodriguez, L., Zbili, M., Usseglio, F., Formisano-Tréziny, C., Youssouf, F., Sangiardi, M., Boillot, M., Baulac, S., Benitez, M.J., Garrido, J.-J., Debanne, D., El Far, O., 2017. LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 7719–7724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618656114>.
- Senechal, K.R., Thaller, C., Noebels, J.L., 2005. ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1613–1620. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi169>.
- Sheng, M., Lee, S.H., 2001. AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell* 105, 825–828. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00406-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00406-3).
- Sirerol-Piquer, M.S., Ayerdi-Izquierdo, A., Morante-Redolat, J.M., Herranz-Pérez, V., Favell, K., Barker, P.A., Pérez-Tur, J., 2006. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3436–3445. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl421>.
- Sola-Valls, N., Ariño, H., Escudero, D., Solana, E., Lladó, A., Sánchez-Valle, R., Blanco, Y., Saiz, A., Dalmau, J., Graus, F., 2020. Telemedicine assessment of long-term cognitive and functional status in anti-leucine-rich, glioma-inactivated 1 encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 7, e652. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000652>.
- Steriade, C., Mirsattari, S.M., Murray, B.J., Wennberg, R., 2016. Subclinical temporal EEG seizure pattern in LGI1-antibody-mediated encephalitis. *Epilepsia* 57, e155–e160. <https://doi.org/10.1111/epi.13436>.
- Thompson, J., Bi, M., Murchison, A.G., Makuch, M., Bien, C.G., Chu, K., Farooque, P., Gelfand, J.M., Geschwind, M.D., Hirsch, L.J., Somerville, E., Lang, B., Vincent, A., Leite, M.I., Waters, P., Irani, S.R., Faciobrachial Dystonic Seizures Study Group, Dogan-Onugoren, M., Rae-Grant, A., Illes, Z., Szots, M., Malter, M., Widman, G., Surges, R., Archibald, N., Reid, J., Duncan, C., Richardson, A., Lilleker, J., Iorio, R., Blaabjerg, M., Abeler, K., Shin, Y., 2018. The importance of early immunotherapy in patients with faciobrachial dystonic seizures. *Brain* 141, 348–356. <https://doi.org/10.1093/brain/awx323>.
- Turetsky, D., 2005. Stargazin modulates native AMPA receptor functional properties by two distinct mechanisms. *J. Neurosci.* 25, 7438–7448. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-05.2005>.
- van Sonderen, A., Thijs, R.D., Coenders, E.C., Jiskoot, L.C., Sanchez, E., de Bruijn, M.A.A.M., van Coevorden-Hameete, M.H., Wirtz, P.W., Schreurs, M.W.J., Sillevs Smitt, P.A.E., Titulaer, M.J., 2016. Anti-LGI1 encephalitis: clinical syndrome and long-term follow-up. *Neurology* 87, 1449–1456. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003173>.
- van Sonderen, A., Roelen, D.L., Stoop, J.A., Verdijk, R.M., Haasnoot, G.W., Thijs, R.D., Wirtz, P.W., Schreurs, M.W.J., Claas, F.H.J., Sillevs Smitt, P.A.E., Titulaer, M.J., 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>.
- Vogrig, A., Joubert, B., André-Obadia, N., Gigli, G.L., Rheims, S., Honnorat, J., 2019. Seizure specificities in patients with antibody-mediated autoimmune encephalitis. *Epilepsia* 60, 1503–1525. <https://doi.org/10.1111/epi.16282>.
- Vogrig, A., Muñoz-Castrillo, S., Desestret, V., Joubert, B., Honnorat, J., 2020. Pathophysiology of paraneoplastic and autoimmune encephalitis: genes, infections, and checkpoint inhibitors. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 13, 175628642093279. <https://doi.org/10.1177/1756286420932797>.
- Winawer, M.R., Ottman, R., Hauser, W.A., Pedley, T.A., 2000. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: defining the phenotype. *Neurology* 54, 2173–2176. <https://doi.org/10.1212/WNL.54.11.2173>.
- Yamagata, A., Fukai, S., 2020. Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1–ADAM22. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03269-0>.
- Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., Maeda, A., Goto, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Shirouzu, M., Fukata, Y., Fukata, M., Fukai, S., 2018. Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nat. Commun.* 9, 1546. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03947-w>.
- Yokoi, N., Fukata, Y., Kase, D., Miyazaki, T., Jaegle, M., Ohkawa, T., Takahashi, N., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Imoto, K., Meijer, D., Watanabe, M., Fukata, M., 2015. Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat. Med.* 21, 19–26. <https://doi.org/10.1038/nm.3759>.
- Zhou, Y.-D., Lee, S., Jin, Z., Wright, M., Smith, S.E.P., Anderson, M.P., 2009. Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat. Med.* 15, 1208–1214. <https://doi.org/10.1038/nm.2019>.

Dysregulation of the hippocampal neuronal network by LGI1 auto-antibodies.

EN PREPARATION

Elodie Fels^{1,2}, Marie-Eve Mayeur^{1,2}, Estelle Wayere^{1,2} Clémentine Vincent^{1,2,3}, Céline Malleval^{1,2}, Jérôme Honnorat^{1,2,3}, Olivier Pascual^{1,2*}.

1 Synaptopathies and Auto-antibodies (SynatAc) Team, Institut NeuroMyoGène, MeLis - CNRS UMR 5284 - INSERM U1314, Universités de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

2 Université Claude Bernard Lyon 1, Universités de Lyon, Lyon, France ;

3 French Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndromes and Autoimmune Encephalitis, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France

*Corresponding authors : Olivier Pascual

Institut NeuroMyoGène, UCBL – CNRS UMR 5310 – INSERM U1217, Faculté de Médecine et de Pharmacie – 3ème étage – Couloir AB, 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

Email: olivier.pascual@inserm.fr

Abstract:

LGI1 is a neuronal secreted protein highly expressed in the hippocampus. Epileptic seizures and LGI1 hypo-functions have been found in both ADLTE, a genetic epileptogenic syndrome and LGI1 limbic encephalitis (LE), an autoimmune disease. Studies, based mainly on transgenic mouse models, investigated the function of LGI1 in the CNS and strangely showed that LGI1 loss of function, led to a decreased AMPA-receptors (AMPA-R) expression. Our project intends at better understanding how an altered function of LGI1 leads to epileptic seizures. To reach our goal, we infused mice with LGI1 IgG purified from the serum of patients diagnosed with LGI1 LE. Super resolution imaging revealed that LGI1 IgG reduced AMPA-R expression at the surface of inhibitory and excitatory neurons only in the dentate gyrus of the hippocampus. Complementary electrophysiological approaches indicated that despite reduced AMPA-R expression, LGI1 IgG increased the global hyperexcitability in the hippocampal neuronal network. Decreased AMPA-R expression at inhibitory neurons and the lack of LGI1 IgG effect in presence of GABA antagonist on excitability, led us to conclude that LGI1 function might be essential for the proper functioning of the overall network and orchestrate the imbalance between inhibition and excitation. Our work suggests that LGI1 IgG reduced the inhibitory network activity more significantly than the excitatory network shedding lights on the essential role of the inhibitory network to trigger epileptic seizures in patients with LGI1 LE.

Keywords:

LGI1 limbic encephalitis, AMPA-receptors, synaptic transmission, hippocampal hyperexcitability, interneurons regulation.

Abbreviations:

LGI1: leucine-rich glioma inactivated protein 1 ; ADLTE : autosomal dominant temporal lobe epilepsy ; LE : limbic encephalitis ; CNS : central nervous system ; AMPA-R: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors ; IgG: Immunoglobulines G ; Abs: antibodies ; (a)CSF: (artificial) cerebrospinal fluid ; ADAM: A disintegrin and metalloprotease protein ; PSD: postsynaptic density; Kv: voltage-gated potassium channels ; GAD2-RT: GAD2-rosa tomato mice ; GAD: glutamic acid decarboxylase 65 ; ctrl: control ; (e)EPSP: (evoked) excitatory postsynaptic potentials ; LFP: local field potential ; IO: input-output ; STORM: stochastic optical reconstruction microscopy ; 4-AP: 4-aminopyridine ; DTX-K: dendrotoxin-K

1. Introduction:

Leucin-rich glioma inactivated protein 1 (LGI1) is a 60 KDa secreted protein largely expressed in the central nervous system (CNS) with a high expression profile in the hippocampus. *LGII* gene mutations are involved in an inherited form of epilepsy called autosomal dominant temporal lobe epilepsy (ADLTE) (1,2). Epileptic seizures are characterized by hyperexcitability and hypersynchronous activity of the neuronal network. To investigate the involvement of LGI1 in the regulation of the neuronal network, a knock-out mouse model *lgi1^{-/-}* has been created (3). In this model, severe epileptic seizures appeared from 2 weeks of age, leading to the death of the animal at three weeks post-natal, supporting the idea of an essential role of LGI1 during the maturation of the neuronal network (3). Another study based on a transgenic mouse model carrying a genetic alteration associated with ADLTE, demonstrated that LGI1 has a crucial function on the maturation and pruning of excitatory synapses during the development (4). Nevertheless, the role of LGI1 in the regulation of the mature neuronal network has been recently highlighted by the description of autoimmune encephalitis with LGI1 auto-antibodies (Abs) (5,6). LGI1-Abs have been found in the serum and the cerebrospinal fluid (CSF) of adult patients with limbic encephalitis (LGI1 LE) (6,7) and such patient are also characterized by epileptic seizures. LGI1-Abs seem to play a direct role to block LGI1 protein indicating an essential function of LGI1 in the regulation of the neuronal network activity during adulthood (8–10).

Further studies investigating the function of LGI1 in the CNS found that LGI1 interacts at excitatory synapses with its transmembrane partners disintegrin and metalloprotease protein 22 (ADAM22) and/or 23 (ADAM23) (11–14) to form a large trans-synaptic complex. By this complex, it was suggested that LGI1 regulates the expression and activity of voltage-gated potassium kv1.1 channels at the presynaptic compartment through its interaction with

ADAM23 (3,15–18), and the expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA-R) through its interaction with ADAM22 at the postsynaptic compartment (11). Strangely, in contradiction with the epileptic seizures phenotype, the dysfunction of LGI1 was reported to reduce the expression of AMPA-R leading to the decrease of the excitatory synaptic transmission (3,12,16,19). Few regulatory mechanisms have been proposed so far, a study suggested that the main action of LGI1 would be on kv1.1 channels resulting in an homeostatic regulation (18), but this theory has not been proven yet while another theory suggested that the reduction of AMPA-R at excitatory synapses on inhibitory neurons would increase excitability and could explain the epileptic seizures (3). Nevertheless, there is currently no demonstrated explanation for this contradiction.

The aim of our study was to investigate the synaptic function of LGI1 in the mature hippocampus. To do this, we used LGI1-Abs purified from the serum of patients with LGI1 LE and investigated the effects on AMPA-R expression on the regulation of the neuronal network activity. We showed that the neutralization of LGI1 protein by LGI1-Abs reduced AMPA-R expression at the surface of both excitatory and inhibitory neurons. Moreover, we observed that LGI1-Abs increased the hyperexcitability of the neuronal network independently of kv1.1 channels. Thus, we brought, for the first time, evidences that this increased hyperexcitability was due to a disturbance of the inhibitory network which is not able to control the overexcitability of the neuronal network.

2. Material and Method

Animals:

The study was conducted in accordance with the European Community Council directive 2010/63/EU on the protection of animals used for experimental and scientific purposes. Animal

care and treatment procedures were performed according to the ARRIVE guidelines approved by the French Ethical Committee of Lyon 1 University (#13703).

For the electrophysiological study, 7 weeks old C57BL6/JRj mice (Janvier Labs) were used. Animals were placed at 12h/12h light/dark cycle with food and water *ad libidum*. For immunohistochemistry study, we used a transgenic GAD2-rosa tomato (GAD2-RT) mice model (20). To do so, Gad2-IRES-Cre^{+/+} mice expressing Cre recombinase under the control of Gad2 promotor which encodes for the glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65), were crossed with Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze+/+} mice expressing the loxed stop codon into the Gt(ROSA)26Sor locus. GAD2-RT mice expressed the fluorescent protein rosa tomato in GAD65 cells.

Immunoglobulins G purification:

The serum of a patient with LGI1 LE was provided by the French Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndromes and Autoimmune Encephalitis and the NeuroBioTec biobank from Hospices Civils de Lyon. Control immunoglobulins G (ctrl IgG) were provided by the Etablissement Français du Sang (EFS).

Control and LE serum were incubated with protein-A coated beads (Protein A-Sepharose 4B Fast Flow, Sigma, #P9424) before to be placed into chromatography columns (Evergreen Scientific, #208-3384-060). IgG were eluted with glycine (0,1M pH 2,8) and neutralized with Tris-HCL (1,5M, pH 8,8) before to be dialyzed (Dialysis Cassettes, Thermofisher, #87730) against PBS overnight at 4°C. Concentrations of purified IgG were determined by nanodrop assay.

HEK293T cells immunostaining:

HEK293T cells were seeded on glass coverslips (Labelians #LCO14), pretreated with 10 µg/µl poly-L-lysine (Sigma, #P1399). At 70% confluence, HEK293T cells were transfected with ADAM22 and LGI1-GFP plasmids using the lipofectamine LTK transfection kit (Thermofisher, #153388100). Transfected HEK293T cells were incubated with purified IgG for 1 hour at increasing dilution and then were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Euromedex, #EM-15713-S). Cells were incubated for 30 minutes in a blocking buffer solution containing 1% Bovin Serum Albumine (BSA, Axday, #1000 –70), 10% Normal Goat Serum (NGS, Eurobio, #S-100), PBS. Secondary antibodies against human IgG coupled with Alexa555 were incubated during 2 hours at room temperature. Cell cultures were stained with DAPI before to be mounted on slide with Fluoromount (Thermofisher, #4958-02). Images were acquired using an epifluorescence microscope (Zeiss, Imager Z1, Apotome).

Primary hippocampal neuronal cell cultures:

Primary hippocampal cell cultures were realized from embryonic day 17,5-Wistar rats (Janvier Labs). Glass coverslips (Labelians, #LCO14) were pretreated with 0,5 mg/ml poly-l-lysine (Sigma, #P2636) for one night at 37°C. Wistar pregnant dams were deeply anesthetized with isoflurane (Isovet), and decapitated. The embryos were collected in Hank's Buffer Salt Solution 1X (HBSS, Gibco, #14185-045) on ice and the brain of embryos were removed to collect hippocampi. Cells of the hippocampus were chemical dissociated in HBBS supplemented with 0,25 % trypsin (Gibco, #15090-046) for 10 minutes at 37°C and then inhibited with 0,4% BSA (Sigma, #A2058). Hippocampi were then triturated in the culture medium composed of neurobasal (Gibco, #21103-046) supplemented with 2% B27 (Gibco, #17504-044), 1% Penicilline/Streptomycine (Gibco, #15140-122), 0,3% L-glutamine (Gibco,

#25030-024). Cells were seeded at 2100 cells/cm² and kept in the incubator at 37°C, 5% CO₂ for 17 days (DIV17).

Immunocytofluorescence:

Primary hippocampal cell cultures were incubated with purified ctrl or LGI1 IgG for 1 hour before to be fixed with 4% PFA (Euromedex, #EM-15713-S) for 15 minutes. After 3 washes in PBS, cells were incubated in blocking buffer solutions composed of 1% BSA (Axday, #1000-70), 10% NGS (Eurobio, #S-100), PBS for 1 hour. Secondary antibodies against human IgG coupled with Alexa555 (Invitrogen, #A21433) were incubated for 2 hours at room temperature. Cell nuclei were stained using 1 µg/ml DAPI (Sigma, #D9542) for 10 minutes before to be mounted in fluomount (Thermofisher, #4958-02). Images were acquired using epifluorescence microscope (Zeiss, Imager Z1 Apotome).

Surgery and pumps implantation:

6 weeks old mice were implanted with an osmotic pump (Alzet, 1007D) previously filled with purified ctrl or LGI1 IgG (60 µg/ml) or dendrotoxin-K (DTX-K) (100 nM). The day of surgery, mice were deeply anesthetized with isoflurane (IsoVet) and the surgeries were performed on a stereotaxic frame. The cannula was implanted into the medial-septum according to the following coordinates: antero-posterior: Bregma+0.25 mm; lateral: Bregma+0.5mm; depth: skull surface-3mm. Intra-peritoneal injection of metacam® (2mg/kg) were made immediately after the surgery and the next day. Mice brains were infused for 7 days before to proceed to the experiments.

Electrophysiology:

Acute hippocampal slices (400 μ m) were cut using a vibratome (HM 650V, ThermoFisher) in sucrose aCSF at 4°C composed of (mM): 250 Sucrose, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose saturated with 95% O₂ et 5% CO₂. Recordings were performed in regular aCSF of the following composition (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose saturated with 95% O₂ and 5% CO₂.

The evoked excitatory post-synaptic potentials (eEPSP) and the local field potentials (LFP) in the CA1 region of the hippocampus were recorded. For eEPSP recordings, a stimulating electrode (Phymep, #CBAR C75) was position on the Schaeffer collaterals. To establish the input-output (IO) curve, increasing stimulations between 0 to 600 μ A for 0,05msec at 0,01Hz were delivered, and the slope of the evoked responses were analyzed. To study the global hyperexcitability of the network, LFP were recorded in the CA1 region of hippocampus. in presence of 4-aminopyridine (4-AP) (40 μ M, Tocris #0940) alone or 4-AP (40 μ M) and picrotoxin (100 μ M, Tocris #1128). The global hyperexcitability was determined by multiplying the numbers of ictus by the area of the ictus.

PSD enrichment and immunoblot:

Post-synaptic density (PSD) fractions were realized from hippocampal slices of infused mice with control purified IgG. Hippocampal slices were dissociated and centrifugated in buffer solution 1 composed of 0,32M sucrose, 10 mM HEPES, pH: 7.40 completed with protease inhibitor (Sigma, #4693132001) and orthovanadate (Biolabs, # P0758S). Crude membrane fractions in the pellets were collected and resuspended in the buffer solution 2 composed of 1mM EDTA, 4 mM HEPES, pH: 7.40, to chelate calcium, and centrifugated twice. The synaptosomal fractions in the pellet was resuspended and incubated in the buffer solution 3

composed of 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0,5% Triton, pH 7,4 at 4°C. The solution was centrifugated and the non-PSD fraction contained in the supernatant was collected. The PSD fraction contained in the pellet was resuspended in the buffer solution 4 composed of 0,15 mM NaCl, 1% Triton, 1% DOC, 1%SDS, 20mM HEPES, pH: 7.50 and centrifugated to be collected.

Immunoblot were performed with the following antibodies: anti-ADAM22 (Abcam, # ab231340), anti-ADAM23 (abcam, # ab28304) anti-PSD-95 (Cell Signaling, #3450S), anti-Synaptophysine (Sigma, # S5768). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) directed against mice (JacksonLabs, #115-036-003) or rabbit (JacksonLabs, #11-036-003) were used. Revelation and analysis have been realized with ImageLab software.

Immunohistochemistry:

GAD2-RT infused mice were anesthetized with isoflurane (IsoVet) and perfused with 5 ml NaCl 0,9% at 120 ml/hour then 5ml NaCl 0,9% at 60 ml/hour. The brain was removed and fixed into 4% PFA, (Euromedex, # EM-15713-S) for 24 hours and preserved in 30% sucrose solution for 72 hours. Then, brains were frozen into -40°C isopentane for 30 to 45 sec and embedded into optimal cutting temperature (OCT) compound. Coronal hippocampal sections (7µm) were cut with cryostat (Thermofisher, #NX50) at -20°C and were collected on high precision coverslips (Marienfield #0117580) previously coated with gelatin.

Coverslips were rehydrated in PBS during 5 min and incubated into blocking buffer 10% Normal Goat Serum (NGS, Eurobio, #S-100), 1% BSA (Axdays, #1000 -70). GluA1 rabbit antibodies (1:1000, Millipore #ABN241) were incubated overnight at 4°C, following by rabbit Alexa647 antibodies (1:1000, Invitrogen #A21244).

Super-resolution microscopy STORM:

To perform super-resolution microscopy, stained slices fixed on coverslips were mounted in cavity slides (Marienfield # 631-9475) embedded into a switching buffer for dSTORM as reported (21,22). Image acquisitions were performed using a Nikon PALM-STORM microscope equipped with an EM-CCD camera (Andor Ixon 897 Ultra, gain 250). Acquisitions were made using the software NIS-Element. Analyzes were performed in the molecular layer of the dentate gyrus, and in the *stratum radiatum* and *stratum lacunosum moleculare* of the CA3 and CA1 regions. Super-resolution acquisitions were performed using a 642 nm wavelength laser diode at 320 mW of the laser power and a Cy5 filter 4040C (M352119). GluA1 localization tabs were generated with ThunderStorm plugin on Image J software, and analyses were performed through SR Tesseler software.

Analyze:

Statistics were performed on GraphPad Prism 7 software. Data are represented with mean \pm SEM. Normality conditions were assessed for every data with Shapiro-Wilk test. For the comparison of 3 groups, if data passed the normality, a one-way ANOVA was performed. If data did not pass the normality, nonparametric Kruskal-Wallis test was performed. For 2 groups comparison unpaired Student-t test were made if data passed the normality. If data did not pass the normality, Mann-Whitney test were performed. Data were considered statistically different when p-value < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3. Results

3.1. Purified IgG from patients with LGI1 LE contained LGI1 Abs.

To evaluate LGI1 function in the adult hippocampus, we used purified IgG from the serum of a patient diagnosed with LGI1 LE. To ascertain if the purified IgG from the serum of patient with LGI1 LE contains LGI1 Abs, we performed an immunostaining on HEK293T cells expressing LGI1 protein with its partners ADAM22 to fix LGI1 at the surface of cells. We observed that purified IgG from LGI1 LE patient (LGI1 P1) stains the surface of cells expressing LGI1-GFP protein but not purified IgG from healthy subject (Control C1) (fig 1). Thus, we confirmed that purified IgG from LGI1 LE patient recognized LGI1 protein on HEK293T cells and contained LGI1-Abs in opposition to IgG from healthy subject.

3.2. LGI1 Abs reduce the expression of AMPA receptors in the dentate gyrus of the hippocampus.

To investigate if LGI1-Abs modulate the expression of AMPA-R at excitatory or inhibitory neurons, by STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) we analyzed the expression of GluA1 subunits of AMPA-R in hippocampal slices from mice infused with LGI1 or control IgG for 7 days. To distinguish excitatory and inhibitory neurons, we performed this study on hippocampal slices from mice expressing td-tomato in GAD65 interneurons.

First, we quantified the numbers of GluA1 subunits of AMPA-R inside cluster larger than 20 nm at the surface of inhibitory neurons expressing td-tomato (GAD+ cells) in the dentate gyrus (DG), CA3 and CA1 regions respectively (Fig 2A). In the DG, we observed that pre-incubation with LGI1 IgG decrease significantly the relative surface number of GluA1 subunits compared

to ctrl IgG. We did not observe any difference between LGI1 P1 and control C1 IgG infusion in the expression of GluA1 subunits in CA3 or CA1 regions (Fig 2 B-D). We observed that the density of GluA1 clusters was not different after LGI1 P1 or control C1 IgG pre-infusion in all the areas of the hippocampus considered (supplementary data fig. S2). These results indicate that pre-incubation with LGI1 P1 decreased the expression of AMPA-R at the surface of inhibitory neurons of the DG of the hippocampus but not in CA3 or CA1 area.

Secondly, to investigate the expression of AMPA-R at the surface of excitatory neurons, we analyzed a GAD negative (GAD-) region in which GAD+ cells were absent (Fig 3.A). We observed that LGI1 P1 IgG pre-incubation decreased the surface numbers of GluA1 subunits inside clusters in the DG but not in CA3 or CA1 area (Fig 3 B-D). We observed that there was no difference in the density of GluA1 clusters following LGI1 P1 or control C1 IgG pre-incubation in the DG, CA3 or CA1 area (supplementary data fig. S3). Altogether, our results indicate that LGI1-Abs decrease the expression of AMPA-R at the surface of inhibitory and excitatory neurons only in the dentate gyrus of the hippocampus.

3.3. LGI1 Abs increase the hyperexcitability of the neuronal network independently of kv1.1 channels inhibition.

The blockade of LGI1 function leads to epileptic seizures (3). To investigate the effect of LGI1 IgG on the hippocampal neuronal network transmission, we recorded by electrophysiology, the local field potentials (LFP) in CA1 area at the exit of the hippocampal network of acute hippocampal slices mice infused during 7 days with control or LGI1 IgG. First, to determine if the basal transmission was modulated by LGI1 IgG pre-infusion compared to control IgG, we recorded the evoked excitatory post-synaptic potentials (eEPSP) in CA1 area when delivering increasing voltage pulses at Schaffer collaterals. The resulting input-output (IO) curve obtained by analyzing the slope of eEPSP, was not different between LGI1 or control IgG pre-infusion

(fig 4.A). This result means that there is no effect of LGI1 IgG pre-infusion on the basal transmission compared to control IgG. Then, we recorded the spontaneous local field potential in the CA1 area of the hippocampus in order to consider the output of the hippocampal network. In basal condition, we did not observe any spontaneous epileptic activity in hippocampal slices from control or LGI1 infused mice. Thereby, we added 4-aminopyridine (4-AP) (40 μ M), a non-specific blocker of voltage gated potassium channels to induce an hyperexcitability of the hippocampal neuronal network. The addition of 4-AP induced an epileptic like activity consisting in spontaneous depolarizations similar to ictus (fig 4.B). We observed that the induced hyperexcitability was significantly increased in slices from mice pre-infused with LGI1 IgG when compared to slices pre-infused with control IgG (fig 4.C). More specifically, we observed that LGI1 IgG increased the ictus area (fig. 4.D) but not the ictus frequency (fig 4.E) when compared to control IgG. These results indicate that LGI1-Abs increased the hyperexcitability of the neuronal network mainly by increasing the cell synchronization compared to the ctrl IgG. Similar results were obtained with purified IgG from a second patient (supplemental data S4)

We investigated if a chronic inhibition of kv1.1 channels would trigger the same alterations on the neuronal network than the LGI1 P1 IgG pre-infusion. To do this, we infused mice with dendrotoxin-K (DTX-K) (100 nM) for 7 days and record the LFP in CA1 region of acute hippocampal slices from these mice. We recorded eEPSP in the CA1 area of hippocampus after increasing stimulation of Schaffer collaterals and we did not observe any effect of DTX-K infusion on the IO curve compared to LGI1 P1 nor control C1 IgG infusion (fig 4.A). We observed that the global hyperexcitability after DTX-K infusion was not different compared to control C1 IgG, when 4-AP was added to create an hyperexcitability of the hippocampal neuronal network (fig 4.B-C). When looking at area and frequency of the ictus we observed that the ictus area was not different following DTX-K infusion compared to control C1 IgG

infusion (fig 4.D) as well as the frequency of ictus (fig 4.D) although a tendency of increase could be seen. All together these results indicate that the blockage of kv1.1 channels by DTX-K infusion in the hippocampus of mice does not increase the global hyperexcitability.

3.4. LGI1 Abs reduced the inhibitory network transmission.

We showed that LGI1-Abs increased the induced hyperexcitability of the hippocampal neuronal network, independently of kv1.1 channels down-regulation. To investigate if the increased hyperexcitability of LGI1 IgG could result from a down-regulation of the inhibitory network, we recorded the LFP in the CA1 area of acute hippocampal slices from mice pre-infused with LGI1 P1 or control C1 IgG in presence of 4-AP (40 μ M) and picrotoxin (100 μ M), a GABA_A antagonist. In such conditions we did not observe any difference in the global hyperexcitability of the neuronal network between LGI1 P1 and control C1 IgG pre-infusion (fig 5). More specifically, the blockade of the inhibitory network increases the global hyperexcitability of the neuronal network infused for control C1 IgG compared to the non-blockade of the inhibitory network, while the blockage of the inhibitory network did not change the global hyperexcitability of the neuronal network infused with LGI1 P1 IgG compared to the non-blockade of the inhibitory network. Similar results were obtained with purified IgG of a second patient (supplemental data S5). These results indicate that the LGI1-Abs impaired the inhibitory network in the hippocampus which results in the increase of the hyperexcitability of the neuronal network.

4. Discussion

Previous studies reported a decrease of AMPA-R expression when LGI1 function is altered (3,12,16,19). Our work confirmed that LGI1-Abs reduced the expression of AMPA-R and additionally, we showed that this reduction of expression affects both excitatory and inhibitory

neurons of the DG and no other area of the hippocampus. Moreover, we found that LGI1-Abs increased the hyperexcitability of the neuronal network certainly due to a down-regulation of the inhibitory neuronal network. Altogether, our results suggest that the reduction of AMPA-R triggers a more drastic downregulation of the inhibitory transmission compared to the excitatory transmission which creates an imbalance between excitatory and inhibitory networks. This imbalance prevents the inhibitory network to control hyperexcitability of the neuronal network. Our study suggests that the inhibitory network down-regulation is a mechanism probably involved in the generation of epileptic seizures in patients with LGI1 LE.

The reduction of AMPA-R in the DG of the hippocampus after LGI1 IgG infusion is in accordance with the higher expression profile of LGI1 in the DG area compared to CA3 or CA1 area of the hippocampus (2,3,23). The effect of an infusion of LGI1 IgG on the expression of AMPA-R in the hippocampus has been investigated in a previous study in which it was reported a reduction in the DG and CA1 regions after 18 days of Abs infusion (16). Nevertheless, in this study, the infusion was performed into the ventricles and acquisitions were realized with confocal microscopy. In our study, we infused IgG directly into the septum, a structure nearby the hippocampus, and we quantified the AMPA-R expression with a better resolution using STORM microscopy. The goal of our study was to understand how a reduction of AMPA-R expression leads to epileptic seizures. In our electrophysiological experiments, we blocked the potassium channels using 4-AP to create hyperexcitability of the neuronal network and to prevent a functional effect caused by a potential kv1.1 channels alteration. We observed that LGI1 IgG increase the hyperexcitability of the neuronal network when kv channels were blocked. Nevertheless, some authors suggested that the alteration on AMPA-R could be due to a homeostatic regulation of kv1.1 channels (18). Our study does not support this hypothesis. Indeed, we highlighted that a prolonged kv1.1 channels blockage by DTX-K infusion, did not result in an increased neuronal hyperexcitability when kv channels were blocked by 4-AP.

Although we cannot rule out an action of LGI1 IgG on Kv1.1 channels, the results obtained in our specific model underline a specific role of LGI1 in the regulation of AMPA-R independently of kv1.1 channels reported reduction (16,18).

We also demonstrated a decrease of AMPA-R expression on inhibitory and excitatory neurons of the DG. It is important to note that we analyzed the total surface expression of AMPA-R without focusing on the synaptic structure. Indeed, lack of a good combination of primary and secondary antibodies prevented us to investigate synaptic AMPA-R in the hippocampus by super-resolution microscopy in hippocampal slices of infused mice. A recent study showed that the synaptic interactions between LGI1 and ADAM22 are essential for the alignment of presynaptic and postsynaptic compartment involving a large complex of synaptic proteins, including AMPA-R (24). Thereby, it will be interesting to investigate synaptic AMPA-R organization in the hippocampus of mouse infused with LGI1 IgG.

Patients with LGI1 LE exhibited epileptic seizures known to be due to an hyperexcitability and hypersynchronous activity of the neuronal network (9,10,8). Inhibitory network disturbance has already been shown to drive neuronal network hyperexcitability especially in the DG (25–27). Indeed, interneurons are essential for the control of the balance of neuronal transmission (28,29). In our study, we suggest a role of the inhibitory network in the epileptic seizures observed in patient with LGI1 LE. Even if the expression of AMPA-R is reduced at the surface of both excitatory and inhibitory neurons of the hippocampus, the high arborization of interneurons allow them to contact many excitatory neurons. For example, it was shown that one basket cell can contact 2,500 pyramidal cells and that hilar perforant path associated cell (HIPP cells) may generate 100,000 synapses on the DG (30,31). Moreover, the dentate granule cells project mostly on inhibitory neurons compared to excitatory neurons (32). Thus, a reduction of excitatory inputs on CA3 region provide an increase of the overall excitability due to an imbalance between excitation and inhibition transmission. Thus, these arguments can

explain why small alterations of interneurons functioning may lead to high consequences of the neuronal network balance. Different subtypes of interneurons composed the hippocampal network (31) and the role of LGI1 in these different sub-populations remain to be elucidated. Further studies are needed to clarify the exact mechanisms underlying the dysregulation of the inhibitory network by LGI1 abs.

5. Conclusion

To conclude, we demonstrated an essential role of LGI1 in the regulation of AMPA-R expression and revealed a functional role of LGI-1 mainly on the inhibitory network. More studies are needed to clarify the underlying mechanisms of the dysregulation observed in LGI1 LE patients but our results indicate that special attention should be given to the inhibition as a leading cause for epilepsy in these patients.

Acknowledgement: We thank Camilla Luccardini, Bruno Chapuis and Denis Ressnikoff from the Centre d’Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE), Alexandra Vandermoeten from the Animalerie SPF SCAR at the Faculté de Médecine et de Pharmacie Rockefeller. We thank Magali Mondin from Bordeaux Imaging Center for helping in the development of an analysis program on SR Tesseler software.

Funding: This work was supported by FRM (*Fondation pour la recherche médicale*) DQ20170336751. This work has been developed within the BETPSY project, which is supported by a public grant overseen by the ANR (*Agence nationale de la recherche*), as part of the second “*Investissements d’Avenir*” program (reference ANR-18-RHUS-0012). Elodie Fels was supported by a research grant from the *Université Claude Bernard Lyon 1* attributed by the doctoral school *Neurosciences et Cognition* (ED476).

Conflict of interest: The authors report that there is no conflict of interest.

References:

1. 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.* 2002 Mar;30(3):335–41.
2. Senechal KR, Thaller C, Noebels JL. ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum Mol Genet.* 2005 Jun 15;14(12):1613–20.
3. 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.* 2010 Feb 23;107(8):3799–804.
4. 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 Oct;15(10):1208–14.
5. 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.* 2010 Sep;133(9):2734–48.
6. 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. *Lancet Neurol.* 2010 Aug;9(8):776–85.
7. Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, et al. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol.* 2011 May;69(5):892–900.

8. 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*. 2016 Aug 23;87(8):759–65.
9. van Sonderen A, Petit-Pedrol M, Dalmau J, Titulaer MJ. The value of LGI1, Caspr2 and voltage-gated potassium channel antibodies in encephalitis. *Nat Rev Neurol*. 2017 May;13(5):290–301.
10. Vogrig A, Pauletto G, Lettieri C, Valente M, Gigli GL. Peculiar EEG signatures, ictal drinking and long-term follow-up in anti-LGI1 encephalitis. *Neurol Sci*. 2019 Jul;40(7):1503–5.
11. Fukata Y. Epilepsy-Related Ligand/Receptor Complex LGI1 and ADAM22 Regulate Synaptic Transmission. *Science*. 2006 Sep 22;313(5794):1792–5.
12. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, et al. Autoantibodies to Epilepsy-Related LGI1 in Limbic Encephalitis Neutralize LGI1-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *J Neurosci*. 2013 Nov 13;33(46):18161–74.
13. Sagane K, Ishihama Y, Sugimoto H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int J Biol Sci*. 2008;387–96.
14. 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*. 2018 Dec;9(1):1546.
15. Lancaster E, Burnor E, Zhang J, Lancaster E. ADAM23 is a negative regulator of Kv1.1/Kv1.4 potassium currents. *Neurosci Lett*. 2019 Jun;704:159–63.
16. 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]*. 2018 Oct 20 [cited 2021 Mar 1]; Available

from: <https://academic.oup.com/brain/advance-article/doi/10.1093/brain/awy253/5140106>

17. Schulte U, Thumfart J-O, Klöcker N, Sailer CA, Bildl W, Binossek M, et al. The Epilepsy-Linked Lgi1 Protein Assembles into Presynaptic Kv1 Channels and Inhibits Inactivation by Kv β 1. *Neuron*. 2006 Mar;49(5):697–706.
18. 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*. 2017 Jul 18;114(29):7719–24.
19. 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*. 2015 Jul 28;112(30):E4129–37.
20. Besser S, Sicker M, Marx G, Winkler U, Eulenburg V, Hülsmann S, et al. A Transgenic Mouse Line Expressing the Red Fluorescent Protein tdTomato in GABAergic Neurons. Mothet J-P, editor. *PLOS ONE*. 2015 Jun 15;10(6):e0129934.
21. Heilemann M, van de Linde S, Schüttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, et al. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angew Chem Int Ed*. 2008 Aug 4;47(33):6172–6.
22. van de Linde S, Sauer M, Heilemann M. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J Struct Biol*. 2008 Dec;164(3):250–4.
23. 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 Res*. 2010 Jan;1307:177–94.

24. 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*. 2021 Jan 19;118(3):e2022580118.
25. André V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Gabaergic Neurons in Rat Epileptic Hippocampus. *Hippocampus*. 2001;11(4):452–68.
26. Dudek FE, Sutula TP. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. In: *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2021 Oct 2]. p. 755–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612307630416>
27. Wyeth MS, Zhang N, Mody I, Houser CR. Selective Reduction of Cholecystokinin-Positive Basket Cell Innervation in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci*. 2010 Jun 30;30(26):8993–9006.
28. Chamberland S, Topolnik L. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front Neurosci* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jul 1];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2012.00165/abstract>
29. Booker SA, Vida I. Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res*. 2018 Sep;373(3):619–41.
30. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In: *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2021 Jul 20]. p. 3–790. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612307630015>
31. Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev*. 2017 Oct 1;97(4):1619–747.

32. Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus. *J Neurosci*. 1998 May 1;18(9):3386–403.

Figures:

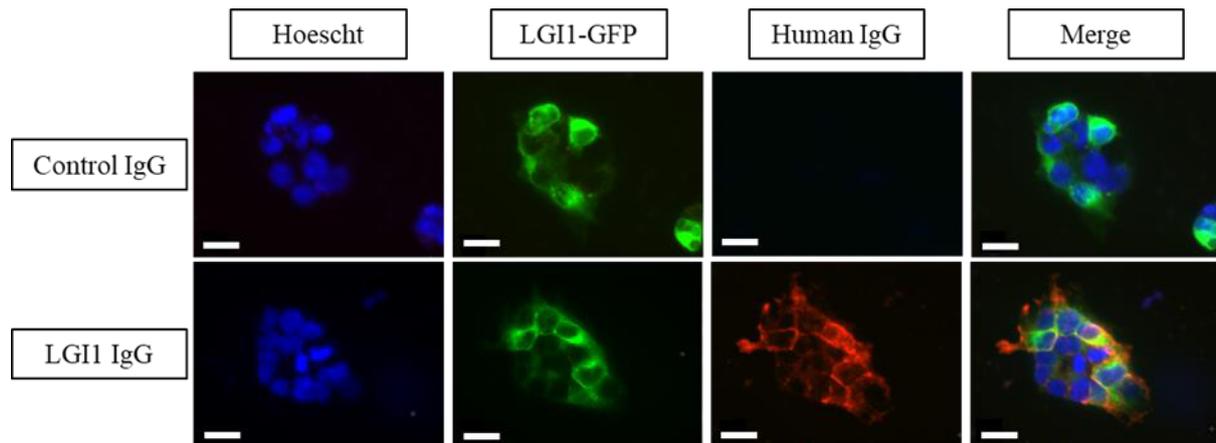


Figure 1. Purified IgG from LGI1 LE patient contain LGI1 Abs. HEK293T cells were transfected with LGI1-GFP and ADAM22 plasmids. Purified IgG from LGI1 LE patient are colocalized with LGI1-GFP signal at the cell surface of HEK293T transfected cells while no signal was found in cells treated with purified IgG from healthy subject. Scale bar = 20 μ m.

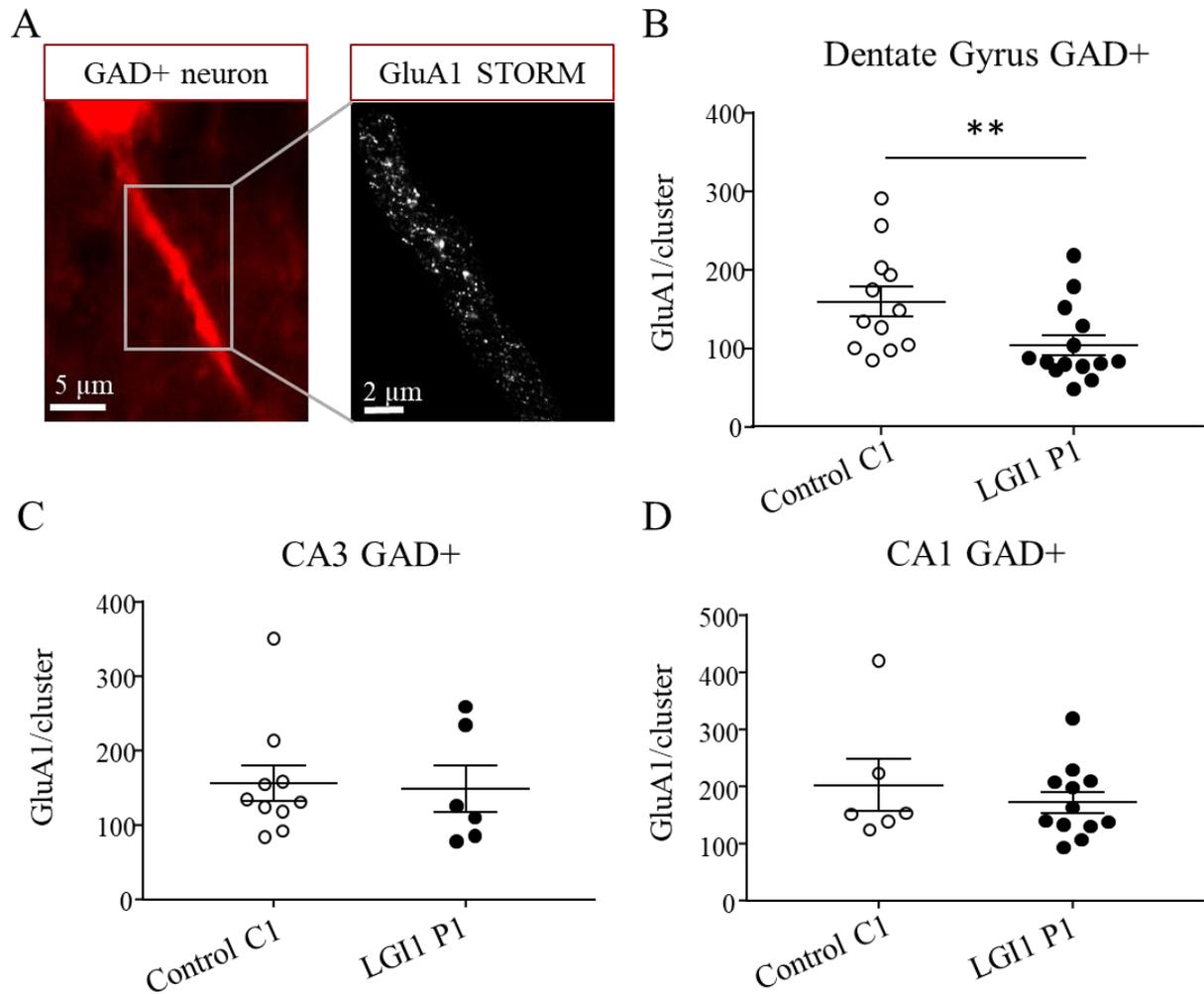


Figure 2. LGI1 Abs decrease the expression of AMPA-R inside clusters at the surface of interneurons in the hippocampus. Epifluorescence images (100x objective) of an inhibitory GAD+ neuron expressing td-tomato (left image). Magnification of the corresponding super-resolution STORM image showing the expression of GluA1 subunits along the neuronal extension (right image) (A). The total density of surface GluA1 subunits decreased after LGI1 P1 IgG infusion compared to control C1 IgG infusion at the surface of interneurons in the DG (Mann-Whitney $**p=0,0091$, $n_{\text{Ctrl}}=12$ neurons, $n_{\text{LGI1}}=14$ neurons) (B) but not in CA3 region (Mann-Whitney test $p=0,63$, $n_{\text{Ctrl}}=11$ neurons, $n_{\text{LGI1}}=6$ neurons) nor CA1 region of the hippocampus (Mann-Whitney t-test $p=0,68$, $n_{\text{Ctrl}}=6$ neurons, $n_{\text{LGI1}}=12$ neurons). Data are represented as means \pm SEM (analyse realized from $n_{\text{Ctrl}}=4$ mice, $n_{\text{LGI1}}=3$ mice).

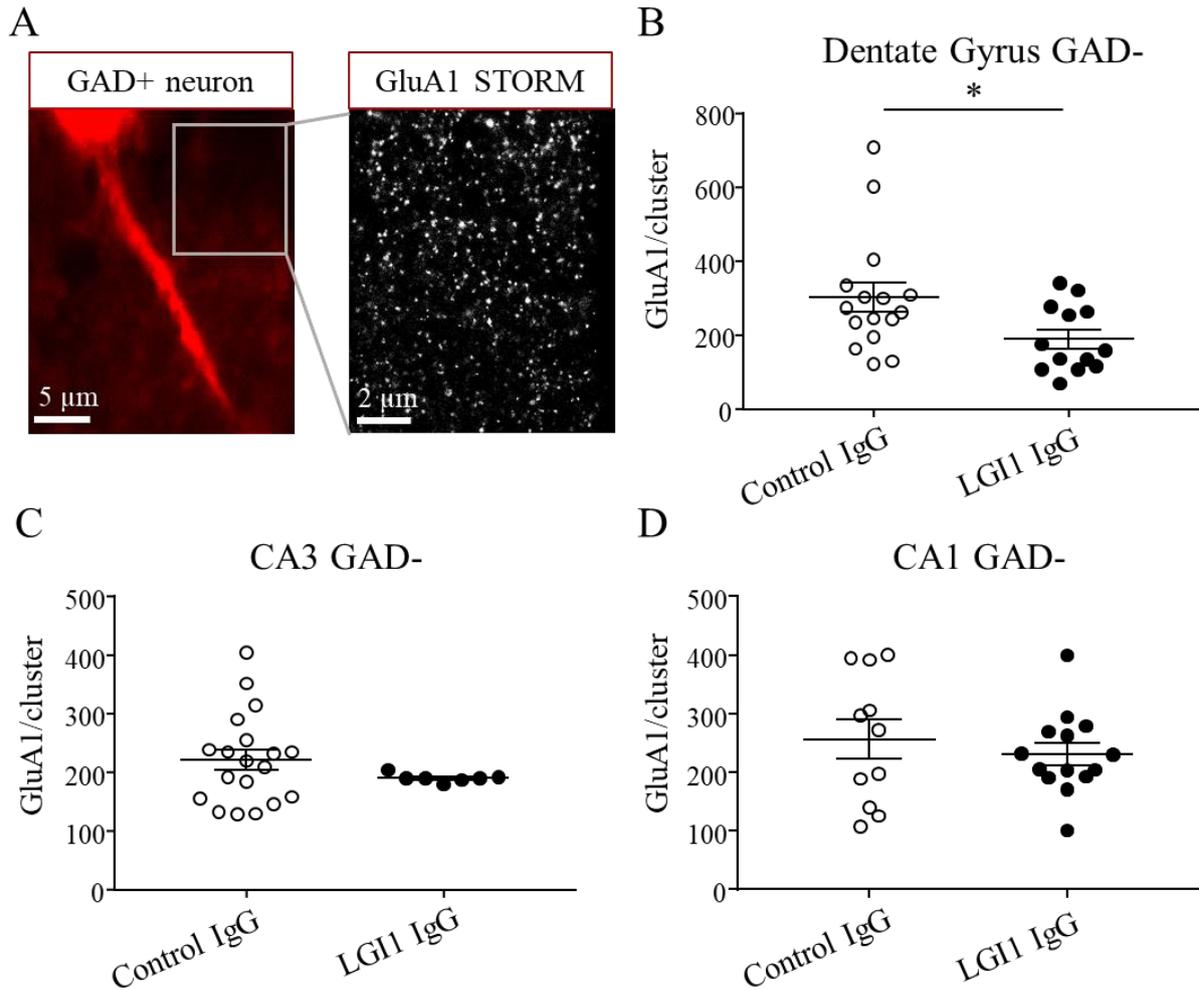
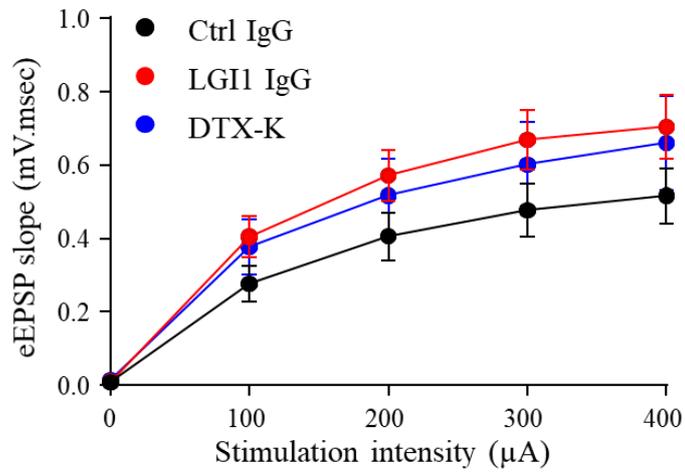
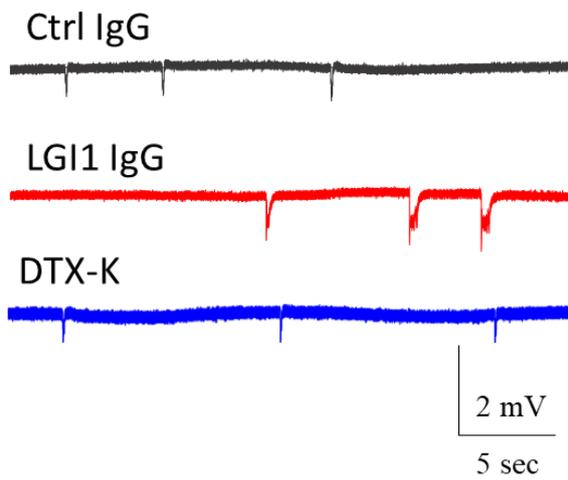


Figure 3. LGI1 Abs decrease the expression of AMPA-R inside clusters at the surface of excitatory neurons in the hippocampus. Epifluorescence images (100x objective) of GAD-region representing excitatory neurons (left image). The magnification showing the super-resolution STORM image of the expression of GluA1 subunits in the GAD- region (right image) (A). The total density of surface GluA1 subunits decreased after LGI1 P1 IgG infusion compared to control C1 IgG infusion in GAD- area in the DG of the hippocampus (Unpaired t test $*p=0,031$, $n_{\text{Ctrl}}=16$ area, $n_{\text{LGI1}}=13$ area) (B) but not in CA3 region (Mann-Whitney test $p=0,33$, $n_{\text{Ctrl}}=19$ area, $n_{\text{LGI1}}=9$ area) nor CA1 (Unpaired t-test $p=0,49$, $n_{\text{Ctrl}}=11$ area, $n_{\text{LGI1}}=14$ area). Data are represented as means \pm SEM (analyse realized from $n_{\text{Ctrl}}=4$ mice, $n_{\text{LGI1}}=3$ mice).

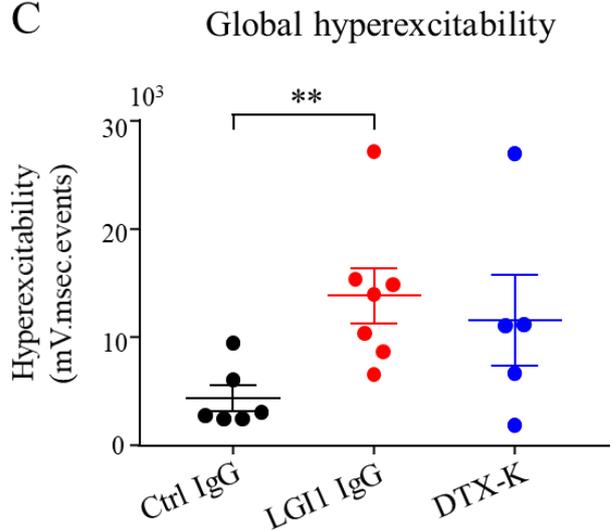
A IO curve



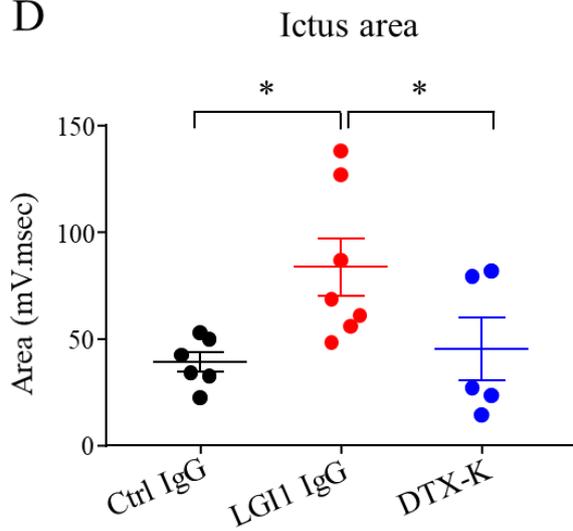
B



C



D



E

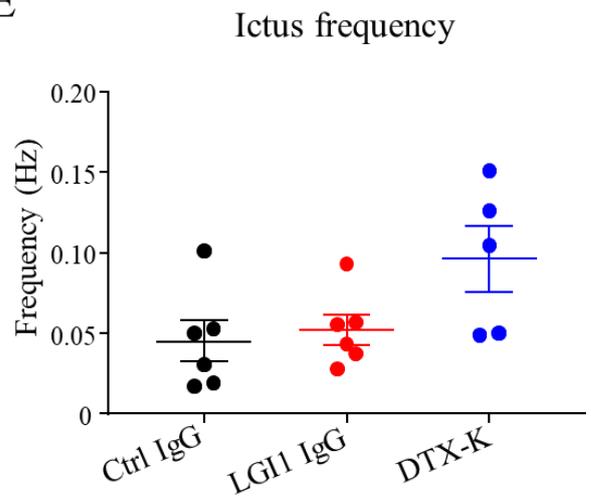


Figure 4. LGI1 abs increase induced neuronal hyperexcitability in the hippocampus through other mechanism than a blockage of kv1.1 channels. LFP were recorded in CA1 region of acute hippocampal slices from mice infused for 7 days with control C1 IgG, LGI1 P1 IgG or DTX-K (100nM). Increasing stimulations intensity were delivered to Schaffer collaterals and the slope of eEPSP in CA1 area was plotted. No effect of the infusion of control C1 IgG, LGI1 P1 IgG or DTX-K on the IO curve was detected (two-way ANOVA test, $p=0,27$; $n_{Ctrl}=12$; $n_{LGI1}=14$; $n_{DTX-K}=8$ mice) (A). Examples of ictus recorded in slices infused with control C1 IgG, LGI1 P1 IgG or DTX-K (B). The global hyperexcitability of the neuronal network is increased after LGI1 P1 IgG infusion compared to control C1 IgG infusion (Kruskal-Wallis test $*p=0,02$, Dunn's *post Hoc* test LGI1-Ctrl $**p=0,0082$) but not compared to DTX-K infusion (Dunn's *post Hoc* test LGI1-DTX-K $p=0,40$). The global hyperexcitability is not different between DTX-K infusion and control C1 IgG infusion (Dunn's *post Hoc* test DTX-K-Ctrl $p=0,11$). (C). The ictus area is increased after LGI1 P1 IgG infusion compared to control C1 IgG infusion and compared to DTX-K infusion (one-way ANOVA $*p=0,029$, Fisher LSD *post Hoc* test, LGI1- Ctrl $*p=0,014$; IgG LGI1-DTX-K $*p=0,04$). The ictus area is not different between DTX-K infusion and control C1 IgG infusion (Fisher LSD *post Hoc* test, Ctrl-DTX-K $p=0,73$) (D). The ictus frequency is not different between LGI1 P1 IgG, control C1 IgG or DTX-K infusion (Kruskal-Wallis test, $p=0,09$) (E). Data are represented as mean \pm SEM ($n_{Ctrl}=6$ mice, $n_{LGI1}=7$ mice, $n_{DTX-K}=5$ mice).

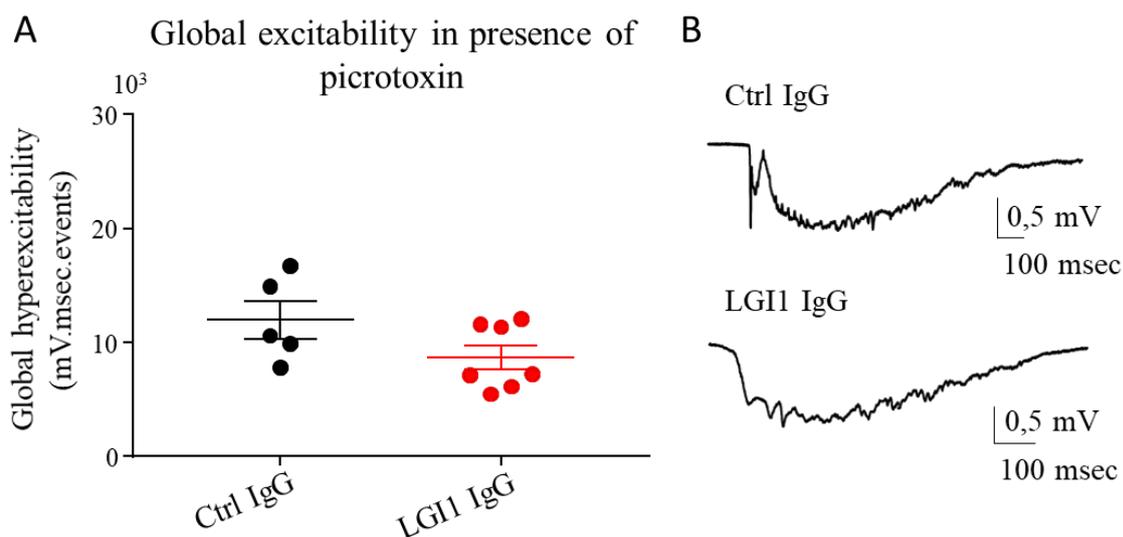


Figure 5. LGI1 abs have no effect on the global hyperexcitability when the inhibitory network is block. (A) LFP in presence of 4-AP (40 μ M) and picrotoxin (100 μ M) were recorded in CA1 area of acute hippocampal slices from mice infused for 7 days with control C1 or LGI1

P1 IgG. No difference was found in the global hyperexcitability between control C1 IgG and LGII P1 IgG infused neuronal network when recordings were performed in presence of picrotoxine (Mann-Whitney test $p=0,20$, $n_{ctrl} = 6$ mice, $n_{LGII} = 7$ mice). (B) Examples of ictus recorded in presence of 4-AP and picrotoxine.

Supplementary materials :

Immunoglobulins G purification

The serum of a 73-years old woman diagnosed with LGII limbic encephalitis suffering from severe cognitive deficits, major memory loss and epileptic seizures was used in this study. The serum was provided by the French Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndromes and Autoimmune Encephalitis and the NeuroBioTec from Hospices Civils de Lyon. Control IgG were obtained from the serum of a healthy subject with no neurological disorder provided by the Etablissement Français du Sang (EFS).

Both ctrl and LE serum were kept at -80°C until the purification of the IgG. Protein-A coated beads (Protein A-Sepharose 4B Fast Flow, Sigma, #P9424) were washed 3 times with PBS before to be incubated with serums for 2 hours. Then, the beads were placed into chromatography columns (Evergreen Scientific, #208-3384-060) and washed 2 times with PBS and 1 time with 0,01% NP40. IgG were eluted with glycine (0,1M pH 2,8) and neutralized with Tris-HCL (1,5M, pH 8,8) before to be dialyzed (Dialysis Cassettes, Thermofisher, #87730) against PBS overnight at 4°C . Concentrations of purified IgG were determined by nanodrop assay. The solution of purified IgG was filtered (filters $0,22\mu\text{m}$, Dutscher # 2528619) and conserved at -80°C . During experiments, purified IgG samples were kept at 4°C no more than 1 week.

Electrophysiology:

After 7 days of infusion with purified IgG, 7 weeks old mice were anesthetized using isoflurane. The brain was removed from the skull and immediately chilled in sucrose artificial cerebrospinal fluid (aCSF) at 4°C composed of (mM): 250 Sucrose, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose saturated with 95% O₂ et 5% CO₂. Acute hippocampal slices (400µm) were cut in sucrose aCSF using a vibratome (HM 650V, ThermoFisher) and stored in regular aCSF of the following composition (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ at room temperature for 2 hours before recordings.

Hippocampal slices from the infused hemisphere were transferred in a recording chamber perfused with aCSF at 37°C to record the evoked excitatory post-synaptic potentials (eEPSP) and the local field potentials (LFP) in the CA1 region of the hippocampus. Glass electrodes (3-5 MΩ) filled with regular aCSF were used for the recordings. Signals were amplified using MultiClamp 700B amplifier (Axon CNS, Molecular Devices). For eEPSP recordings, a stimulating electrode (Phymep, #CBAR C75) was position on the Schaeffer collaterals. To establish the input-output (IO) curve, increasing stimulations between 0 to 600 µA for 0,05msec at 0,01Hz were delivered, and evoked responses were recorded in the CA1 region at the level of the proximal dendrites. The slope of the eEPSP were analysed. For the rest of the experiment, the stimulation intensity was fixed at 50% of the maximal amplitude of eEPSP.

To study the global hyperexcitability of the network, LFP were recorded in the CA1 region of hippocampus. Stimulations of the Schaeffer collaterals for 0,05 msec at 0,03Hz were performed to check the stability of the recording, until the first ictus was triggered. The baseline was recorded for 15 min before the addition of 4-aminopyridine (4-AP) (40µM, Tocris #0940) alone or 4-AP (40µM) and picrotoxin (100µM, Tocris #1128) during 20 min. Recordings lasted for 25 min after washed off. Acquisitions were made using USB-622I National Instrument card connected to a window PC running WinWCP software. Analyses were made using Clampfit

v10.2 software. For ictus recognition and analyze, a template of the means of 10 ictus traces were performed in the recording. The template search function allowed us to collect every ictus of the recording to analyze their frequency and their area.

PSD enrichment and immunoblot:

Post-synaptic density (PSD) fractions were realized from hippocampal slices of infused mice with control purified IgG. Hippocampal slices were incubated in buffer solution 1 composed of 0,32M sucrose, 10 mM HEPES, pH7,4 completed with protease inhibitor (Sigma, #4693132001) and orthovanadate (Biolabs, # P0758S) for 10 minutes on ice. Then, a trituration step in the buffer solution 1 allowed to dissociate cells before to be centrifugated for 10 minutes at 1 000g to remove nuclei and large debris. Supernatant was collected et centrifugated at 12 000g for 20 minutes. Crude membrane fractions in the pellets were collected and resuspended in the buffer solution 2 composed of 1mM EDTA, 4 mM HEPES, pH 7,4, to chelate calcium, and centrifugated at 12 000g for 20 minutes. This step was repeated twice. The synaptosomal fractions in the pellet was resuspended and incubated for 1 hour in the buffer solution 3 composed of 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0,5% Triton, pH 7,4 at 4°C. The solution was centrifugated at 12 000g for 20 minutes. The non-PSD fraction contained in the supernatant was collected and the PSD fraction contained in the pellet was resuspended in the buffer solution 4 composed of 0,15 mM NaCl, 1% Triton, 1% DOC, 1%SDS, 20mM HEPES, pH 7,5 incubated for 1 hour at 4°C. The PSD fraction was then collected after centrifugation at 10 000g for 15 minutes.

Immunoblot were performed from 2-5 μ g of proteins on a polyacrylamide gel 4-12% (Biorad, #3450124). Gels were transferred on nitrocellulose membrane and incubated with the following antibodies: anti-ADAM22 (Abcam, # ab231340), anti-ADAM23 (abcam, # ab28304) anti-PSD-95 (Cell Signaling, #3450S), anti-Synaptophysine (Sigma, # S5768). These antibodies were checked to work for western blot prior to be used. Secondary antibodies conjugated to

horseradish peroxidase (HRP) directed against mice (JacksonLabs, #115-036-003) or rabbit (JacksonLabs, #11-036-003) were used. Revelation and analysis have been realised with ImageLab software.

Super-resolution microscopy STORM:

To perform super-resolution microscopy, stained slices fixed on coverslips were mounted in cavity slides (Marienfield # 631-9475) embedded into a switching buffer for dSTORM as reported [19,20]. Image acquisitions were performed using a Nikon PALM-STORM microscope equipped with an EM-CCD camera (Andor Ixon 897 Ultra, gain 250). Acquisitions were made using the software NIS-Element.

Hippocampus area was localized using a 20x objective (NA 0.5) before switching to a 100x objective (NA 1.49) oil-immersion objective to focus on a GAD+ cell at the interest area. The analyses were performed in the molecular layer of the dentate gyrus, and in the *stratum radiatum* and *stratum lacunosum moleculare* of the CA3 and CA1 regions. A wide field (WF) image at 561 nm excitation wavelength was performed prior to size a region of interest (ROI) of 256x256 pixels (pixel size: 157,29 nm). Super-resolution acquisitions were performed using a 642 nm wavelength laser diode at 320 mW of the laser power and a Cy5 filter 4040C (M352119). 30 000 frames per acquisition were performed. Localization tabs were generated with ThunderStorm plugin on Image J software on the 25 000 last frames per acquisition before analysis through SR Tesseler software. Clusters GluA1 were detected with the following parameters: minimum area 20 nm, minimum detections 20 for GAD+ cells; and minimum area 20 nm, minimum detections 50 for GAD- cells. The number of GluA1 spots was then quantify inside those clusters. The density of detections was determined through the surface of the ROI.

Supplementary figures:

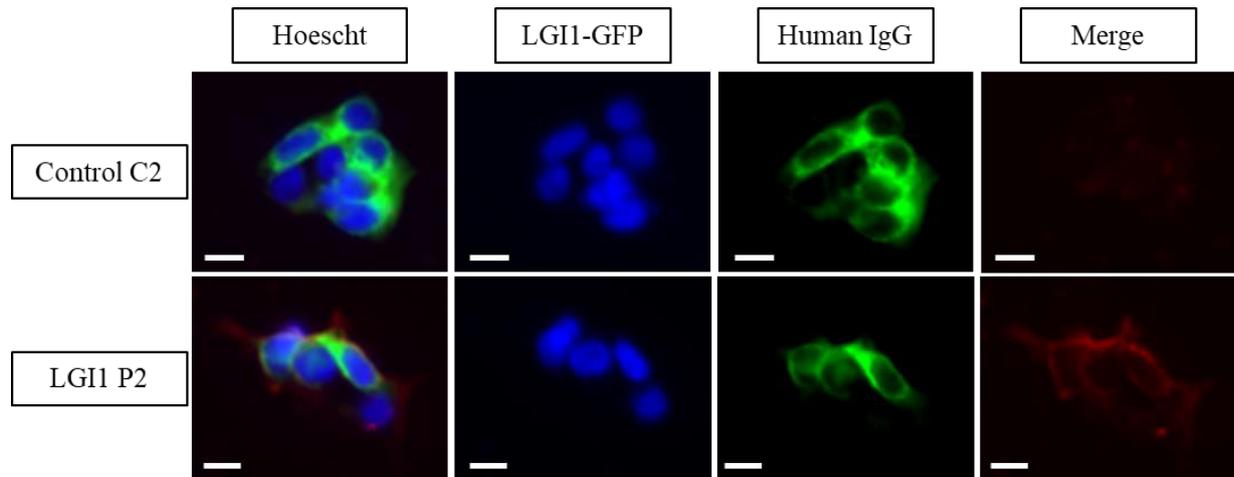


Figure S1. IgG purified from the serum of LGI1 P2 patients contain LGI1 Abs. HEK293T cells were transfected with LGI1-GFP plasmid and ADAM22 plasmids. Purified IgG from LGI1 P2 patient are colocalized with LGI1-GFP signal at the cell surface of HEK293T transfected cells while no signal was found in cells treated with purified IgG from healthy subject control C2. Scale bar = 10 μ m.

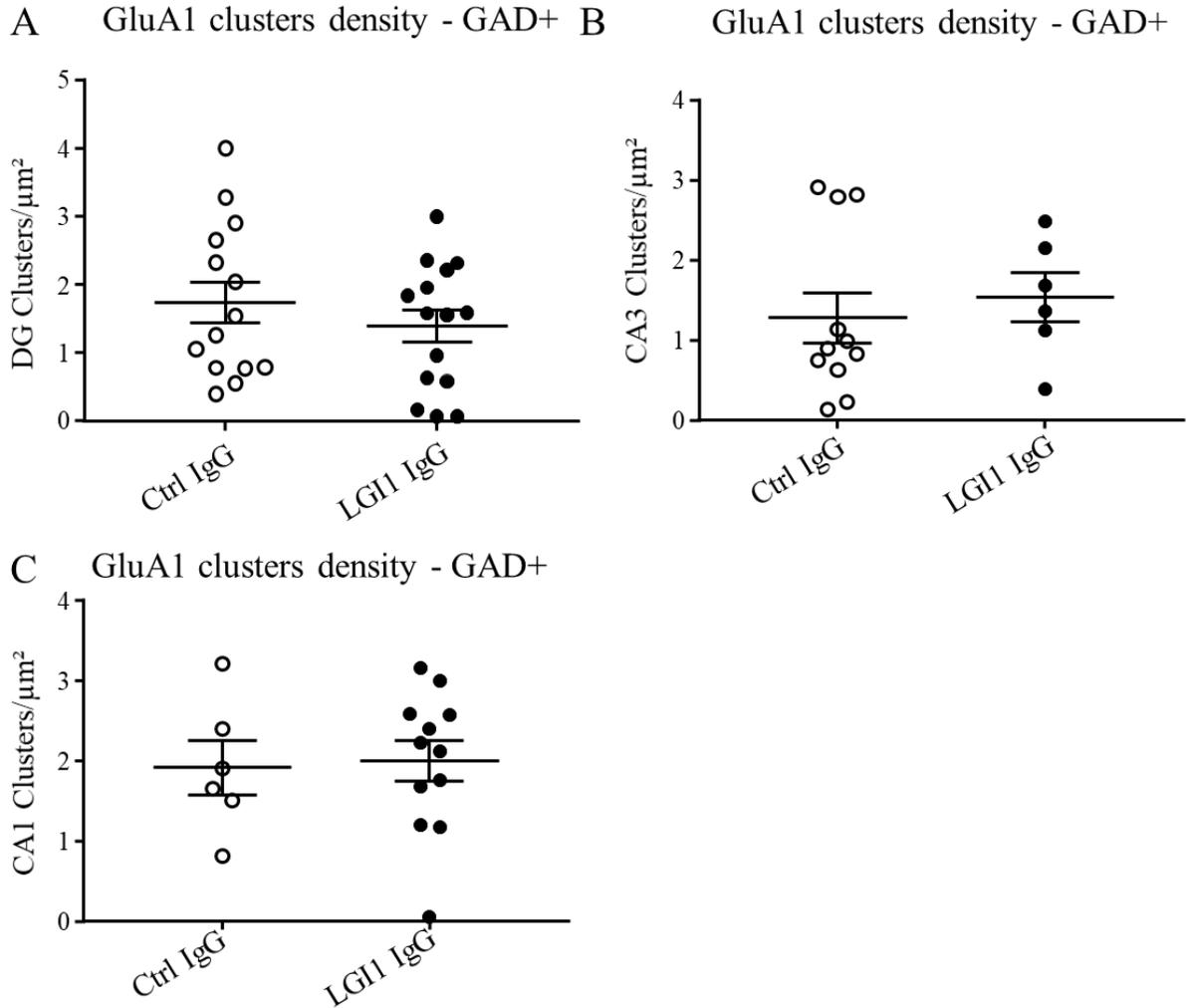


Figure S2. LGI1 IgG have no effect on the density of GluA1 clusters at the surface of inhibitory neurons. (A-C) The density of GluA1 clusters at the surface of inhibitory neurons is not different between LGI1 IgG and ctrl IgG infusion in the DG (Unpaired Student-t test, $p=0,38$), CA3 (Unpaired Student-t test, $p=0,61$) or CA1 (Unpaired Student-t test, $p=0,85$) regions of the hippocampus. Data are represented by means \pm SEM.

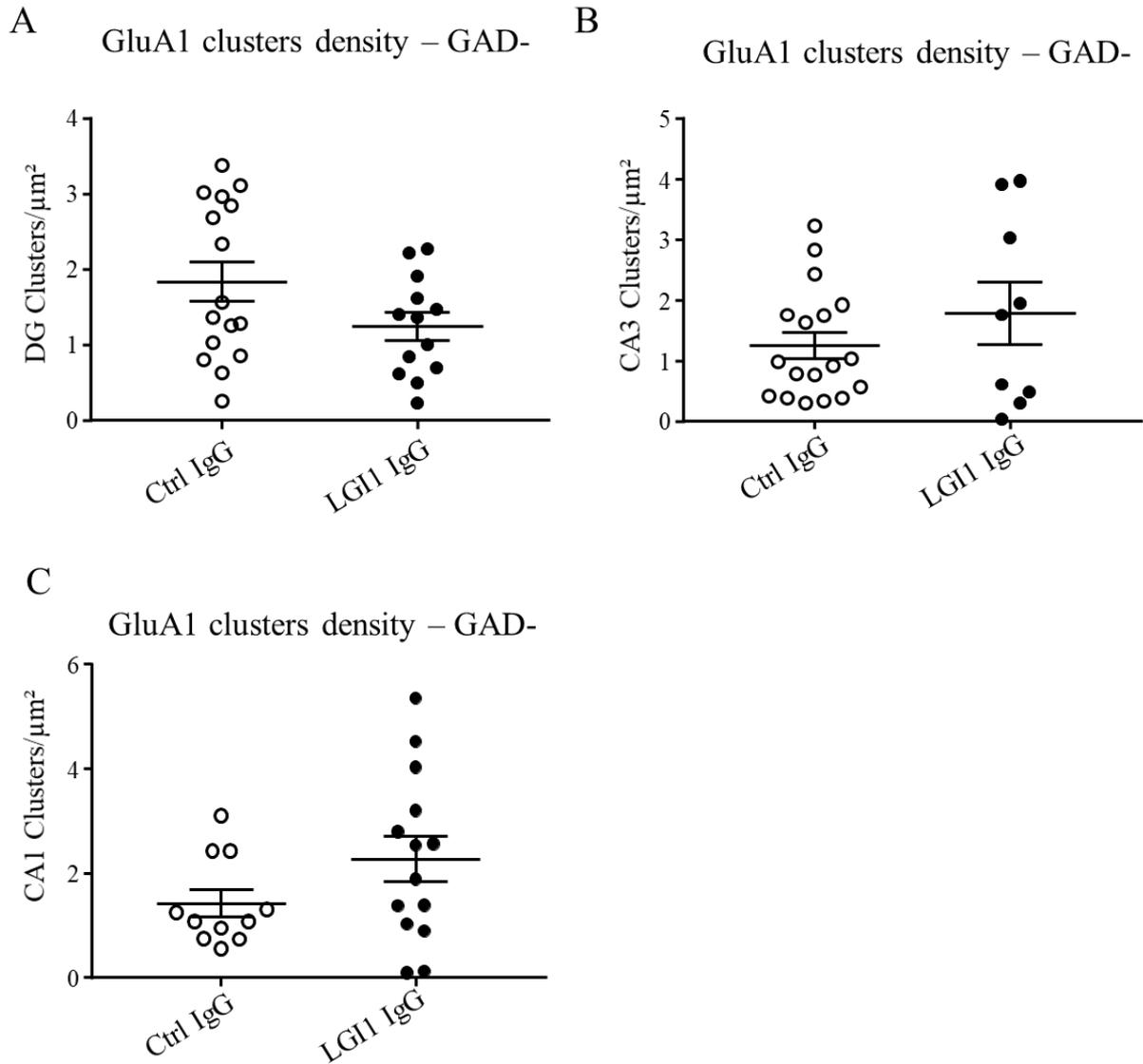


Figure S3. LGI1 IgG have no effect on the density of GluA1 clusters at the surface of excitatory neurons. (A-C) The density of GluA1 clusters at the surface of excitatory neurons is not different between LGI1 IgG and ctrl IgG infusion in the DG (Mann-Whitney test, $p=0,15$), CA3 (Mann-Whitney test, $p=0,53$) or CA1 (Mann-Whitney test, $p=0,13$). Data are represented by means \pm SEM.

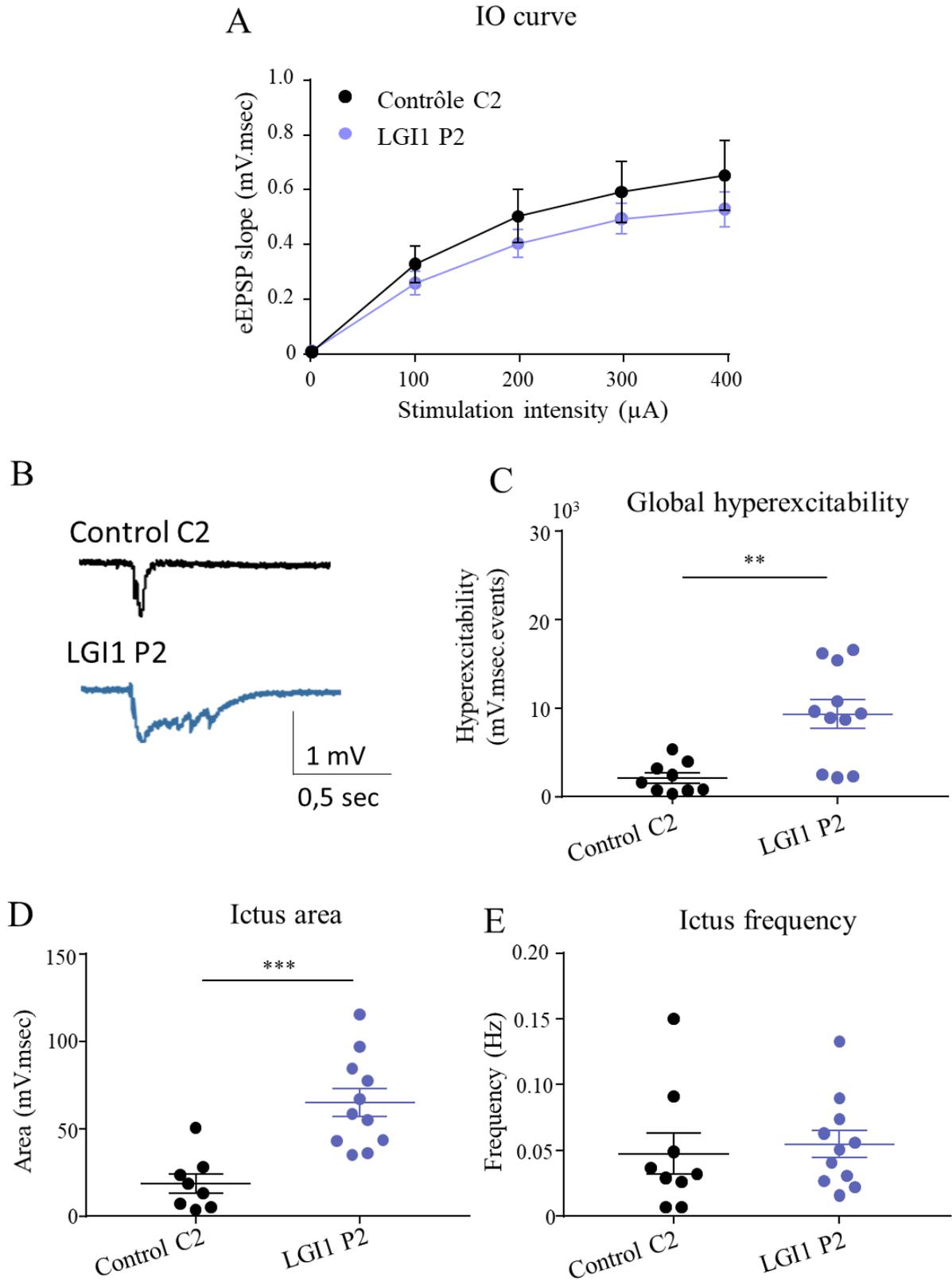


Figure S4. LGI1 abs increase induced neuronal hyperexcitability in the hippocampus. LFP were recorded in CA1 region of acute hippocampal slices from mice infused for 7 days with

control C2 IgG or LGI1 P2 IgG. Increasing stimulations intensity were delivered to Schaffer collaterals and the slope of eEPSP in CA1 area was plotted. No effect of the infusion of control C2 IgG or LGI1 P2 IgG on the IO curve was detected (two-way ANOVA test, $p=0,28$; $n_{C2}= 9$; $n_{P2}= 11$;) (A). Examples of ictus recorded in slices infused with control C2 IgG or LGI1 P2 IgG (B). The global hyperexcitability of the neuronal network is increased after LGI1 P2 IgG infusion compared to control C2 IgG infusion (Mann-Whitney test $**p=0,002$) (C). The ictus area is increased after LGI1 P2 IgG infusion compared to control C2 IgG infusion (Student T-test $***p=0,0004$) (D). The ictus frequency is not different between LGI1 P2 IgG or control C2 infusion (Mann-Whitney test, $p=0,44$) (E). Data are represented as mean \pm SEM ($n_{Ctrl} = 9$ mice, $n_{LGI1} = 11$ mice).

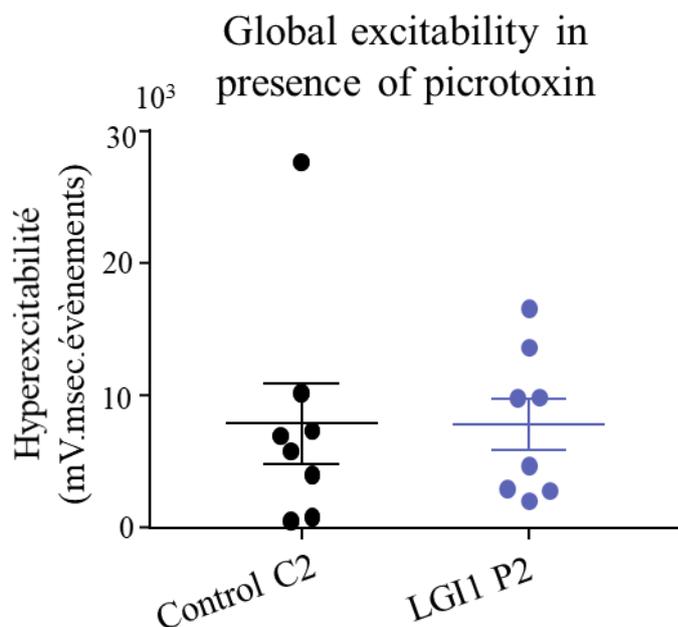


Figure S5. LGI1 abs have no effect on the global hyperexcitability when the inhibitory network is block. (A) LFP in presence of 4-AP (40 μ M) and picrotoxin (100 μ M) were recorded in CA1 area of acute hippocampal slices from mice infused for 7 days with control C2 or LGI1 P2 IgG. No difference was found in the global hyperexcitability between control C2 IgG and LGI1 P2 IgG infused neuronal network when recordings were performed in presence of

picROTOXINE (Mann-Whitney test $p=0,80$, $n_{\text{Ctrl}} = 8$ mice, $n_{\text{LGI1}} = 8$ mice). (B) Examples of ictus recorded in presence of 4-AP and picROTOXINE.