



**HAL**  
open science

# Régulation de l'excitabilité intrinsèque par Kv2.1 et son implication dans les encéphalopathies épileptiques

Anne-Lise Paupiah

► **To cite this version:**

Anne-Lise Paupiah. Régulation de l'excitabilité intrinsèque par Kv2.1 et son implication dans les encéphalopathies épileptiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS353 . tel-04344581

**HAL Id: tel-04344581**

**<https://theses.hal.science/tel-04344581>**

Submitted on 14 Dec 2023

**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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale N° 158  
Cerveau, Cognition, Comportement

*Institut du Fer à Moulin*  
*Equipe « Plasticité des réseaux corticaux et épilepsie »*

# REGULATION DE L'EXCITABILITE INTRINSEQUE PAR KV2.1 ET SON IMPLICATION DANS LES ENCEPHALOPATHIES EPILEPTIQUES

Par Anne-Lise Paupiah

Thèse de doctorat de Neurosciences  
Dirigée par Pr. Marianne Renner

Présentée et soutenue publiquement le 12 octobre 2023  
devant un jury composé de :

Pr. Anne Roumier, Sorbonne Université  
Pr. Sabir Jacquir, Université Paris-Saclay  
Dr. Eric Hosy, CNRS  
Dr. Lydia Danglot, CNRS  
Dr. Christian Specht, INSERM  
Pr. Marianne Renner, Sorbonne Université

Présidente du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinateur  
Directrice de thèse

# RESUME

Les canaux Kv2, qui sous-tendent  $\approx 80\%$  du courant  $K^+$  à rectification retardée, sont nécessaires pour une repolarisation efficace de la cellule lors de décharges de potentiels d'action à forte fréquence. Cependant, il a été aussi suggéré que ces canaux aient un rôle lié à leur capacité de créer des clusters à la surface des neurones, au niveau du soma, des dendrites proximales et du segment initial de l'axone. En effet, certains clusters co-localisent avec des zones de contact entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique et il a été proposé que Kv2.1 pourrait organiser ces contacts et moduler la signalisation calcique indépendamment de son rôle de canal potassique. De plus, une étude a montré que les canaux Kv2.1 présents dans les clusters ont une conductance très réduite. L'état de phosphorylation, régulée par l'activité neuronale, impacte de manière considérable leur dépendance au voltage et leur capacité à former des clusters.

Les mutations de *Kcnb1*, le gène codant pour Kv2.1, ont été récemment associées à des encéphalopathies épileptiques, combinant crises épileptiques avec troubles moteurs et cognitifs. De manière intéressante, plusieurs mutations non caractérisées du point de vue fonctionnel, ciblent l'extrémité C-ter de la sous-unité Kv2.1, donnant des protéines tronquées dépourvues du domaine « Proximal Restriction and Clustering » (PRC) responsable de la formation de clusters. Les patients portant ces mutations n'ont pas toujours de troubles épileptiques mais présentent des retards cognitifs et troubles autistiques.

Au cours de ma thèse j'ai donc cherché à caractériser deux mutations impactant le domaine PRC ayant comme hypothèse que leur incapacité à former de clusters aurait une conséquence fonctionnelle sur l'excitabilité neuronale. Dans un premier temps, j'ai décrit les modifications de la distribution des canaux Kv2.1 Y533\* et R583\*, par des expériences de microscopie confocale et de super-résolution PALM/STORM en les transfectant dans des neurones pyramidaux en culture. Les canaux portant les sous-unités mutées se retrouvent redistribués vers les dendrites distales et ils forment de clusters de petite taille. L'analyse de leur diffusion latérale par suivi de particules uniques m'a permis d'avancer l'hypothèse que les sous-unités mutées forment des canaux mixtes avec les canaux endogènes non mutés, ce qui expliquerait leur formation résiduelle de clusters. Du point de vue fonctionnel, avec des expériences de patch-clamp j'ai montré que les neurones exprimant les sous-unités mutées ont une excitabilité réduite par rapport aux ceux exprimant les canaux sauvages. La littérature propose un rôle du Kv2 dans les propriétés actives ainsi que dans les transients calciques des dendrites. J'ai donc adapté un modèle biophysique de neurone pyramidal d'hippocampe (CA1) pour analyser cette possibilité en prenant compte de différences de distribution de canaux sauvages et mutés, ainsi que les variations de dépendance au voltage. Le

modèle prédit un effet important dans le cas d'une activation synaptique prolongée. Mes expériences d'imagerie calcique confirment cette prédiction, car la stimulation des neurones en bloquant le Kv2 entraîne une augmentation des transients calciques dendritiques révélant une action probable sur la rétropropagation de potentiels d'action.

En conclusion, mes résultats suggèrent fortement que la régulation de la formation de clusters de Kv2.1 participe au contrôle de l'excitabilité neuronale et que la modification de leur conductance dans les dendrites pourrait modifier l'intégration et la plasticité synaptique.



## ABSTRACT

Kv2 channels, which underlie  $\approx 80\%$  of delayed-rectifier  $K^+$  current, are required for efficient cell repolarization during high-frequency action potential firing. However, it has also been suggested that these channels have a role related to their ability to create clusters on the surface of neurons, at the soma, proximal dendrites and the initial segment of the axon. Indeed, some clusters co-localize with areas of contact between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum, and it has been proposed that Kv2.1 could organize these contacts and modulate calcium signalling independently of its role as a potassium channel. Furthermore, one study showed that Kv2.1 channels present in clusters have a very reduced conductance. The state of phosphorylation, regulated by neuronal activity, has a considerable impact on their voltage dependence and ability to form clusters.

Mutations in *Kcnc1*, the gene coding for Kv2.1, have recently been associated with epileptic encephalopathies, combining seizures with motor and cognitive disorders. Interestingly, several functionally uncharacterized mutations target the C-ter end of the Kv2.1 subunit, resulting in truncated proteins lacking the “Proximal Restriction and Clustering” (PRC) domain responsible for cluster formation. Patients with these mutations do not always have epileptic disorders, but present cognitive delays and autistic disorders.

During my thesis, I set out to characterize two mutations impacting the PRC domain, with the hypothesis that their inability to form clusters would have a functional consequence on neuronal excitability. First, I described changes in the distribution of Kv2.1 channels Y533\* and R583\*, using confocal microscopy and PALM/STORM super-resolution experiments, by transfecting them into cultured pyramidal neurons. Channels carrying mutated subunits are redistributed towards distal dendrites, forming small clusters. Analysis of their lateral diffusion by tracking single particles led me to the hypothesis that mutated subunits form mixed channels with endogenous non-mutated channels, which would explain their residual cluster formation. From a functional point of view, with patch-clamp experiments I have shown that neurons expressing mutated subunits have reduced excitability compared with those expressing wild-type channels. The literature suggests a role of Kv2 in the active properties and calcium transients of dendrites. I therefore adapted a biophysical model of the pyramidal hippocampal neuron (CA1) to analyse this possibility, taking into account differences in the distribution of wild-type and mutated channels, as well as variations in voltage dependence. The model predicts a significant effect in the case of prolonged synaptic activation. My calcium imaging experiments confirm this prediction, as stimulation

of neurons with Kv2 blockade results in an increase in dendritic calcium transients, revealing a likely action on action potential back-propagation.

In conclusion, my results strongly suggest that the regulation of Kv2.1 cluster formation is involved in the control of neuronal excitability, and that altering their conductance in dendrites could modify synaptic integration and plasticity.



## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury qui ont accepté de prendre le temps de porter un regard critique sur mon travail : Anne Roumier, Sabir Jacquir, Eric Hosy, Lydia Danglot et Christian Specht. Vos retours et conseils me seront sans aucun doute d'une grande aide à la croissance de mon esprit scientifique. Merci également aux membres de mon comité de thèse qui m'ont accompagné au cours de ce travail : Corentin Le Magueresse, Stéphane Charpier et encore une fois Christian. Vous avez su me m'encourager avec bienveillance pour faire avancer ce projet dans la bonne direction.

Marianne. Il y a presque quatre ans maintenant tu recevais le mail d'une timide étudiante de M1, perdue de l'autre côté de la planète qui voulait simplement jouer avec des microscopes. Merci de m'avoir répondu. Merci de m'avoir permis de faire mon stage de M2 avec toi et de m'avoir fait confiance pour continuer en thèse. Tu es quelqu'un d'occupé et pourtant tu as fait le choix de t'engager avec moi pour trois ans de travail acharné. Ces trois années ont été intenses (je pense presque autant pour toi que pour moi) et je sais qu'il y a eu des hauts et des bas, en passant par les problèmes de plasmides aux premiers enregistrements de la GCaMP6f, ou par les longues heures à vouloir faire fonctionner NEURON et Python à l'acceptation toute récente de mon premier papier. On forme une paire aux manières de travailler les plus diamétralement opposées (on n'abordera pas ma préférence pour les heures nocturnes ou le rangement des feuilles Excel...) mais nous voilà à l'aboutissement de ce long voyage. Notre mini-équipe « Kv2.1 » s'arrête bientôt mais je garde avec moi tes conseils, ta gentillesse, ta patience et je l'espère ne serait-ce qu'un peu de ton esprit critique. Je sais aussi que je pars avec un diplôme en Mariannais (dont quelques mots d'espagnol) et l'habitude immuable de nos réunions à 14h !

Sabine, Jean-Christophe, merci à vous deux pour tous vos conseils. Je pense que tout le monde dans l'équipe est d'accord, vous formez un duo épique quand il s'agit de préparer des présentations ! Sabine, merci de m'avoir écoutée et d'avoir répondu à toutes les questions bébêtes que j'ai pu te poser. Jean-Christophe, merci pour ton expertise, et tous les petits coucous le soir quand j'étais la dernière dans le labo. J'ai eu la chance d'assister à deux événements convoités, le barbecue chez Sabine et le déjeuner chez Jean-Christophe, merci pour ces moments de relaxation et de partage que vous nous avez offerts.

Un de mes plus grands merci va à l'équipe et surtout à vous Marion et Zaha. Vous avez été (et vous l'êtes encore) une source de soutien sans faille et pour ça je ne peux que vous en être reconnaissante. Marion, je pense qu'on ne te le dit pas assez souvent mais tu es une personne incroyable. Que ce soit au labo ou en dehors je sais que je peux compter sur ton aide. Entre les matchs de rugby ou de hand, les séries et docu Netflix, les pauses thé (noir s'il te plait, le thé vert c'est juste de la pelouse dans un sachet), et bientôt un concert et les JOs (en vrai cette fois), honnêtement je ne sais pas trop quoi te dire à part merci merci merci ! Et toi Zaha, on sait toutes les deux qu'avoir quelqu'un dans la même galère ça fait du bien x) T'inquiètes pas j'ai gardé toutes mes jolies images pour ta future galerie d'art. On a commencé la thèse en même temps mais je m'en vais avant toi... tu vas avoir un.e autre partenaire de bureau qui ne sera jamais aussi bien que moi hehe. Tu es maintenant *the reference* en tant que doctorante sénior, bon courage ! Merci beaucoup d'avoir été là pendant ces trois ans et même avant.

Jeremy, j'avoue que j'ai peur de te laisser à la charge des autres mais tu vas devoir faire les courses tout seul comme un grand maintenant ! Merci de m'avoir formé au patch et surtout de pas avoir lâché l'affaire, merci pour ta bonne humeur, ta musique et ton énergie. Erwan, merci pour ta bienveillance, ton écoute, tes madeleines et désolée de t'avoir piqué autant de gâteaux. Solen, je te passe officiellement le flambeau de la culture de cortex ! Carla tu as sauvé nombre de mes manips avec tes calculs ^^ Bon courage à toutes les deux, vous verrez une fois que c'est fini c'est cool !

Je n'oublie les stagiaires qui, l'espace de quelques semaines, ont augmenté l'effectif de la mini-équipe « Kv2.1 » de façon considérable. Merci à vous Sinem et Doroteja. Merci à toi Melvin qui a pu te débrouiller avec mes deux ou trois explications bancales de patch. Et merci à toi Cécile d'avoir supporté mon encadrement un peu excessif, je t'en ai donné du boulot et tu as relevé le défi avec brio !

Et puis ceux qui ont déjà passé le cap. Merci Florian pour beaucoup de choses : ton aide au patch, en bioch, au nettoyage des incubs et pour la magnifique danse des champis (et aussi la recommandation de Skyrim, enfin je ne sais pas si je te remercie pour ces longues heures devant mon ordi au lieu de bosser). Merci à toi Etienne, d'avoir pris le temps de m'assurer qu'au final ça va le faire et d'avoir éteint toutes les lumières et les écrans (j'ai pris cette habitude grâce à toi). Claire, ma poule, merci d'avoir été le petit soleil de mes journées. Marie et Sana, même si je ne vous ai pas connu pendant vos thèses mais après, merci d'avoir été un exemple que oui au final on y arrive.

Merci aussi aux collègues de l'IFM ! J'ai reçu de l'aide de chacun d'entre vous et vous tous d'une bienveillance sans pareille. Merci à Tiago qui m'a formé pendant de nombreuses demi-journées à la culture des cellules HEK, Théano pour m'avoir fait confiance dans la manipulation de tellement de microscopes, Mythili pour ton sourire et ton incroyable gentillesse, Facundo pour avoir fait de moi une super chairperson, Catherine et Stéphane pour vos joyeux compliments sur mes accessoires capillaires, Julien pour nous avoir permis de sortir une superbe vidéo de l'Institut et Fiona parce que même si tu es très demandée tu as toujours été à l'écoute ! Je ne peux pas citer tout le monde j'ai une pensée pour chacun d'entre vous :)

Je voudrais aussi remercier les bibliothécaires de la Sorbonne. Merci de m'avoir fait confiance en me proposant un poste avec vous. J'espère ne pas avoir trop dégouté les étudiants à la recherche bibliographique... donc merci à eux aussi de m'avoir écouté pendant des heures.

And then for the collaborators I had the chance to work with! Xiaojie, for months and months you made neuronal cultures for me to use for my experiments at the ENS, thank you so much for your help. With Stéphanie and Fumihito, all my calcium imaging experiments were made possible thanks to you all. Honestly you put so much work in this and when the cultures went haywire, I know you were feeling guilty while it was never your fault. So, thank you again, your kindness, patience and hardwork are just amazing!

My ENCODS people, I love you so much. We went through hard times together, planning an international conference with almost no experience is such a challenge that we manage to achieve with our exceptional team. Ségolène, Mary, Sarah, Cindy and David, thank you for making me step out of my supra-introvert comfort zone (also Cindy, thank you so much for making me watch Castlevania)!

Xavier je ne t'oublie pas ! Tu es celui qui m'a mis le pied à l'étrier pour la super-résolution et on a même présenté un atelier ensemble à MIFOBIO. Je ne peux que te remercier de m'avoir formé et donné cette opportunité.

And then Yoshii-sensei, thank you for giving me the chance to learn science with you and Manabu-san. My internship in Okayama was my very first lab experience and I couldn't have asked for a better environment and supervision. My plan to continue in research was motivated by the encouragement you gave me and I am thankful to both of you.

Et à mes ami.es qui m'ont soutenu en questionnant parfois mes choix de vie merci quand même pour tout x) Violette, Audrey et Chloé, heureusement que vous me faites sortir de chez moi de temps en temps. Violette, allons prendre le thé dans tous les tea shops que l'on trouve et Audrey j'ai pleins de restaurants coréens à te faire découvrir (promis sans trop de légumes). Chloé après toutes ces années on est y arrivé, on sait toutes les deux que ça a été difficile et qu'on a souffert mais nous y voilà, je suis fière de toi cocotte.

Professeur A. merci à toi aussi, j'ai un peu déversé mes frustrations pendant nos conversations donc merci de m'avoir prêté ton oreille (aussi merci de résoudre mes énigmes à Professeur Layton).

Laëtitia, malgré mon emploi du temps chargé, tu n'as jamais abandonné l'idée de me faire sortir de mon appart' pour aller boire un verre, partir en vacances et aller faire du « sport ». Merci de pas me laisser tomber alors que je réponds à tes messages des jours après.

Et aux camarades des cours du jeudi soir, merci pour vos encouragements ! また一緒に日本語を勉強しましょう！

Chloé, ma petite Nono, je crois je n'ai jamais accroché avec quelqu'un aussi vite et aussi fort. Je suis tellement heureuse de t'avoir rencontré, merci d'avoir fait ton stage dans l'équipe. Merci pour tous ces moments que l'on a partagé à aller manger partout, faire des expos ou juste se voir un petit moment quand on a le temps. Je sais qu'on ne se parle pas aussi souvent que l'on voudrait mais je sais aussi que tu seras toujours là pour m'écouter, donc merci pour ton amitié.

Mes derniers remerciements et les plus importants vont à ma famille. Que ce soit en France, à l'Ile Maurice ou peu importe où que vous soyez dans le monde, vous m'avez accordé votre support inconditionnel et votre amour infini.

Mama, Papa et Nanou, pendant plus de trois ans, vous m'avez vu travailler fort et que cela a été source d'inquiétude. Ce travail a été pénible, long et laborieux mais vous m'avez toujours poussé à aller au bout des choses tout en me rassurant que j'en étais capable. Après tout ce temps, je sais qu'entendre encore et encore parler de Diinamic et du Kv2.1 c'est un peu rébarbatif mais c'est fini ! Merci pour mon petit nid, pour les petits plats et pour les messages pour savoir si tout va bien.

Je vous aime ♥





# TABLE DES MATIERES

Résumé .....	1
Abstract.....	3
Remerciements.....	6
Liste des abréviations .....	16
Glossaire.....	18
Table des figures .....	20
Introduction .....	22
I. Kv2.1, canal potassique à rectification retardée.....	24
I. A. Le gradient électrochimique des ions K <sup>+</sup> .....	24
I. B. Les canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) .....	25
I. B. 1. Présentation et phylogénie .....	25
I. B. 2. Structure des Kv .....	26
I. B. 2. a. La sélectivité aux ions K <sup>+</sup> .....	28
I. B. 2. b. Le domaine sensible au voltage .....	29
I. B. 2. c. Inactivation des canaux Kv .....	30
I. B. 2. d. Tétramérisation, modifications post-traductionnelles et sous-unités $\beta$ .....	31
I. B. 2. e. L'action des drogues .....	33
I. B. 3. Fonction des Kv.....	34
I. B. 3. a. Fonction différentielle dépendant du tissu.....	34
I. B. 3. b. Au sein des neurones.....	35
I. C. La spécificité du Kv2.1 .....	37
I. C. 1. Expression du Kv2.1.....	38
I. C. 1. Durant le développement .....	38
I. C. 2. Dans les différents tissus .....	38
I. C. 2. Structure et localisation cellulaire .....	41
I. C. 3. Fonctions du Kv2.1 dans la cellule .....	47
I. C. 3. a. Rôles canoniques.....	48
I. C. 3. a. 1. Régulation de l'excitabilité neuronale.....	48
I. C. 3. a. 2. Acteur de l'apoptose .....	50
I. C. 3. b. Rôles non canoniques.....	51

I. C. 3. b. 1. Points de jonction entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique.....	51
I. C. 3. b. 2. Plateforme d'exocytose.....	53
I. C. 3. b. 3. Interaction avec les microglies .....	54
II. Les mutations de <i>Kcnc1</i> dans les encéphalopathies épileptiques.....	56
II. A. Généralités sur les encéphalopathies épileptiques.....	56
II. A. 1. Définition(s) .....	56
II. A. 2. Diagnostic, étiologie et symptômes.....	59
II. A. 2. a. L'importance de la génétique.....	59
II. A. 2. c. Manifestations cliniques récurrentes des principales EE décrites .....	61
II. A. 3. Traitements envisagés.....	61
II. B. <i>Kcnc1</i> et ses mutations.....	64
II. B. 1. Identification des mutations de <i>Kcnc1</i> .....	64
II. B. 2. Les modèles animaux.....	66
III. L'utilisation de modèle <i>in silico</i> en neurosciences .....	68
III. A. Les premiers modèles de neurones <i>in silico</i> .....	68
III. B. Un modèle biophysique basé sur les équations de Hodgkin et Huxley .....	70
III. B. 1. Hodgkin-Huxley-Eccles : le prix Nobel de Physiologie/Médecine 1963 .....	71
III. B. 2. Les équations de Hodgkin-Huxley .....	73
III. B. 2. a. Le postulat théorique .....	73
III. B. 2. b. L'importance de la cinétique des canaux .....	75
III. C. Les modèles biophysique de Hodgkin-Huxley en pratique .....	77
III. C. 1. Modéliser l'ouverture des canaux et leur cinétique .....	77
III. C. 2. Choisir son modèle.....	79
III. C. 2. Avantages et limitations.....	81
IV. Rationnel du projet .....	84
Valorisations scientifiques.....	87
Materiel et methodes.....	89
Culture neuronale .....	89
Transfection neuronale et constructions ADN.....	89
Pharmacologie.....	90

Immunocytochimie.....	90
Expression de surface - confocal.....	90
Marquage du Kv2.1 non muté - épifluorescence .....	90
Marquage du Kv2.1 après modification de l'activité - épifluorescence .....	91
Marquage de l'internalisation du Kv2.1 - épifluorescence .....	91
Colocalisation avec les récepteurs à la ryanodine - confocal.....	91
Colocalisation avec les récepteurs à la ryanodine - STORM .....	92
Acquisition des images .....	93
Epifluorescence.....	93
Confocal.....	93
Super-résolution.....	93
Analyse d'images .....	94
Immunofluorescence en champ large.....	94
Immunofluorescence en confocal.....	94
Immunofluorescence en super résolution .....	95
Biochimie.....	96
Suivi de particules uniques .....	97
Modélisation .....	98
Imagerie calcique .....	99
Libération de glutamate et GCaMP6f .....	99
CheRiff .....	100
Electrophysiologie .....	101
Analyse statistique.....	101
Resultats.....	103
Avant-propos, contexte et hypothèses.....	103
I. Article principal .....	106
Abstract.....	107
Introduction .....	108
Materials and methods .....	110
Results.....	118

Discussion.....	127
References.....	132
Figures and figure legends.....	137
II. Etude de la colocalisation entre les clusters de Kv2.1 et les RyR du RE.....	165
III. Impact de l'activité neuronale sur l'état de phosphorylation du Kv2.1 .....	171
Discussion et perspectives.....	178
I. Majeures contraintes et limitations expérimentales.....	180
I. A. Niveau d'expression et transfection.....	180
I. B. Activation dans l'imagerie calcique.....	181
II. L'utilisation d'un modèle <i>in silico</i> .....	182
III. Le Kv2.1 et l'excitabilité neuronale.....	184
IV. Hypothèses sur la causalité des encéphalopathies épileptiques.....	186
A. Par son rôle canonique de conduction des ions K <sup>+</sup> .....	186
B. Par son rôle non canonique structurel.....	187
C. Ou alors par les deux ?.....	188
Annexe .....	190
Bibliographie .....	223



## LISTE DES ABREVIATIONS

AMU	activité multi-unitaire
ATP	adénosine triphosphate
BK	courant $K^+$ dépendant du $Ca^{2+}$ et du voltage
C-ter	COOH-terminal
$Ca^{2+}$	ion calcium
Cav	canaux calcique voltage dépendants
CaMKII	protéine kinase II dépendante du $Ca^{2+}$
CSB	« Complex Spike Burst »
D	coefficient de diffusion
DEE	encéphalopathie épileptique et développementale
Diinamic	Density and Image INtensity Based Analysis Method for Identification of Clusters
DIV	« Day In Vitro »
DR	courant à rectification retardée (modélisation)
$E_{K^+}$	potentiel d'inversion des ions $K^+$
$E_{Na^+}$	potentiel d'inversion des ions $Na^+$
EE	encéphalopathie épileptique
EEG	électroencéphalogramme
Gbz	gabazine
GxTx	guangxitoxine-1 <sup>E</sup>
HH	Hodgkin-Huxley
$I_A$	courant A
$I_{Kdr}$	courant potassique de rectification retardée
$I_M$	courant M
$I_{stim}$	courant de stimulation
$I_{ions}$	courant ionique
ILAE	Ligue internationale contre l'épilepsie
$K^+$	ion potassium
KChAP	protéines associées aux canaux potassique
KChIP	protéines interagissant avec les canaux potassiques
Kir	canaux potassium à rectification entrante
KI	knock-in
KO	knock-out

Kv	canaux potassique voltage dépendants
MEA	« MicroElectrode Array »
N-ter	NH <sub>2</sub> -terminal
Na <sup>+</sup>	ion sodium
PA	potentiel d'action
<i>P<sub>c</sub></i>	coefficient de compaction
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PRC	« Proximal Restriction and Clustering »
RE	réticulum endoplasmique
R <sub>in</sub>	résistance d'entrée
RyR	récepteurs à la ryanodine
SK	courant K <sup>+</sup> lent dépendant du Ca <sup>2+</sup>
SMLM	« Single Molecule Localisation Microscopy »
SNARE	« Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor »
SNAP25	« SyNaptosomal Associated Protein of 25 kDa »
SNC	système nerveux central
TTX	tétradotoxine
VAMP	« Vesicle Associated Membrane Proteins »
V <sub>m</sub>	potentiel de membrane

# GLOSSAIRE

## Burst

Dans certains neurones, un burst correspond à un patron de décharge avec des générations de potentiel d'action rapides suivies de périodes de repos beaucoup plus longues. Le nombre de potentiel d'action, la période d'activité ou le temps de repos sont différents en fonctions du type cellulaire étudié. Les bursts sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques comme l'encodage neuronal, la plasticité ou la mémorisation mais également dans des pathologies tel que l'épilepsie.

## Cluster

Le mot cluster vient de l'anglais et est défini comme un groupe/agrégat/ensemble. En microscopie ce mot est utilisé pour définir l'organisation des protéines en groupe ayant une forte densité par rapport à l'extérieur du cluster. Généralement, les clusters sont identifiés par des paramètres de taille et de densité par des algorithmes de clustering qui peuvent différer en fonction du type de microscopie. En biologie, la formation de clusters sous-tend une fonctionnalité particulière ou une recherche d'optimisation de signalisation.

## Depolarization block

Un depolarization block correspond à un état électrophysiologique particulier des neurones où malgré une stimulation dépolarisante maintenue sur un temps long, la génération de potentiel d'action n'est plus possible. Cet état silencieux des neurones est marqué par un potentiel de membrane constant près du seuil de décharge. Ce haut potentiel de membrane ne permet pas aux canaux sodique voltage dépendants inactivés suite à la décharge de potentiel d'action de se réactiver (car nécessite une hyperpolarisation), le neurone ne peut donc plus faire de potentiels d'action.

## Knock-out ou knock-in

En génétique, les termes knock-out ou knock-in sont utilisés pour désigner l'inactivation totale ou partielle d'un gène. Ces techniques permettent d'étudier la fonction d'un gène spécifique *in vivo* et de comprendre le rôle du gène dans le développement normal et la physiologie ainsi que dans la pathologie. Les knock-out génétiques sont largement utilisés dans de nombreux organismes différents, notamment les bactéries, les levures, les drosophiles, le poisson-zèbre et les souris.



### Stack

En microscopie, des acquisitions en tranches optiques successives dans le plan z constituent un stack donc une pile d'images, qui peut être traitée pour créer une image 3D. Le stack peut également être fusionné en une image 2D, de façon générale en ne gardant que l'intensité maximale de chaque pixel à travers la pile (projection maximale).

### $V_{1/2}$

Pour comparer les cinétiques et la dépendance au voltage de différents canaux, une des mesures les plus courantes est le  $V_{1/2}$  qui correspond au voltage auquel la conductance d'un canal est égale à 50% de sa conductance maximale. Cette mesure s'obtient sur les courbes de conductances par rapport au voltage de la membrane du neurone.

Dans ce travail, le  $V_{1/2}$  servira de raccourci pour signifier la dépendance au voltage.

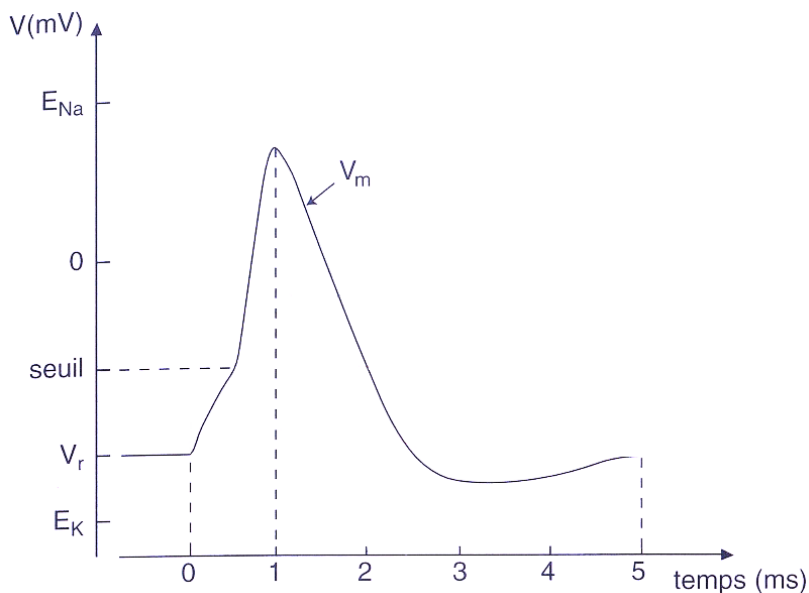
# TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Les différentes phases d'un potentiel d'action. ....	22
<b>Figure 2.</b> Conservation de séquence des Kv dans différentes espèces. ....	26
<b>Figure 3.</b> Structure générale des canaux Kv de la branche « Shaker ». ....	27
<b>Figure 4.</b> Schéma des courants de différents Kv et implication lors d'un PA. ....	35
<b>Figure 5.</b> Expression du <i>Kcnb1</i> dans le cerveau murin. ....	41
<b>Figure 6.</b> Localisation et schéma des sous-unités $\alpha$ Kv2.1. ....	43
<b>Figure 7.</b> La phosphorylation du Kv2.1 induit un changement de sa dépendance au voltage et est régulée par la signalisation calcique. ....	45
<b>Figure 8.</b> La déphosphorylation du Kv2.1 empêche la décharge des neurones. ....	49
<b>Figure 9.</b> Les points de jonction entre la membrane plasmique et le RE. ....	53
<b>Figure 10.</b> Implications théoriques des EE ou DEE. ....	58
<b>Figure 11.</b> L'utilisation des modèles animaux pour les DEE. ....	62
<b>Figure 12.</b> Représentation schématique d'une sous-unité Kv2.1 et quelques mutations identifiées. ....	64
<b>Figure 13.</b> Schéma des premiers modèles neuronaux. ....	68
<b>Figure 14.</b> Enregistrement intracellulaire d'un PA dans l'axone de calmar géant. ....	72
<b>Figure 15.</b> Représentation d'un modèle biophysique basé sur les équations HH. ....	73
<b>Figure 16.</b> Schéma des portes des canaux voltages dépendants. ....	75
<b>Figure 17.</b> Schémas exemples de morphologie de modèles biophysiques. ....	80
<b>Figure 18.</b> Schémas des constructions utilisées. ....	103
<b>Figure 19.</b> Etude de la colocalisation des clusters de Kv2.1 avec les clusters de RyR en imagerie confocale. ....	166
<b>Figure 20.</b> Signification statistique de la colocalisation entre les clusters de Kv2.1 et RyR en imagerie confocale. ....	167
<b>Figure 21.</b> Etude de la colocalisation des clusters de Kv2.1 avec les clusters de RyR en microscopie de super-résolution. ....	169
<b>Figure 22.</b> Changement de clustering du Kv2.1 lors de la modification de l'activité neuronale. ....	172
<b>Figure 23.</b> Changement de phosphorylation des sous-unités Kv2.1 suite à une modification de l'activité. ....	174
<b>Figure 24.</b> Etude de l'internalisation des sous-unités Kv2.1 suite aux modifications de l'activité neuronale. ....	175



# INTRODUCTION

Le neurone est l'unité fonctionnelle du système nerveux dont la fonction principale est la transmission d'information. Qualifié d'excitable, le neurone est capable de communiquer via la génération de courants. Ces courants sont portés par les ions qui s'accumulent de façon inégale de chaque côté de la bicouche lipidique composant la membrane plasmique. Cette répartition non homogène de charges crée le potentiel de membrane ( $V_m$ ) qui varie avec les mouvements de ions au travers de la membrane par le biais de diverses molécules telles que les pompes, les transporteurs ou les canaux ioniques. Un flux ionique en réponse à un stimuli va alors être traduit en hyperpolarisation ou dépolarisation du  $V_m$ . La direction de ce flux ionique est déterminée par le potentiel d'inversion des ions  $E_{Na^+}$  et  $E_{K^+}$ , respectivement pour les ions  $Na^+$  et  $K^+$ , calculés sur la base des concentrations intra- et extracellulaires, et sur le  $V_m$  de la membrane des neurones (Raghavan et al., 2019).



**Figure 1.** Les différentes phases d'un potentiel d'action.

La dépolarisation de la membrane doit être suffisante pour dépasser la valeur minimale du seuil de déclenchement du PA. Lors de la phase ascendante, les canaux sodiques s'ouvrent laissant entrer les ions  $Na^+$ , dépolarisant davantage la membrane plasmique du neurone. La phase descendante du PA se produit lorsque les canaux sodiques s'inactivent et que les canaux potassiques commencent à s'ouvrir. Les ions  $K^+$  sortent, participant à la repolarisation de la membrane. L'ouverture prolongée des canaux potassiques crée une hyperpolarisation de la membrane qui se réduit à leur fermeture, avant que la membrane ne retourne à son potentiel de repos. Adapté de (Tritsch et al., 1999).

Un potentiel d'action (PA) (Figure 1) correspond à une inversion transitoire de la polarité du potentiel de membrane et requiert des canaux ioniques voltage-dépendants. Ces canaux sont régulés par les variations du  $V_m$  qui régissent leur ouverture et le passage des ions. Leur sélectivité au passage à certains ions permet de les différencier en plusieurs familles dont les principales sont perméables aux ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou au ions potassium ( $\text{K}^+$ ) (Hille, 1985). L'implication séquentielle de ces canaux participe à chaque phase du PA (Baranauskas, 2007; Tritsch et al., 1999).

## I. Kv2.1, canal potassique à rectification retardée

### I. A. Le gradient électrochimique des ions $K^+$

L'homéostasie de la concentration des ions  $K^+$  a un rôle primordial dans l'excitabilité des neurones. La concentration des ions  $K^+$  dans les neurones des mammifères est plus élevée dans le compartiment intracellulaire (140 mM) que dans le compartiment extracellulaire (5 mM) (Clausen & Poulsen, 2013; Erecińska & Silver, 1994; J. Liu et al., 2020; Prince et al., 1973; Proskurina & Zaitsev, 2022). Les ions étant des particules chargées, ce gradient de concentration engendre également un champ électrique transmembranaire. Or, lors de la décharge de PA, la repolarisation rapide de la phase descendante est majoritairement induite par une sortie massive des ions  $K^+$  dans le milieu extracellulaire (Tritsch et al., 1999).

Un changement dans ce gradient de concentration est observé dans de nombreuses pathologies. L'utilisation de modèle mathématique *in silico* (Cressman et al., 2009) ou l'enregistrement de la concentration extracellulaire en ions  $K^+$  *ex vivo* (Proskurina & Zaitsev, 2022) montre une augmentation allant jusqu'à 8 à 10 mM lors d'activité épileptiforme. Également, le dérèglement de la recapture des ions  $K^+$  extracellulaires par les cellules gliales a été mis en évidence dans les traumatismes crâniens ou les ischémies, menant à la modification de l'excitabilité des neurones ou à la mort cellulaire (D'Ambrosio et al., 1999; Leis et al., 2005). Un contrôle efficient et rapide est donc nécessaire pour maintenir l'homéostasie des ions  $K^+$ .

L'intervenant majoritaire permettant l'entrée des ions  $K^+$  dans les neurones est la pompe Na/K-ATPase, transport actif primaire électrogénique qui fait sortir trois ions  $Na^+$  et fait entrer deux ions  $K^+$ . Comme cette pompe exerce une action qui va à l'encontre des gradients de concentration, l'énergie nécessaire à cet échange est apportée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Son action est fondamentale et a été estimée nécessitant 50% de l'énergie consommée par le cerveau (Erecińska & Silver, 1994; Morth et al., 2011; Pivovarov et al., 2019; N. Xu, 2013).

Comme mentionné précédemment, les cellules gliales, notamment les astrocytes et oligodendrocytes, ont un rôle conséquent dans la capture des ions  $K^+$  présents dans le milieu extracellulaire, au niveau des synapses mais également des nœuds de Ranvier (Beckner, 2020; Ransom et al., 2000). Grâce à la pompe Na/K-ATPase mais également au co-transporteur KCl et aux canaux Kir, présents sur leur membrane, les cellules gliales ont un rôle « d'éponge » sur les ions  $K^+$  permettant au milieu extracellulaire localisé près de la membrane des neurones de garder une concentration suffisamment basse pour que la direction du flux ionique entraîne un

courant hyperpolarisant (D'Ambrosio et al., 2002; Grafe & Ballanyi, 1987; Laming, 2000; Walz, 2003).

En ce qui concerne la sortie des ions  $K^+$  vers le milieu extracellulaire, les acteurs sont nombreux : les canaux de fuite responsables du passage passif des ions à travers la membrane (Cohen et al., 2009; X.-Y. Li & Toyoda, 2015; Natale et al., 2021) ; les récepteurs aux neurotransmetteurs notamment les récepteurs au glutamate qui ouverts laissent passer les cations (Pivovarov et al., 2019; Traynelis et al., 2010) et les canaux potassiques calcium- ou voltage-dépendants (Gutman et al., 2005; McManus, 1991; Sah & Davies, 2000).

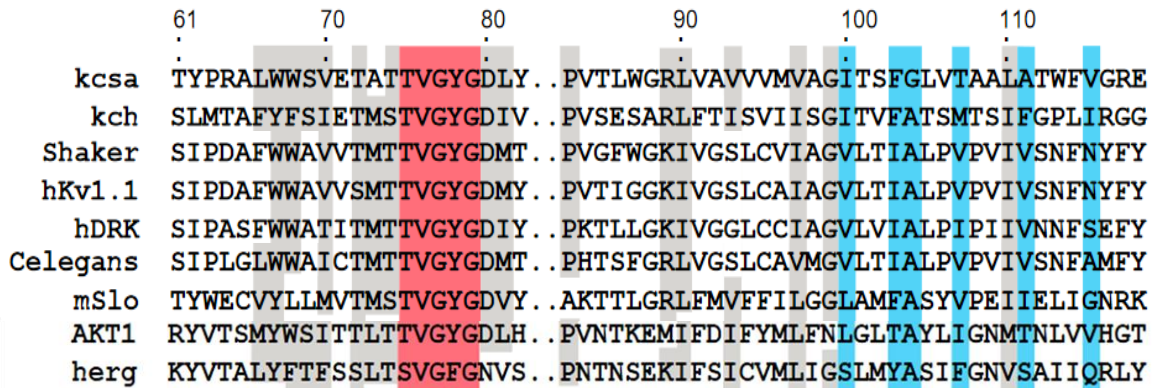
## *I. B. Les canaux potassiques voltage-dépendants (Kv)*

### **I. B. 1. Présentation et phylogénie**

Constituant la plus large famille de canaux voltage-dépendants, la famille des canaux potassique voltage-dépendants (Kv) est codée par quarante gènes pour douze sous-familles différentes chez l'Homme (Gutman et al., 2005; Moran et al., 2015). Les Kv s'encrent profondément dans le Vivant car présents dans la quasi-totalité des organismes (Kuo et al., 2005). De façon intéressante, leur séquence est très conservée à travers les espèces si bien chez les plantes (T. Sharma et al., 2013) que chez les bactéries (Doyle et al., 1998; MacKinnon et al., 1998) ou les organismes pluricellulaires (Duran-Urriago & Marzen, 2023; Moran et al., 2015).

L'étude génétique des Kv débute en 1969 chez la drosophile, *Drosophila melanogaster*, où est identifié le gène *Shaker* codant pour un canal potassique dont la mutation entraîne un tremblement des pattes sous anesthésie (Kaplan & Trout, 1969; Papazian et al., 1987). Seront ensuite identifiés les gènes *Shab*, *Shaw* et *Shal*, les quatre étant regroupés dans la branche « Shaker », codant pour des canaux potassiques dont l'équivalent correspond respectivement aux sous-familles des Kv1, 2, 3 et 4 chez l'Homme. De la même façon sera découverte la branche « Eag », comprenant les gènes *eag*, *erg* et *elk*, correspondant aux Kv10, 11 et 12 (Frolov et al., 2012). Le dernier canal potassique découvert chez la drosophile en 1986, par le biais du phénotype mutant « slowpoke », appartient à une classe de canaux potassique différente remarquable par son activité dépendante du voltage mais également du calcium (Elkins et al., 1986; Frolov et al., 2012).

La structure des Kv se dévoile par des études de cristallographie d'abord menées sur le canal KcsA de la bactérie *Streptomyces lividans*, tétramère dont chaque sous-unité est composée de deux hélices transmembranaires (Doyle et al., 1998). Due à la conservation de séquence très forte observée chez les Kv, le KcsA a permis d'émettre des hypothèses sur la structure du pore, du filtre sélectif et du blocage des canaux Kv des eucaryotes (Figure 2) (Z. Lu et al., 2001; Mackinnon et al., 1998; Sansom et al., 2002).



**Figure 2.** Conservation de séquence des Kv dans différentes espèces.

La séquence génétique des Kv est très conservée d'une espèce à l'autre. Dans l'ordre sont ici représentés la numération et la séquence du canal KcsA chez la *Streptomyces lividans* ; kch, *Escherichia coli* ; Shaker, *Drosophila melanogaster* ; hKv1.1, *Homo sapiens* ; hDRK, *Homo sapiens* ; Celegans, *Caenorhabditis elegans* ; mSlo, *Mus musculus* ; Akt1, *Arabidopsis thaliana* ; herg, *Ratticus norvegicus*. En rouge est marqué la séquence du filtre de sélectivité et en bleu les résidus critiques à la fonction du pore. Adapté de (Doyle et al., 1998).

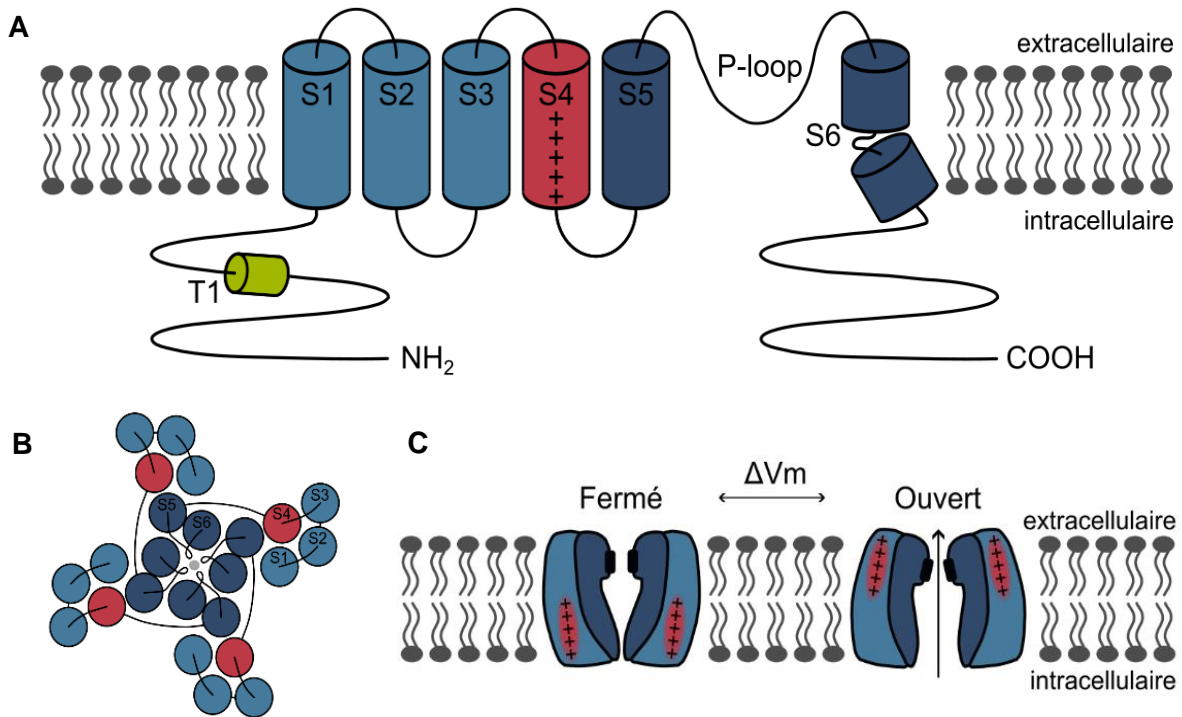
Il faudra attendre le développement de la microscopie électronique pour que la structure fine et notamment les différentes conformations des Kv ne soient élucidées (Nimigeon, 2022). Bien que leur structure reste hautement similaire, chacun des Kv diffère par sa localisation tissulaire : cœur, muscle, cerveau, mais également par sa localisation subcellulaire. Leur pluralité et distribution variée sous-tendent à un éventail large de fonction dans les cellules (Gutman et al., 2005).

### I. B. 2. Structure des Kv

Composés de quatre sous-unités  $\alpha$ , les canaux Kv sont des tétramères exprimés à la membrane plasmique de nombreux types cellulaires. Chaque sous-unité comprend six domaines



transmembranaires, nommés de S1 à S6, et une région semi-transmembranaire du côté extracellulaire appelée « P-loop ». Les queues NH<sub>2</sub>-terminale (N-ter) et COOH-terminale (C-ter) sont placées du côté intracellulaire de la membrane (Figure 3A). La longueur de ces queues diffère d'un Kv à l'autre, leur poids moléculaire est donc très variable (Gutman et al., 2005). Certains de ces canaux peuvent s'associer en homo- ou hétérotétramères, avec différentes sous-unités  $\alpha$  ou des sous-unités  $\beta$ , rendant la variabilité de ses canaux encore plus importante (Pongs, 1997).



**Figure 3.** Structure générale des canaux Kv de la branche « Shaker ».

**(A)** Les sous-unités majoritaires  $\alpha$  sont arrangées en six segments transmembranaires de S1 à S6 chacun reliés par des boucles intra- ou extracellulaires. La P-loop, boucle reliant le S5 au S6 présente la particularité de s'insérer à mi-membrane. Le segment S6 possède une séquence charnière qui permet un positionnement différent de l'hélice du côté intracellulaire. Les queues N-ter et C-ter sont positionnées du côté intracellulaire. Le domaine T1, nécessaire à la tétramérisation, se trouve sur la queue N-ter. Le segment S6, le P-loop et le S5 constituent le pore du canal, le segment S4 est le domaine sensible au voltage et les segments S3 à S1 assurent la structure et la stabilité. Adapté de (Börjesson & Elinder, 2008).

**(B)** Les canaux potassiques voltages dépendants sont composés de quatre sous-unités  $\alpha$  qui s'assemblent en tétramère pour former un canal complet, avec le pore au centre, flanqués des segments S5 et S6. Adapté de (Bocksteins & Snyders, 2012).

**(C)** C'est le mouvement des segments S4, qui permet le changement de conformation qui induit l'ouverture du canal et le passage des ions K<sup>+</sup> vers le milieu extracellulaire. Adapté de (Börjesson & Elinder, 2008).

### *1. B. 2. a. La sélectivité aux ions K<sup>+</sup>*

Dans les canaux Kv, les hélices transmembranaires s'agencent de sorte à ce que les segments S5 et S6, reliés par la P-loop, forment le pore du canal (Figure 3B). Pour déchiffrer les mécanismes entraînant la vitesse du passage des ions K<sup>+</sup>, la structure de ce pore a été vastement étudiée notamment en se basant sur les cristallographies existantes du canal KcsA (Doyle et al., 1998).

Une des principales caractéristiques de ce pore est la cavité centrale, une dilatation d'environ 10 Å, située à mi-chemin au travers de la membrane. Celle-ci sert à maintenir l'hydratation des ions par huit molécules d'eau par ion K<sup>+</sup>. Cet agencement du canal permet de garder les ions dans un environnement électriquement stable (Yellen, 2002; Zhou et al., 2001). Il a également été montré que bien que la cavité centrale puisse accueillir plus de molécules d'eau, seules huit sont présentes car ordonnées de manière à ce qu'elles ne soient ni proches du milieu aqueux intracellulaire ni du milieu extracellulaire. Il n'y a donc pas de liaison hydrogène possible entre les molécules d'eau de la cavité centrale et celles situées à l'extérieur, rendant les interactions de stabilisation des ions K<sup>+</sup> plus disponibles (Roux & MacKinnon, 1999; Zhou et al., 2001).

De plus, la structure du KcsA a révélé le repli d'hélices  $\alpha$  dont l'extrémité pointe vers l'intérieur du pore. Ainsi orientées ces hélices, et notamment les atomes d'oxygène des résidus, constituent des dipôles dont les extrémités négatives sont pointées vers le vestibule intracellulaire et sur lesquelles repose la sélectivité cationique du canal. Cette région d'une taille d'environ 3 Å, se situe juste en amont du filtre de sélectivité composé d'une séquence TVGYG très conservée, dans la région du P-loop (Figure 2) (D. M. Kim & Nimigean, 2016; Pongs, 1997; Sansom et al., 2002; Yellen, 2002). La taille restreinte de ce filtre de sélectivité des Kv, ne permet pas l'accommodation des ions cationiques de grande taille tel que les ions césium, mais pourrait cependant accueillir des ions Na<sup>+</sup> dont le diamètre est moindre de celui des ions K<sup>+</sup> (1.90 Å pour un ion Na<sup>+</sup> contre 2.66 Å pour un ion K<sup>+</sup>). Cependant, la région du P-loop s'étend jusqu'au côté extracellulaire formant un passage étroit, hydrophobe et rigide bordé de « cages » d'oxygènes, composées de plusieurs groupes de quatre atomes d'oxygène. Ces atomes, portés par des groupes carboxyles, servent de remplacement aux molécules d'eau pour stabiliser les ions K<sup>+</sup> déshydratés traversant le canal après avoir quitté la cavité centrale. Les ions Na<sup>+</sup> ont donc un diamètre trop petit pour s'insérer et être stabilisés par des liaisons hydrogènes des cages d'oxygène (Bezaniilla & Armstrong, 1972; D. M. Kim & Nimigean, 2016; Noskov et al., 2004; Yellen, 2002).

La rapidité de conduction des ions  $K^+$ , au travers des Kv, repose sur le passage de plusieurs ions  $K^+$  en même temps. Le canal formé des quatre régions P-loop est capable de faire passer deux ions  $K^+$  à la file. La répulsion de charges positives entre les ions (écartés dans le canal de 7 Å), déstabilise les ions et contrebalance les liaisons hydrogènes avec les cages d'oxygène. Les interactions sont donc transitoires et permettent aux ions  $K^+$  de se déplacer plus rapidement pour traverser le pore du canal (Doyle et al., 1998; D. M. Kim & Nimigean, 2016; Yellen, 2002).

#### *I. B. 2. b. Le domaine sensible au voltage*

Le segment S4 des canaux Kv est le domaine sensible au voltage. Pour étudier la structure et la fonction de ce segment, la littérature se base sur la cristallographie et la caractérisation fonctionnelle du KvAP de l'archéobactérie *Aeropyrum Pernix*, et de l'homologie de séquence des canaux Kv (Y. Jiang et al., 2003; Ruta et al., 2003).

Dans la séquence protéique du segment S4, un résidu chargé positivement est retrouvé tous les trois résidus. Dans la grande majorité des Kv, ces résidus correspondent à cinq arginines bien que certaines d'entre elles peuvent être substituées par des lysines (Börjesson & Elinder, 2008; Yellen, 2002). Par mutagenèse dirigée, ces résidus ont été montrés comme étant ceux responsables du mouvement de charges nécessaires à l'ouverture des canaux Kv (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996). La conformation ouverte présumée des canaux Kv montre les cinq premières arginines labellisées de R0 à R4 situées proches du bord extracellulaire (D. M. Kim & Nimigean, 2016). Les charges positives du segment S4 interagissent avec des charges négatives situées sur les segments S1 à S3 rendant l'intérieur de la protéine électriquement neutre (Börjesson & Elinder, 2008).

Il a été déterminé que pour que le canal puisse s'ouvrir, il est nécessaire qu'au moins douze charges se déplacent au travers du champ électrique créé par la membrane. Dans le cas des canaux Kv, il faut donc au moins trois charges par sous-unité pour que le canal passe d'un état fermé à un état ouvert (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Long et al., 2007; Seoh et al., 1996).

Lorsque le  $V_m$  est négatif, le segment S4 est localisé dans une position proche du côté intracellulaire. Mais le passage vers des  $V_m$  plus positifs (dépendamment de la sensibilité au voltage des différents Kv), pousse le segment S4 vers l'extérieur c'est-à-dire du côté extracellulaire du canal (Figure 3C). Ce mouvement similaire à celui d'un tournevis, va déplacer le segment S4 d'environ 15 Å, de façon à ce que chaque charge positive prenne la place de la précédente

pour maintenir leur distribution générale dans le centre du canal tout en produisant une translocation de charge à travers la membrane (Börjesson & Elinder, 2008; D. M. Kim & Nimigean, 2016; Long et al., 2007).

Le mouvement du segment S4 va avoir un impact sur la région de lien entre le S4-S5 couplée au segment S6. En effet, l'entrée du vestibule intracellulaire des canaux Kv est inaccessible à cause du croisement des faisceaux des hélices  $\alpha$  des segments S6 provenant des quatre sous-unités formant le canal. Ce croisement des hélices  $\alpha$  empêche l'accès des ions à la cavité centrale (D. M. Kim & Nimigean, 2016; Yellen, 2002). Cet enchevêtrement empêchant l'accès à la cavité centrale est possible grâce à une séquence PxP ou PxG (où x représente un acide aminé hydrophobe) hautement conservé qui permet le repliement de ces hélices (Holmgren et al., 1998; Long et al., 2007). Cette région charnière est une structure clé sur laquelle la région connectant le S4-S5 va appuyer lors du mouvement en tournevis du domaine sensible au voltage (D. M. Kim & Nimigean, 2016; Long et al., 2007). Un large mouvement des segments S4 vers l'intérieur va pousser les régions de connexion S4-S5 sur les charnières des hélices  $\alpha$  des S6 entraînant la fermeture du canal et inversement (Börjesson & Elinder, 2008). De façon intéressante, ce blocage stérique a un impact important sur l'action de certains bloqueurs, dont des molécules anesthésiantes qui se lient à l'intérieur de la cavité centrale. Ces bloqueurs peuvent donc être pris au piège à l'intérieur du canal si les faisceaux des hélices  $\alpha$  se referment (Armstrong, 1971).

L'ouverture du canal se produit donc en deux temps : (1) le mouvement indépendant des quatre segments S4 suivi de (2) l'ouverture du canal par le dépliage des faisceaux des hélices  $\alpha$  des segments S6 (Börjesson & Elinder, 2008).

### *1. B. 2. c. Inactivation des canaux Kv*

Comme décrit précédemment, les canaux Kv peuvent se fermer par une action stérique des segments S6. Or, cette action prend du temps et ne correspond pas au délai imposé dans le cas de décharge neuronale par exemple. L'arrêt de l'efflux d'ions  $K^+$  passe donc par deux principaux types d'inactivation étudiés dans les canaux Shaker, dont les mécanismes sont généralisés à l'ensemble de la famille Kv.

Le premier type d'inactivation est dit de type-N. C'est une inactivation rapide, de quelques millisecondes, qui fait intervenir une région de la queue N-ter des sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$  (Yellen, 2002). Cette inactivation ne peut se produire que lorsque le canal est ouvert c'est-à-dire que les hélices  $\alpha$  des S6 sont décroisées. Certains canaux Kv ont donc une conduction qui n'est que transitoire. Puisqu'il s'agit d'une partie auto-inhibitrice de la protéine qui se replie et vient bloquer

l'entrée du canal, ce mécanisme est souvent décrit comme le mouvement d'une balle au bout d'une chaîne (Antz & Fakler, 1998; Hoshi et al., 1990). Il est important de noter que bien qu'il n'y ait que très peu d'homologie de séquence concernant la queue N-ter des canaux Kv capables de l'inactivation de type-N, des résidus chargés positivement ou hydrophobes sont toujours mis en jeu (Antz & Fakler, 1998).

L'inactivation de type-C est plus lente et consiste en une fermeture du filtre de sélectivité. Il a été proposé que la conformation fermée des Kv serait de structure similaire au KcsA lorsque la concentration en ions  $K^+$  est faible. Dans ce cas, les groupes carboxyles, au lieu de pointer vers le centre du pore, se projettent en diagonale créant un affaissement du pore. Ce type d'inactivation est capable de se déclencher même lorsque le stimulus d'ouverture est toujours actif (Yellen, 2002; Zhou et al., 2001). Il a également été montré que cette inactivation se met en place lorsque l'accumulation des ions  $K^+$  dans le compartiment extracellulaire est trop importante, dans le cas des neurones, cela pourrait être une situation d'activité de décharge prolongée (D. M. Kim & Nimigean, 2016).

Les deux types d'activation ne sont pas sans lien puisqu'il a été constaté que, lorsque le canal est capable de s'inactiver de manière rapide par le type-N, cette action aurait pour effet d'amplifier l'inactivation de type-C. Dans un premier temps, le blocage de l'entrée des ions  $K^+$  par l'auto-peptide inhibiteur, réduit l'efflux d'ion  $K^+$  permettant de réduire les interactions entre les ions et la partie extracellulaire du canal qui préviendrait l'inactivation de type-C. Dans un second temps, puisque l'entrée du canal est maintenue ouverte, l'action de l'inactivation de type-C peut être prolongée dans le temps (Baukrowitz & Yellen, 1995; Hoshi et al., 1991).

#### *1. B. 2. d. Tétramérisation, modifications post-traductionnelles et sous-unités $\beta$*

Les canaux Kv de la famille des Shaker forment des homo- ou des hétérotétramères en associant quatre sous-unités  $\alpha$  et sont aussi capables de s'associer à des sous-unités auxiliaires  $\beta$ . Cette interaction entre sous-unités est possible grâce au domaine de tétramérisation, T1, présent sur la queue N-ter des sous-unités (Figure 3) (Gutman et al., 2005; M. Li et al., 1992; Shen & Pfaffinger, 1995). Cette région sert également à l'interaction avec d'autres protéines. Très conservée, le domaine T1 est riche en résidus hydrophobes critiques pour la formation d'un canal complet mais également pour son repliement correct. La tétramérisation des canaux est cruciale pour maintenir l'intégrité structurelle, notamment lors des forces générées pendant l'ouverture et la fermeture du pore (Miller, 2000).

La variabilité induite par l'assemblage de plusieurs sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$  vient modifier les cinétiques des canaux, leurs pharmacologies et propriétés structurelles. Cette variabilité est d'autant plus critique dans le contrôle de l'excitabilité des neurones (Pongs, 1997; Scott et al., 1994; Sheng et al., 1993). Des mutations de ce domaine de tétramérisation et de l'interaction avec des sous-unités auxiliaires entraînent des cas pathologiques comme par exemple des arythmies cardiaques (McCrossan & Abbott, 2004).

Selon la branche des Kv considérée, les modifications post-traductionnelles sont variées. Parmi les modifications majoritaires, peut être citée, la glycosylation sur la boucle extracellulaire entre le segment S1 et S2. Sur ces sites, des structures glucidiques peuvent être couplées à des structures d'acide sialique chargées négativement (Börjesson & Elinder, 2008). Impliquée dans la formation d'oligomères et la stabilisation à la membrane, la glycosylation permet également l'interaction de partenaires protéiques nécessaires pour permettre aux canaux Kv de naviguer du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi. Une fois qu'un canal entre dans le Golgi, les glycanes centraux qui ont été ajoutés au canal dans le RE sont élaborés davantage (H. S. Lee et al., 2015; Nguyen & Brodsky, 2023). En prenant pour exemple le Kv1.1, un défaut de glycosylation entraîne des changements de cinétique d'activation, de dépendance au voltage mais également une inactivation de type-C plus lente (Sutachan et al., 2005; Watanabe et al., 2003). Sur ce même canal, le Kv1.1, un résidu cystéine compris dans la boucle entre le segment S2 et S3 permet la liaison à un acide palmitique. Cette palmitoylation, est impliquée dans l'interaction du Kv1.1 avec les lipides de la membrane plasmique et leur contribution au changement de conformation du au changement du  $V_m$  (Gubitosi-Klug et al., 2005). Un autre exemple serait la palmitoylation du Kv1.5 qui réduit son expression à la surface (Jindal et al., 2008). Une des modifications post-traductionnelles les plus étudiées est la phosphorylation. L'ajout ou le retrait de groupe phosphate sur la structure des canaux (sous-unité  $\alpha$  ou  $\beta$ ) passe par des cascades de signalisation intracellulaires majoritaires dans les cellules. Les facteurs de phosphorylation, kinases ou phosphatases, sont nombreux rendant ce processus très versatile. La phosphorylation a un impact différent sur les Kv mais joue toujours sur le niveau d'expression à la surface, la fonction ou la localisation des canaux (Cerdeira & Trimmer, 2010; Vacher & Trimmer, 2011).

Le domaine T1 et les modifications post-traductionnelles sont deux processus importants à l'interaction des sous-unités  $\alpha$  avec les sous-unités  $\beta$ . Ces dernières sont catégorisées en plusieurs familles : les protéines solubles cytosoliques dénommées  $Kv\beta$ , les protéines associées aux canaux potassiques (KChAP) et les protéines qui interagissent avec les canaux potassique (KChIP). Les membres de la famille  $Kv\beta$  sont des protéines solubles qui peuvent former un complexe avec les sous-unités  $\alpha$ . L'association se fait par l'intermédiaire de l'extrémité N-ter de la

sous-unité  $\alpha$  et de l'extrémité C-ter de la  $Kv\beta$ . Trois gènes codent pour les sous-unités  $Kv\beta$  chez l'homme :  $Kv\beta 1$ ,  $Kv\beta 2$  et  $Kv\beta 3$ . Certaines de ses sous-unités sont impliquées dans les cinétiques d'inactivation des canaux Kv, alors que d'autres jouent un rôle comme protéines chaperonnes, augmentant l'expression à la surface de ces canaux (Capera et al., 2019; Martens et al., 1999). Les sous-unités KChAP, sont des protéines chaperonnes qui se lient à la queue N-ter des canaux  $Kv1$  et  $Kv2$  mais aussi à la queue C-ter des  $Kv\beta$ . Leur interaction ne modifie pas les cinétiques ni la dépendance au voltage mais contribue à l'expression de surface (Abriel et al., 2000; Kuryshev et al., 2000; Wible et al., 1998). Le plus souvent couplé à la sous-famille des  $Kv4$ , les KChIP modifient l'expression à la surface ainsi que les propriétés électrophysiologiques de ces canaux (An et al., 2000; Flowerdew & Burgoyne, 2009; K. Wang, 2008).

### *I. B. 2. e. L'action des drogues*

De nombreuses drogues agissent sur les canaux Kv et peuvent être séparées en fonction de leur mode d'action (Börjesson & Elinder, 2008).

Le premier groupe pouvant être distingué des autres est celui qui exerce son action en bloquant l'ouverture extracellulaire du canal des Kv sans induire de changement de conformation. La charybdotoxine, toxine isolée du venin de scorpion en est un exemple (Miller, 1995; Moldenhauer et al., 2019).

Le deuxième groupe correspond aux drogues qui se positionnent au niveau du segment reliant le segment S3 et S4, empêchant le mouvement du domaine sensible au voltage. Les toxines composant ce groupe agissent sur de nombreux Kv et proviennent principalement du poison des tarentules (Swartz, 2007). Parmi les toxines de ce groupe peuvent être prises en exemple le TLTx1-3 inhibant le  $Kv4.2$  (Ebbinghaus et al., 2004), le VSTx1 agissant sur le  $KvAP$  (Bemporad et al., 2006) ou la guangxitoxine-1E (GxTx) agissant sur le  $Kv2.1$  (Tilley et al., 2019). La GxTx s'impose parmi les inhibiteurs de  $Kv2.1$  par sa sélectivité. En effet bien que les toxines dirigées contre le  $Kv2.1$  soient nombreuses : SGTx1 (Wee et al., 2007), HaTx1 et HaTx2 (Swartz & MacKinnon, 1995), le ScTx1 ou le HmTx1 et HmTx2 (Escoubas et al., 2002), toutes n'exercent pas une action que sur le  $Kv2.1$  mais sur la sous-famille  $Kv2$  et  $Kv4$ . Isolée de la tarentule, *Plesiophrictus guangxiensis*, la GxTx agit sur le  $Kv2.1$  en stabilisant sa conformation au repos et réduit donc sa probabilité d'ouverture. Il a été montré un ralentissement de l'activation et une accélération de la désactivation du  $Kv2.1$ . De plus, la dépendance au voltage du canal est décalée vers de potentiels plus dépolarisés. La GxTx bien que capable d'inhiber avec une affinité moindre

le Kv4 également, réduit de 80% le courant porté par le Kv2.1 (Herrington et al., 2006; P. W. Liu & Bean, 2014; Tilley et al., 2019).

Il faut cependant garder à l'esprit que les canaux Kv sont des tétramères d'assemblage de sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$  très variés rendant leur caractérisation pharmacologique ou fonctionnelle complexe (J. Johnston et al., 2010).

### I. B. 3. Fonction des Kv

Etant la plus grande famille de canaux voltage dépendants, les Kv s'expriment dans plusieurs types cellulaires avec un éventail de fonctions très diverses. Chaque Kv est donc différent par son expression tissulaire, ses interactions ou ses propriétés cinétiques (Coetzee et al., 1999).

Il est important de souligner que certaines sous-familles des Kv, sont des sous-unités  $\alpha$  qui ne forment pas d'homotétramères et fonctionnent en formant des tétramères avec les canaux Kv2. Sont compris dans cette catégorie de Kv dits silencieux, les sous-familles des Kv5, 6, 8 et 9. La non-fonctionnalité de ces derniers est due à leur rétention dans le réticulum endoplasmique (RE). La fonctionnalité est restaurée par la formation de canaux hétérotétramériques avec les canaux Kv2.1 ou Kv2.2, supprimant la rétention dans le RE (Bocksteins et al., 2009; Gutman et al., 2005).

#### *I. B. 3. a. Fonction différentielle dépendant du tissu*

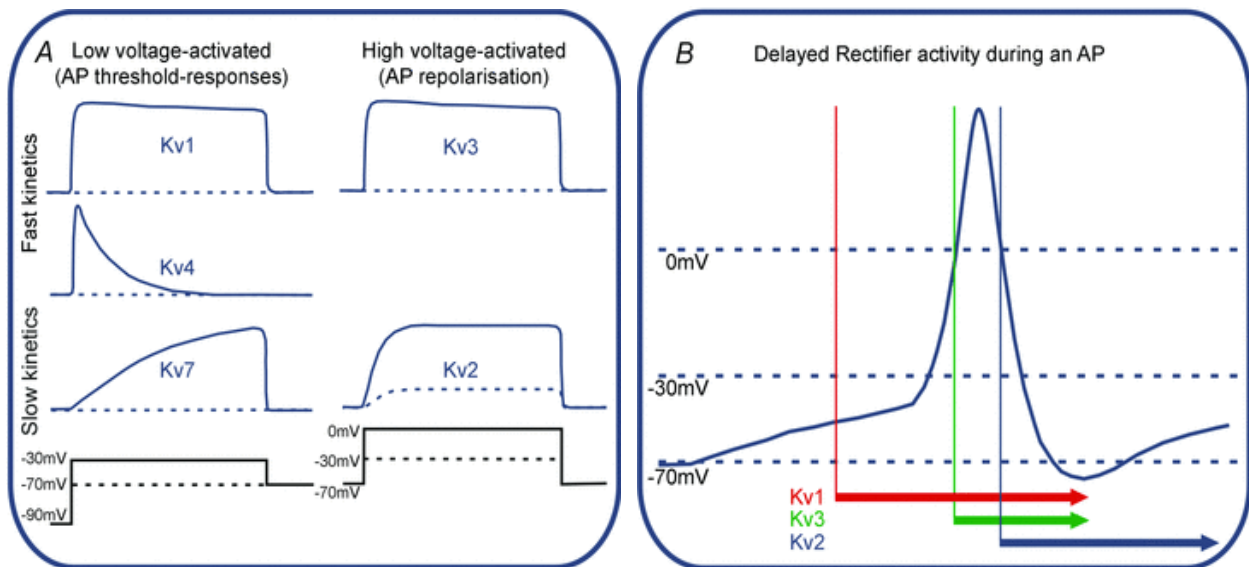
Chaque Kv a un patron d'expression différent et joue un rôle dans de nombreux tissus à travers l'organisme. En effet, leur fonction d'efflux des ions  $K^+$  est également nécessaire dans de nombreux organes. A titre d'illustration, le Kv1.3 et le Kv1.5 sont exprimés dans les cardiomyocytes et contribuent à la phase de repolarisation du PA cardiaques dans les cellules auriculaires et ventriculaires. Dans ces cellules l'hyperpolarisation du Vm notamment par l'ouverture des canaux Kv, réduit l'entrée d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) par les canaux calciques voltage dépendants (Cav), ce qui produit une vasodilatation. A l'inverse, la fermeture des canaux Kv entraîne une dépolarisation et provoque donc une vasoconstriction. Leurs dysfonctionnements peuvent donc entraîner des arythmies cardiaques (Goodwill et al., 2016; Ohanyan et al., 2015, 2017). Le même mécanisme d'action est retrouvé dans les cellules musculaires lisses, tels que les vaisseaux sanguins et le tractus gastro-intestinal, sont présents la sous-famille des Kv7 régulant le tonus et la contractilité en jouant sur le Vm de ces cellules contractiles (Ipavec et al., 2011; Jackson, 2018;



Oliveras et al., 2014; Zavaritskaya et al., 2013). Le Kv2.1 est présent dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Son action sur l'activité électrique des cellules  $\beta$ , notamment leur repolarisation pour limiter l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , lui permet de réguler leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose (MacDonald et al., 2001; MacDonald, Sewing, et al., 2002). Comme dernier exemple, les canaux Kv1.3 et 1.5 sont également distribués dans les cellules tubulaires rénales du néphron distal et contribuent à la régulation et la réabsorption du potassium. Par cette réabsorption, les canaux Kv contribuent à maintenir le  $V_m$  négatif des cellules épithéliales, leur permettant de soutenir le transport des ions  $\text{Na}^+$  couplés à d'autres composants (Carrisoza-Gaytán et al., 2014; Escobar et al., 2004).

### I. B. 3. b. Au sein des neurones

Dans le système nerveux central (SNC), alors que la fonction commune des Kv est de faire sortir les ions  $\text{K}^+$  pour repolariser la membrane des neurones, leurs cinétiques d'activation et d'inactivation leur permettent d'exercer des rôles bien distincts (Figure 4) (J. Johnston et al., 2010).



**Figure 4.** Schéma des courants de différents Kv et implication lors d'un PA.

**(A)** Représentation schématique des courants portés par différents canaux Kv en réponse à une dépolarisation du  $V_m$ . Les canaux Kv peuvent être classifiés selon leur cinétique et leur seuil d'activation. Ceux qui s'ouvrent à des  $V_m$  négatifs sont qualifiés de bas seuil tel que Kv1, Kv4 et Kv7 et ceux qui s'ouvrent à des  $V_m$  plus positifs sont dits à haut seuil comme Kv3 et Kv2. Grâce à leur cinétique, il est possible de séparer ceux qui s'activent rapidement comme Kv1, Kv4 et Kv3 de ceux qui sont plus lents comme Kv7 et Kv2. Adapté de (J. Johnston et al., 2010).

**(B)** Durant le PA, les différentes cinétiques des Kv leur permettent d'intervenir à des périodes bien distinctes. De façon générale, Kv1 s'ouvre à bas seuil donc dès les faibles dépolarisations du  $V_m$ , alors que Kv3 a besoin d'une dépolarisation plus forte pour s'ouvrir. Kv2 quant à lui est tardif dans son ouverture en raison de sa cinétique lente mais son activité s'étend néanmoins sur des temps plus longs. Adapté de (J. Johnston et al., 2010).

Nombreuses ont été les études sur les cinétiques des canaux Kv, chacune relevant des paramètres et des conditions d'expérimentation différentes. Un groupe de recherche a donc pris l'initiative de réaliser une caractérisation complète et standardisée de tous les canaux Kv homomériques à température physiologique dans une lignée de cellules hétérologues (Ranjan et al., 2019). Ce travail a abouti à l'enrichissement d'une base de données publique regroupant les cinétiques d'activation, d'inactivation et autres paramètres utiles à la création des modèles informatiques biophysiques basées sur les équations de Hodgkin et Huxley (Channelpedia : [Channelpedia \(epfl.ch\)](http://Channelpedia.epfl.ch)).

La variabilité de fonction sous-tendue par la dépendance au voltage (activés à des potentiels plus ou moins dépolarisés) et les cinétiques différentes des canaux Kv est exacerbée par la différence dans l'expression des canaux Kv dans les neurones (Gutman et al., 2005). Pour prendre quelques exemples, le canal Kv1.1, exprimé dans le segment initial de l'axone et dans les nœuds de Ranvier joue un rôle essentiel dans la régulation de l'initiation et la formation des PA (Gittelmann & Tempel, 2006; Goldberg et al., 2008; Robbins & Tempel, 2012). Également positionné dans les terminaisons axonales, le Kv1.1 est impliqué dans la libération de neurotransmetteurs et la conduction de l'influx nerveux (Monaghan et al., 2001; H. Wang et al., 1994). Les canaux Kv7.2 et canaux 7.3 sont capables de former des homotétramères, mais c'est en configuration d'hétérotétramères qu'ils sont responsables du courant M ( $I_M$ ) (Figure 4) (Cooper et al., 2000; Devaux et al., 2004; Schwake et al., 2000). Ce courant est particulier par ses cinétiques lentes et sa faible inactivation, jouant un rôle variable en fonction de sa localisation subcellulaire. Dans le compartiment somato-dendritique, les canaux Kv7.2/Kv7.3 ont une implication dans le  $V_m$  de repos ainsi que dans la réactivité aux entrées synaptiques. Dans le segment initial de l'axone et les nœuds de Ranvier, ces canaux déterminent le seuil d'excitabilité pour la génération de PA, notamment en condition d'hyperexcitabilité (Baculis et al., 2020; H.-S. Wang et al., 1998). Le canal Kv4.1, distribué principalement dans le soma et les dendrites est responsable du courant A ( $I_A$ ) (K.-R. Kim et al., 2020). À l'inverse de  $I_M$ ,  $I_A$  est caractérisé par ses cinétiques rapides d'activation et d'inactivation (Figure 4). Ce courant exerce une action dans la repolarisation de PA et également sur le mode de décharge des neurones, rendant son action cruciale à l'échelle

d'un réseau de neurones (Rogawski, 1985; Song et al., 1998). De façon similaire, Kv4.2 est un canal essentiellement dendritique et il a été montré qu'il pouvait intervenir dans la plasticité synaptique (Jung et al., 2008).

Les mutations entraînant des pertes de fonction des Kv mènent à de nombreuses dérégulations, les majoritaires étant les crises d'épilepsie, des dysfonctionnements moteurs et souvent une mort prématurée (Baculis et al., 2020; Brew et al., 2007; Derera et al., 2019; Glasscock et al., 2010; Goldberg-Stern et al., 2009; Köhling & Wolfart, 2016; Smart et al., 1998; Volkers et al., 2009).

### *I. C. La spécificité du Kv2.1*

La famille Kv2 est quant à elle divisée en deux membres, le Kv2.1 et le Kv2.2.

Le Kv2.1, aussi décrit DRK1 chez le rat, se distingue des autres Kv par sa localisation, son expression de surface singulière et ses cinétiques d'activation et d'inactivation lentes. C'est dans les ovocytes de xénope que l'ADNc codant pour la sous-unité  $\alpha$  a été isolé pour la première fois (Frech et al., 1989). Codées par le gène *Kcnb1*, situé sur le chromosome 20q13.13, les sous-unités  $\alpha$  du Kv2.1 sont exprimées dans de nombreux tissus et exercent une fonction essentielle car responsable pour 80% du courant à rectification retardée ( $I_{Kdr}$ ). La capacité d'interaction entre les sous-unités Kv2.1 et plusieurs autres sous-unités  $\alpha$  mais également  $\beta$ , sous-tend une variabilité fonctionnelle très importante pour les canaux Kv2.1. Cependant, à la différence des autres canaux Kv, une récente étude sur le domaine de T1 révèle par cristallographie aux rayons-X que ce domaine similaire au reste de la famille des Kv, permet au Kv2.1 de former un pentamère au lieu d'un tétramère (Z. Xu et al., 2022). Cette conclusion permet d'émettre de nouvelles hypothèses quant à la stœchiométrie des canaux Kv2.1 et leur fonctionnalité.

Bien que le Kv2.2 joue également un rôle dans le  $I_{Kdr}$ , sa fonction est moins claire que celle de Kv2.1 (Z. Li et al., 2021). Le Kv2.2 est exprimé beaucoup moins largement que le Kv2.1, et est préférentiellement localisé dans le cerveau antérieur basal, le noyau médian du corps trapézoïdal et les couches II et Va du néocortex (Bishop et al., 2015) (Figure 5).

## I. C. 1. Expression du Kv2.1

### I. C. 1. Durant le développement

Les recherches menées sur l'expression du Kv2.1 durant le développement, se basent sur l'expression d'ARN messager (ARNm) issu de la transcription du gène *Kcnb1* et l'enregistrement des courants potassiques.

Chez le xénope, les ARNm du Kv2.1 sont détectés au premier jour de croissance. Les jours suivants voient l'expression des transcrits augmenter de façon rapide, de 2,5 fois entre le premier et deuxième jour de croissance puis de 3 fois entre les jours 3 et 4 (Burger & Ribera, 1996). Cette expression progressive du Kv2.1 se retrouve également chez le rat. Les premiers courants  $I_{Kdr}$  sont enregistrés dès le stade E15 pour les cellules progénitrices de la zone sous-ventriculaire (D. O. Smith et al., 2008), et également dans des cellules progénitrices plus âgées à P0-P3 (Feldman et al., 1996). L'enregistrement de ces courants est corrélé par une augmentation de l'expression des ARNm et de la sous-unité  $\alpha$  qui en découle à partir du stade E14 jusqu'au cerveau adulte (Maletic-Savatic et al., 1995; D. O. Smith et al., 2008; Swanson et al., 1990; Trimmer, 1993). Une étude menée sur des cellules précurseurs humain du système nerveux central (SNC) provenant d'embryons entre 12 et 18 semaines, montrent également l'enregistrement de ce courant  $I_{Kdr}$  (Piper et al., 2000). De façon intéressante, l'expression du Kv2.1 en culture de neurones isolés a également été étudiée. Le Kv2.1 est d'abord détecté dans le RE, zone d'assemblage des sous-unités (Papazian, 1999). La localisation du Kv2.1 n'est d'abord que partielle, située uniquement dans le soma et ce n'est qu'à partir de 14 jours *in vitro* que la localisation du Kv2.1 est complète dans le soma, les dendrites proximales et le segment initial de l'axone (Antonucci et al., 2001; Maletic-Savatic et al., 1995).

### I. C. 2. Dans les différents tissus

Le canal Kv2.1 est exprimé dans de nombreux tissus, principalement le cœur, les muscles lisses, le pancréas, la rétine et le cerveau (notamment le cortex et l'hippocampe). Son expression est également retrouvée de façon moins conséquente dans des tissus tels que le bulbe olfactif, la cochlée et les poumons (Gutman et al., 2005).

L'expression de Kv2.1 a été observée dans le cœur, où il joue un rôle dans la modulation de la durée du PA cardiaque et dans la régulation de la rythmicité des contractions cardiaques.

Chez l'homme, les niveaux d'expression des transcrits du canal Kv2.1 ont été révélés comme étant abondants dans le ventricule (Ördög et al., 2006) et en conséquence la présence de la protéine également (Van Wagoner et al., 1997). Fonctionnellement, les canaux Kv2.1 aident à réguler la durée du PA en permettant l'efflux d'ions potassium pendant la phase de repolarisation. Cette repolarisation est essentielle pour la réinitialisation correcte du potentiel électrique du myocyte cardiaque, le préparant ainsi à la contraction suivante, faisant du Kv2.1 un élément clé de la chronotopie cardiaque. Cette fonction a été démontrée par des expériences chez la souris où l'élimination ciblée des canaux Kv2.1 dans les myocytes ventriculaires de souris entraîne une prolongation de la durée du PA et de l'intervalle QT (Kodirov et al., 2004; O'Connell et al., 2008; H. Xu et al., 1999). De façon intéressante, la formation de clusters de Kv2.1 à la surface des cardiomyocytes auriculaires semble être absente de la surface des cardiomyocytes ventriculaires. Dans ces cellules, les canaux de Kv2.1 sont principalement localisés dans les tubules transversaux et le sarcolemme (O'Connell et al., 2008).

Dans les muscles lisses notamment les vaisseaux sanguins, le Kv2.1 joue un rôle dans la tonicité des myocytes. Chez le rat, le Kv2.1 a été détecté dans les artères pulmonaires (Archer et al., 1998), mésentériques (Y. Lu et al., 2002), et du cerveau (Amberg & Santana, 2006) souvent en association avec le Kv1.5 pour participer au courant à rectification retardée. Une étude intéressante a mis en évidence un dimorphisme de l'expression du Kv2.1 dans les myocytes de femelles ou de mâles murin. En effet, l'ouverture des canaux Kv2.1 entraîne une hyperpolarisation de la membrane des myocytes, ce qui diminue l'activité des canaux Cav1.2 de type-L, abaissant la concentration d'ions  $Ca^{2+}$  intracellulaires et provoquant une relaxation des myocytes. Comme expliqué précédemment dans les neurones, la fonction structurelle du Kv2.1 entre également en jeu dans les myocytes en favorisant l'agrégation des canaux Cav1.2 sous forme de clusters. De façon inattendue, le regroupement et la probabilité d'interactions entre les canaux Cav1.2-Cav1.2 augmentent l'influx de  $Ca^{2+}$ . Or, la fonction structurelle du Kv2.1 dépend fortement de son niveau d'expression, qui varie selon le sexe : l'expression du Kv2.1 est plus forte dans les myocytes de femelle que ceux des mâles, leur tonus myogénique est donc plus important (O'Dwyer et al., 2020). Chez le rat, dans les muscles lisses des artères cérébrales, la présence des transcrits de Kv2.1 et de Kv9.3 a été révélée donnant naissance à la colocalisation des sous-unités à la membrane plasmique des myocytes. Ce canal hétérométrique contribue au contrôle de la constriction myogénique dans une gamme de pression transmurale distincte de celle précédemment identifiée pour les autres canaux potassique de l'artère cérébrale (Zhong et al., 2010). La régulation du canal par l'angiotensine II et l'activité de la calcineurine et du facteur de transcription NFAT, réduit la fonction du canal Kv2.1 dans les artères cérébrales en diminuant l'expression des sous-unités

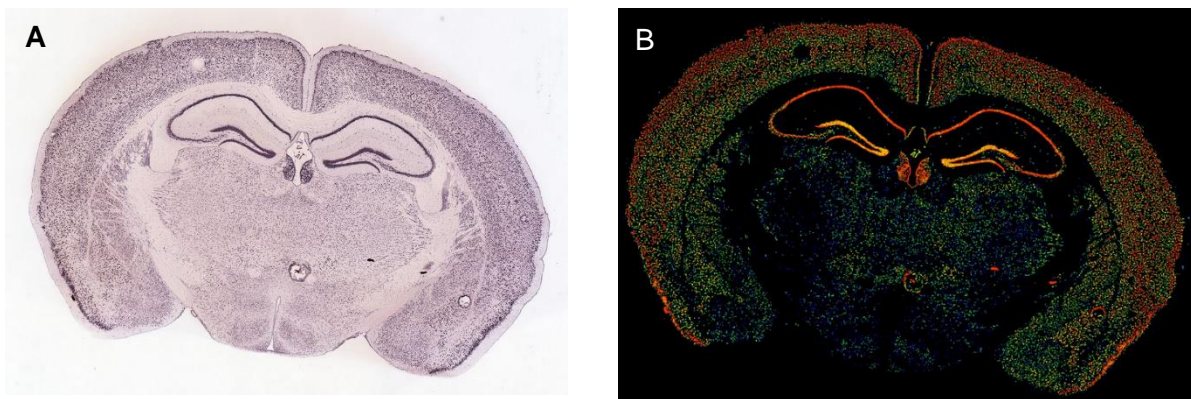
à la membrane des myocytes, lors de période d'hypertension pour réguler la pression artérielle (Amberg et al., 2004; Amberg & Santana, 2006; Suzuki et al., 2002).

En outre, l'expression du Kv2.1 a été détectée dans les cellules  $\beta$  du pancréas, où le canal participe à la régulation de la sécrétion d'insuline (Roe et al., 1996). Par des expériences de knock-out (KO) Kv2.1 ou de son blocage par la GxTx, différentes équipes ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. La perte du Kv2.1 mène à un étalement des PA tandis que leur fréquence est réduite (Herrington et al., 2006; Jacobson et al., 2007). La repolarisation des cellules  $\beta$  du pancréas est cruciale lors de la stimulation par le glucose pour limiter l'entrée de  $Ca^{2+}$  et la sécrétion d'insuline qui en découle (X. N. Li et al., 2013; MacDonald, Sewing, et al., 2002; Tamarina et al., 2005). De façon indépendante, la capacité du canal Kv2.1 à faciliter directement l'exocytose de l'insuline, dépend de l'agrégation des canaux. La perte de ce rôle structural du canal pourrait contribuer à l'altération de la sécrétion d'insuline dans le diabète (Fu et al., 2017; MacDonald, Wang, et al., 2002). Une équipe a également établi un lien entre des mutations du gène *Kcnb1* associées au diabète de type 2 influençant la progression de la maladie et/ou la capacité de compensation (Zhang et al., 2013). Toutes ces données poussent au développement d'inhibiteurs sélectifs de Kv2.1 sans inhibition croisée de Kv2.2 qui pourrait ouvrir de nouvelles voies pour promouvoir la sécrétion d'insuline par le glucose dans le traitement du diabète de type 2 (X. N. Li et al., 2013; MacDonald & Wheeler, 2003; Zhuang et al., 2009).

Associé au Kv8.2, le Kv2.1 forme des hétérotétramères dans les segments internes des bâtonnets de la rétine (Gayet-Primo et al., 2018; Hölter et al., 2012). Dans les oocytes de Xénope, en stœchiométrie égale le Kv8.2 abolit le courant du Kv2.1, mais en plus faible quantité (soit une sous-unité de Kv8.2 pour trois de Kv2.1), le Kv8.2 déplace la dépendance au voltage du Kv2.1 vers de  $V_m$  plus négatifs sans affecter son inactivation. Ce canal mixte Kv2.1/Kv8.2 fournit des courants persistants dans la gamme  $V_m$  caractéristique des cellules photoréceptrices. Ce flux de courant soutenu et l'inactivation lente sont deux caractéristiques électrophysiologiques fondamentales qui permettent aux bâtonnets de subir une hyperpolarisation transitoire après l'arrêt du flux de courant entrant continu (Czirják et al., 2007). Il est intéressant de noter que les gènes codants pour le Kv8.2 et le Kv2.1 sont sujets à une modulation circadienne, montrant des niveaux accrus pendant les heures nocturnes dans la rétine du rat (Hölter et al., 2012). Plus d'une trentaine de mutations du gène *KCNV2* codant pour les Kv8.2 ont été identifiées, entraînant des dystrophies des cônes avec réponse anormale des bâtonnets. Les symptômes sont assez variés mais les patients présentent le plus souvent un scotome central, une faible acuité visuelle, une photophobie variable, une nyctalopie et une myopie légère à modérée (Guimaraes et al., 2020).

Ces mutations impactent plusieurs parties de la protéine. Par exemple, les mutations du pore empêchent la conduction des hétéromères Kv2.1/Kv8.2, tandis que les mutations du domaine de tétramérisation empêchent la formation d'hétéromères, augmentant ainsi le nombre de canaux Kv2.1 homomériques. (Hart et al., 2019; K. E. Smith et al., 2012). La perte du Kv8.2 ou du Kv2.1, montrent une mort significative des photorécepteurs et un amincissement de la couche nucléaire externe (Fortenbach et al., 2021; X. Jiang et al., 2021).

Le Kv2.1 est exprimé de manière proéminente dans le cerveau, en particulier dans des régions telles que l'hippocampe (CA1 et gyrus denté principalement) et le cortex (couches II/III et V) (Figure 5). Les canaux Kv2.1 sont présents à la fois dans les cellules principales et dans les interneurones, et plus précisément dans la majorité des interneurones inhibiteurs corticaux et hippocampiques contenant de la parvalbumine, de la calbindine et de la somatostatine (Antonucci et al., 2001; Bishop et al., 2015; Hwang et al., 1993; Murakoshi & Trimmer, 1999; Trimmer, 1991, 1993).



**Figure 5.** Expression du *Kcnb1* dans le cerveau murin. Hybridation *in situ* de l'ARN issu du gène *Kcnb1* sur coupe coronale de cerveau murin, révélée par autoradiographie (A) et par fluorescence (B). Images de [Gene Detail :: Allen Brain Atlas: Mouse Brain \(brain-map.org\)](https://www.brain-map.org/).

### I. C. 2. Structure et localisation cellulaire

Les sous-unités Kv2.1 sont constituées de la même façon que les autres membres de la famille des Kv : six segments transmembranaires, la P-loop, et deux queues N- et C-ter dans le compartiment intracellulaire pour un total de 857 acides aminés chez l'homme (Lim et al., 2000). Cependant, ces dernières font partie des queues protéiques les plus larges de la famille des Kv, la queue C-ter est notamment évaluée comme 50% de la protéine (Mohapatra, Park, et al., 2007).

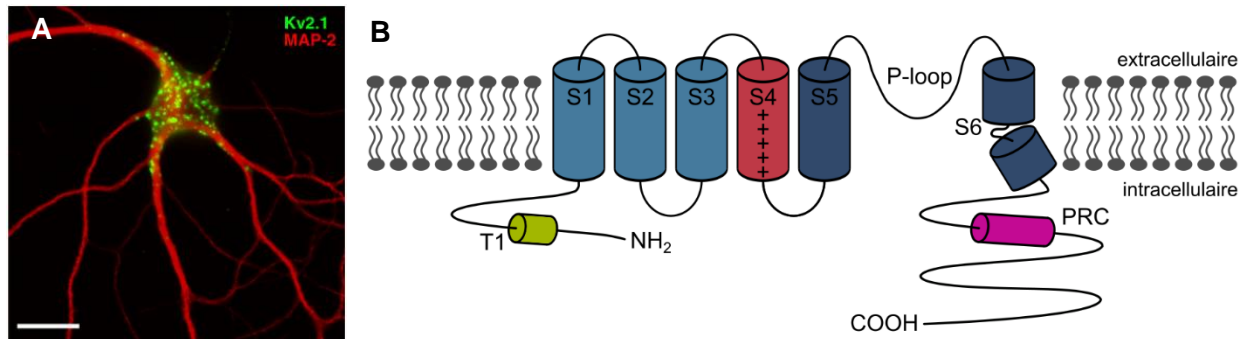


Une particularité propre au Kv2.1 correspond à sa localisation subcellulaire sous forme de clusters, de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre à la membrane plasmique au niveau du corps cellulaire, des dendrites proximales et du segment initial de l'axone (Figure 6) (Antonucci et al., 2001; Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005; Sarmiere et al., 2008; Scannevin et al., 1996; Trimmer, 1991). De façon intéressante, il existe une différence dans la temporalité de l'expression des clusters de Kv2.1 dans les neurones pyramidaux ou les interneurons. Il a été montré que les canaux Kv2.1 sont d'abord exprimés sous forme de petits clusters (de moins d'1  $\mu\text{m}$  de diamètre) puis ces derniers augmentent en taille pour former des clusters qui peuvent être considérés comme matures (sous forme de donuts de 1 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Antonucci et al., 2001; Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005). Bien que ces étapes soient communes aux deux types cellulaires, les clusters de Kv2.1 des interneurons atteignent leur tailles maximales quelques jours avant les neurones pyramidaux (Antonucci et al., 2001)

Dans le cas du Kv2.1, la formation de clusters semble être importante dans la fonctionnalité du canal et a été sujette à de nombreuses recherches dans la littérature. L'étude du clustering d'une protéine passe principalement par des approches de microscopie à épifluorescence, confocale ou de super-résolution. Communément, l'intensité du marquage est utilisée pour distinguer les clusters c'est-à-dire les zones où la densité de fluorophores et donc de protéines est forte. L'un des paramètres les plus quantifiés concernant les clusters est l'aire de ces derniers, il est donc important de faire attention à la technique utilisée en termes de résolution d'image. L'utilisation de la microscopie de super-résolution permet non seulement de localiser les fluorophores à une résolution de près de  $\approx 20$  nm (contrairement à 250 nm en épifluorescence) et donc d'avoir une quantification de l'aire des clusters plus précise mais également d'estimer la proportion de détectations à l'intérieur des clusters. Cependant, comme toute technique comporte des avantages et des inconvénients, le choix du type de microscopie ainsi que des outils nécessaires à l'analyse des images se fait en fonction de la question biologique à laquelle le chercheur veut répondre.



Bien que les sous-unités  $\alpha$  Kv2.1 portent un site de N-glycosylation consensuel sur le domaine de liaison extracellulaire entre le segment S3 et le S4, les canaux Kv2.1 natifs du cerveau et exprimés dans des systèmes hétérologues ne sont pas N-glycosylés (Shi & Trimmer, 1999).



**Figure 6.** Localisation et schéma des sous-unités  $\alpha$  Kv2.1.

**(A)** Immunocytochimie d'un neurone hippocampique *in vitro* avec un marquage dendritique MAP2 (rouge) et Kv2.1 (vert). Les canaux Kv2.1 sont distribués à la membrane sous forme de clusters dans le corps cellulaire, les dendrites proximales et le segment initial de l'axone. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (Jensen et al., 2011).

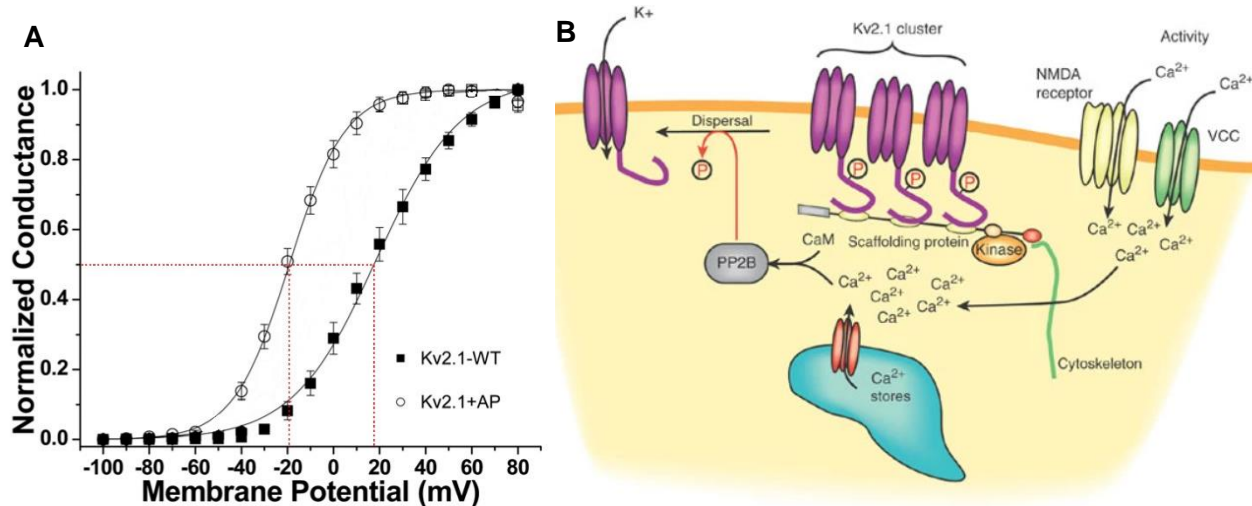
**(B)** Schéma de la structure d'une sous-unité  $\alpha$  de Kv2.1. La structure du Kv2.1 est très similaire aux autres Kv, avec 6 domaines transmembranaires, un P-loop et un domaine T1 sur la queue N-ter. Le Kv2.1 possède une séquence singulière au niveau de la queue C-ter, riche en résidus sérines. Ce domaine PRC est nécessaire à sa localisation restreinte sous forme de clusters au niveau du corps cellulaire, des dendrites proximales et dans le segment initial de l'axone des neurones.

La phosphorylation des protéines est le mécanisme post-traductionnel le plus important qui peut moduler la fonction des canaux ioniques (Levitan, 1994). Or, la queue C-ter des sous-unités Kv2.1 est riche de nombreux sites de phosphorylation avec près d'une centaine de résidus sérines, thréonines ou tyrosines (sur les plus de 400 acides aminés constituant la queue C-ter) qui fournissent de nombreux sites de phosphorylation consensuels pour diverses protéines kinases, telles que les protéines kinases A et C (PKA et PKC) (Börjesson & Elinder, 2008; Lim et al., 2000; Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005; Mohapatra, Park, et al., 2007). Pour déterminer quels étaient les résidus critiques à la localisation de la molécule, des études constituant à créer des chimères des sous-unités Kv2.1 avec diverses parties de la queue C-ter tronquées ont été réalisées. Celles-ci ont permis de mettre en évidence un domaine constitué de 26 acides aminés, parmi lesquels 4 résidus phosphorylables, nécessaires à la localisation restreinte et la formation de clusters. L'élimination ou la transformation des 4 résidus phosphorylables en résidus alanine pour empêcher l'ajout d'un groupement phosphate, induit une expression uniforme et homogène

à la surface des cellules (Jensen et al., 2017; Lim et al., 2000; Mohapatra & Trimmer, 2006; Scannevin et al., 1996). Ce domaine nommé « Proximal Restriction and Clustering » (PRC) n'est pas apparenté à d'autres séquences connues pour le ciblage des protéines membranaires neuronales et représente un nouveau signal cytoplasmique responsable de la restriction proximale et du clustering (Figure 6) (Lim et al., 2000). Les nombreux sites de phosphorylation induisent un changement de poids des sous-unités Kv2.1 qui est conséquent mais difficilement évaluable car tous les sites de phosphorylation ne sont pas régulés de manière similaire dans les différentes cellules. En se basant sur la littérature, le poids moléculaire d'une sous-unité complètement phosphorylée se situe dans une gamme de poids allant de 130 à 120 kDa et non phosphorylée de 110 à 93 kDa (pour un poids estimé de 95.3 kDa en se basant sur la structure) (Hwang et al., 1993; Mohapatra & Trimmer, 2006; Murakoshi et al., 1997; Shi et al., 1994; Trimmer, 1991).

De façon intéressante, la capacité des canaux Kv2.1 à former des clusters semble être modifiée par l'activité neuronale. Dans des modèles d'épilepsie murin, ou dans des neurones *in vitro* suite à l'application de glutamate ou de carbachol, la formation de clusters de canaux Kv2.1 se voit impactée avec une réduction de la capacité à former des clusters. Les canaux Kv2.1 prennent alors une distribution plus ou moins uniforme à la surface des neurones. Dans ces cellules, le poids moléculaire des sous-unités Kv2.1 correspond à celui d'un état déphosphorylé. Par l'utilisation de drogues bloquant différentes phosphatases, la calcineurine (aussi connue sous le nom de PP2B) a été identifiée comme étant responsable de ce changement de phosphorylation. La spectrométrie de masse a notamment permis d'identifier plusieurs sites de phosphorylation sur les queues intracellulaires de Kv2.1, dont sept sont déphosphorylés par la calcineurine (Misonou et al., 2004; Mohapatra & Trimmer, 2006; Park et al., 2006).

Or, comme une grande majorité des canaux ioniques voltage dépendant, la modification de l'état de phosphorylation des sous-unités induit un changement de la dépendance au voltage ( $V_{1/2}$ ) du canal Kv2.1 (Ismailov & Benos, 1995). Dans l'axone de calmar, le canal Kv2.1 subit des modifications de sa cinétique et de sa conductance lorsqu'il est phosphorylé ou déphosphorylé. Ces effets peuvent être dus à des interactions électrostatiques entre le domaine sensible au voltage et les groupements phosphates liés à la queue C-ter, puisqu'une augmentation des charges de surface négatives à l'intérieur de la membrane près du segment S4 exigerait une impulsion dépolarisante plus forte pour ouvrir le canal (Börjesson & Elinder, 2008; Perozo & Bezanilla, 1990). Par des expériences de dialyse intracellulaire avec de l'alcaline phosphatase pour déphosphoryler complètement la protéine, la courbe d'activation du Kv2.1 a été déplacée de plus de 20 mV vers un potentiel plus négatif (Figure 7) (Murakoshi et al., 1997; Park et al., 2006).



**Figure 7.** La phosphorylation du Kv2.1 induit un changement de sa dépendance au voltage et est régulée par la signalisation calcique.

**(A)** La courbe de conductance en fonction du voltage du Kv2.1 est décalée de 40 mV vers des  $V_m$  plus négatifs, de 20 mV en condition WT (carrés noirs) à -20 mV suite à l'application d'alcaline phosphatase (ronds blancs).  $V_{1/2}$  indiqué par les lignes pointillées rouges. Adapté de (Park et al., 2006).

**(B)** L'entrée de calcium par les récepteurs ionotropiques du glutamate, les Cav en réponse à une dépolarisation ou la libération de calcium intracellulaire des stocks du réticulum endoplasmique active la calcineurine, entraînant la déphosphorylation et la dispersion des clusters de Kv2.1 dans les neurones (Surmeier & Foehring, 2004).

Grâce à ces deux conclusions, l'hypothèse d'un rôle de régulation homéostatique en réponse à l'activité neuronale a été formulée. Les études suivantes se sont donc tournées vers l'action d'une augmentation de l'activité et son effet sur la régulation du  $V_{1/2}$  des canaux Kv2.1.

La mutation en alanine de sites individuels régulés par la calcineurine, imitant la déphosphorylation a produit des déplacements du  $V_{1/2}$  progressifs vers de potentiels plus négatifs. L'effet des mutations sur plusieurs sites est additif, ce qui montre que la phosphorylation variable de Kv2.1 sur un grand nombre de sites permet une régulation graduelle, en fonction de l'activité, du déclenchement du canal et des propriétés de mise à feu des neurones (Park et al., 2006). L'application de glutamate sur des neurones hippocampiques de rat *in vitro* ou une dépolarisation soutenue de la membrane, induit également ce même déplacement du  $V_{1/2}$  (Mohapatra et al., 2009). Cette hyperpolarisation du  $V_{1/2}$  vers des  $V_m$  négatifs, a un impact sur la capacité des neurones à émettre des PA, puisque le canal Kv2.1 déphosphorylé s'ouvre plus tôt dans le cycle du PA, le courant  $I_{Kdr}$  généré contre la dépolarisation de la stimulation, celle-ci devant être plus forte pour pouvoir atteindre le seuil d'activation et générer de nouveaux PA. Qualifié de rhéostat homéostatique, tout porte à croire que le Kv2.1 a un rôle critique dans la suppression de la décharge neuronale après des niveaux élevés d'activité neuronale, telle les ischémies ou l'épilepsie (Börjesson & Elinder, 2008; Misonou et al., 2004; Mohapatra et al., 2009; Murakoshi et al., 1997; Murakoshi & Trimmer, 1999; Park et al., 2006; Sarmiere et al., 2008).

Puisque la dispersion est corrélée à la déphosphorylation et à la modification du  $V_{1/2}$ , l'hypothèse selon laquelle les canaux dans les clusters seraient non conducteurs par rapport aux canaux hors des clusters a été formulée. Pour tester cette hypothèse, une première équipe a effectué des expériences d'enregistrements électrophysiologiques précisément au niveau des clusters de Kv2.1 à la membrane plasmique pour étudier leur conductance. La très faible activité enregistrée aux niveaux de ces clusters en opposition à l'activité enregistrée hors des clusters, suggère que les canaux Kv2.1 retenus dans les clusters de la surface cellulaire sont non conducteurs et ne contribuent pas de manière significative au courant  $I_{Kdr}$ , ce dernier étant dû dans sa quasi-entière aux canaux capables de diffuser librement (O'Connell et al., 2010). Pour aller plus loin, des travaux dans des cellules HEK, ont permis de quantifier la proportion de canaux Kv2.1 conducteurs et non conducteurs : 50% des canaux Kv2.1 conduisent les ions  $K^+$ , pourcentage qui diminue avec l'augmentation de la densité des canaux à la membrane plasmique. Aux densités spatiales les plus élevées, qui sont comparables à celles trouvées dans les clusters Kv2.1 *in situ*, 20% des canaux Kv2.1 sont conducteurs (Fox, Loftus, et al., 2013; Maverick & Tamkun, 2022). Il est donc intéressant de noter ici que si la forte densité des canaux Kv2.1 a un impact sur la conductance, les systèmes utilisant des transfections pour exprimer une construction du Kv2.1 tels que les cultures de neurones *in vitro* sont des systèmes avec une surexpression de canaux Kv2.1 impliquant une possible modification dans sa fonctionnalité par rapport à des systèmes exprimant uniquement le Kv2.1 endogène. Deux hypothèses ont été formulées quant au

rôle des canaux non conducteurs : (1) ils peuvent représenter un réservoir à la surface de la cellule où les canaux sont stockés permettant d'augmenter rapidement le nombre de canaux fonctionnels à la surface sans avoir à synthétiser des canaux *de novo* et à les transporter à la surface (O'Connell et al., 2010) et/ou (2) ils possèdent un rôle structurel comme plateforme d'interaction dans l'établissement de points de jonction entre la membrane plasmique et le RE (Fox et al., 2015), lors de l'exocytose (Deutsch et al., 2012) ou en lien avec les jonctions microgliales ou niveau du corps cellulaire (Cserép et al., 2020).

Une des protéines connues à l'interaction avec les sous-unités Kv2.1 sont les protéines AMIGO (pour « AMphoterin-Induced Gene and ORF »), constituant une famille de molécule d'adhésion cellulaire (Maverick et al., 2021; Peltola et al., 2011). De façon intéressante, l'interaction entre les deux n'est pas perturbée par la dispersion de Kv2.1 induite par un stimulus (Peltola et al., 2011). Caractérisée comme étant des sous-unités  $\beta$  des canaux Kv, la liaison entre AMIGO2 et les sous-unités  $\alpha$  Kv2.1 mais aussi Kv2.2 impacte les cinétiques d'inactivation, ce qui entraîne un état d'ouverture prolongé des canaux Kv2 (Maverick et al., 2021), alors qu'AMIGO1 décale le  $V_{1/2}$  des canaux Kv2.1 vers des Vm plus négatifs (Sepela et al., 2022).

### I. C. 3. Fonctions du Kv2.1 dans la cellule

Les fonctions du Kv2.1 dans la cellule semblent être variées, d'autant plus que sa capacité à former des canaux avec des sous-unités silencieuses agrandit la gamme de cinétique de courant porté par ces canaux. L'assemblage en canal hétérotétramérique de ces sous-unités silencieuses et des Kv2 consiste en une réduction de l'amplitude, un ralentissement de la cinétique d'inactivation et une altération de la dépendance au voltage de l'inactivation des courants Kv2.1 (Bocksteins, 2016). Par exemple, les canaux Kv2.1 contenant des sous-unités Kv9.3 sont impliqués dans la vasoconstriction de l'artère pulmonaire hypoxique (Patel et al., 1997), avec les sous-unités Kv5.1 et Kv6 façonnent  $I_{Kdr}$  dans le muscle lisse de la vessie (Hristov et al., 2012; Thorneloe & Nelson, 2003), et les sous-unités Kv8.2 sont impliquées dans la photoréception de la rétine (Hart et al., 2019) et l'assemblage de Kv2.1 et Kv9 dans les neurones des ganglions spinaux chez la souris (Bocksteins et al., 2009).

Dans la littérature sont décrits deux types de fonctions au canal Kv2.1, d'une part son rôle canonique et sa fonction de conduction des ions  $K^+$  et d'autre part, soulignée par sa particularité du Kv2.1 à former des clusters de grande taille à la surface de la membrane plasmique des neurones, ses fonctions non canoniques liées à son expression membranaire.

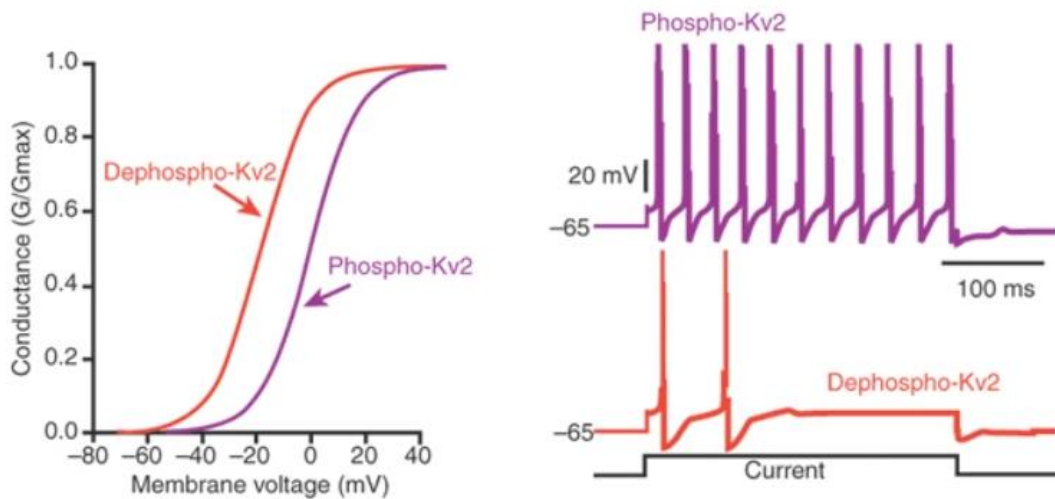
### *I. C. 3. a. Rôles canoniques*

#### **I. C. 3. a. 1. Régulation de l'excitabilité neuronale**

Dans les neurones, le Kv2.1 est impliqué dans la repolarisation des PA et spécifiquement lors de la décharge à haute fréquence (P. W. Liu & Bean, 2014). Dans les neurones de CA1 ou du ganglion cervical supérieur du rat, l'application de GxTx lors d'une stimulation prolongée, augmente la dépolarisation de la membrane plasmique entre les PA lors de la décharge à haute fréquence. Ce phénomène a été associé à une augmentation de la fréquence initiale des PA. Cependant, l'inhibition des canaux Kv2.1 empêche le maintien de la décharge à haute fréquence car les neurones entrent plus facilement dans le depolarization block (Guan et al., 2013; J. Johnston et al., 2008; P. W. Liu & Bean, 2014). L'hypothèse générale formulée dans la littérature est qu'en l'absence des canaux Kv2.1, le Vm reste dépolarisé entre les PA, empêchant la réactivation des canaux voltage dépendants Na<sup>+</sup> qui se sont inactivés à ce moment du cycle du PA (Guan et al., 2013; J. Johnston et al., 2008). Par conséquent, les canaux Kv2.1 peuvent soit diminuer, soit augmenter l'excitabilité neuronale en fonction de l'échelle de temps de l'excitation (P. W. Liu & Bean, 2014). Ces résultats sont corrélés par une étude utilisant un dominant négatif, dans les cellules pyramidales du cortex somatosensoriel ou moteur de rats (couches II/III ou V). Les résultats suggèrent également que les canaux Kv2.1 jouent un rôle dans le contrôle du Vm pendant l'intervalle entre les PA et le taux de décharge car le dominant négatif impacte ces deux paramètres (Guan et al., 2013). L'utilisation d'un knock-out Kv2.1 montre, lors de stimulations à des fréquences élevées, une élongation de la durée de PA et des transients calciques ce qui suggère que Kv2.1 est essentiel pour la repolarisation des PA pendant la stimulation à haute fréquence (Du et al., 2000).

Outre la décharge continue à haute fréquence, certains neurones sont également capables de générer un patron de décharge particulier qualifié de burst. Ce sont des périodes de génération rapide de PA suivies de relativement longues périodes de repos, ayant un rôle particulièrement important dans l'encodage de l'information (Zeldenrust et al., 2018). Dans les neurones pyramidaux de la couche V du cortex, le blocage des Kv2.1 par la GxTx lors de stimulation dendritique modifie les réponses de PA isolés en bursts portés par une post-dépolarisation accrue (Newkirk et al., 2021). De même, le blocage des Kv2.1 dans les cellules de CA3, augmente la probabilité de ces cellules à générer des bursts (Raus Balind et al., 2019). Dans ces cellules, deux modes de décharges existent, les PA isolés et les bursts de deux ou plusieurs PA dont

l'amplitude diminue progressivement et dont la durée augmente pendant la salve. Ces bursts nommés « Complex Spike Bursts » (CSB) peuvent représenter une forme importante de codage de l'information dans l'hippocampe (Thomas et al., 1998). Les CSB sont le résultat d'une interaction entre les entrées synaptiques et les conductances voltages dépendantes dans deux zones d'initiation des pointes séparées dans l'espace (somatique et dendritique apicale). Dans les cellules de CA3, il semblerait que le gradient d'activité du Kv2.1 dû à sa localisation somato-dendritique proximale contribue à la modulation de la génération de CSB, notamment pour réguler l'initiation et/ou le couplage de la génération de pointes dendritiques et somatiques (Raus Balind et al., 2019).



**Figure 8.** La déphosphorylation du Kv2.1 empêche la décharge des neurones. En utilisant un modèle computationnel simulant des réponses neuronales, le décalage de la conductance des canaux Kv2.1 correspondant à un état déphosphorylé de la queue C-ter des sous-unités empêchant la décharge de PA à haute fréquence (Surmeier & Foehring, 2004).

Dans la littérature, le Kv2.1 se voit attribué le rôle de régulateur homéostatique qui repose sur l'hypothèse du changement de  $V_{1/2}$  du au processus de phosphorylation de la queue C-ter des sous-unités Kv2.1. La déphosphorylation des canaux a pour conséquence un décalage de la  $V_{1/2}$  vers des  $V_m$  plus négatifs, ce qui a pour conséquence l'ouverture des canaux Kv2.1 à des  $V_m$  plus hyperpolarisés (Park et al., 2006), permettant à un plus grand nombre de canaux de s'ouvrir pendant la phase ascendante du pic (Figure 8). Il ne faut pas exclure que les valeurs de conductances sont également sujettes à des hausses de prix (Fox, Loftus, et al., 2013). Ces modifications du courant  $I_{Kdr}$  pourraient supprimer de manière significative le déclenchement des PA



dans les neurones (Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005; Murakoshi et al., 1997; Murakoshi & Trimmer, 1999; Surmeier & Foehring, 2004).

### I. C. 3. a. 2. Acteur de l'apoptose

Lors de l'apoptose, contrairement au mécanisme ionique de la nécrose, un efflux excessif et un appauvrissement intracellulaire en  $K^+$  sont mis en jeu. L'apoptose a été définie à l'origine par des caractéristiques morphologiques, notamment le rétrécissement du corps cellulaire, la condensation nucléaire, la margination de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). Les modifications de l'osmolarité générées par la perte des ions  $K^+$  sont favorables à l'élimination de l'eau de la cellule et sont considérées comme un facteur important de la diminution physiologique et pathologique du volume cellulaire (S. P. Yu et al., 2001; S. P. Yu, 2003). Par ailleurs, l'élévation de la concentration en ions  $K^+$  dans le milieu extracellulaire bloque l'apoptose dans un grand nombre de types de cellules en empêchant l'efflux induisant la mort cellulaire (Hughes & Cidlowski, 1999). Cette sortie massive d'ions  $K^+$  permet l'activation des caspases et la formation de l'apoptosome (Justice et al., 2017; S. P. Yu et al., 1997). Dans les neurones, l'apoptose s'accompagne d'une amplification des courants potassiques, dépendante de la kinase p38, qui précède l'activation des caspases (McLaughlin et al., 2001).

Il a été proposé que lors de l'apoptose, l'activité des canaux Kv2.1 serait un facteur important. L'expression de canaux non fonctionnels du Kv2.1 dans des neurones *in vitro*, élimine l'augmentation des courants potassiques qui accompagne le processus de mort cellulaire. Ces neurones sont également résistants aux agents apoptotiques. De plus l'expression du Kv2.1 fonctionnel dans un système hétérologue rend les cellules plus sensibles à l'apoptose (S. Pal et al., 2003). C'est le résidu sérine S800, site de phosphorylation par la p38, qui est nécessaire à l'insertion membranaire du Kv2.1, et subséquent de l'augmentation du courant potassique et la mort cellulaire. L'augmentation de la phosphorylation de ce site spécifique est détectée dans les neurones apoptotiques (Redman et al., 2007). De façon remarquable, l'absence de phosphorylation de S800, notamment par clivage de la queue C-ter, est suffisante pour empêcher l'achèvement du programme de mort cellulaire (F. Liu et al., 2018; S. K. Pal et al., 2006; Redman et al., 2007; Q. Sun et al., 2022). De la même façon, l'inhibition de l'interaction entre le Kv2.1 et la syntaxine-1A, empêcherait l'insertion de nouveaux canaux donc l'efflux d'ions  $K^+$  et finalement l'apoptose (Yeh et al., 2017).



Des études prenant en compte le stress oxydatif, liée à une ischémie ou un trauma crânien par exemple, montre une accumulation de  $Zn^{2+}$  et de  $Ca^{2+}$  cytosoliques accompagnant le déclenchement des cascades de signalisation de la mort cellulaire neuronale. L'activation de la protéine kinase II dépendante du  $Ca^{2+}$  (CaMKII) module la capacité de la syntaxine-1A à interagir avec Kv2.1. Ces résultats révèlent une convergence coopérative des voies de signalisation des lésions médiées par  $Ca^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  et par la p38 (McCord & Aizenman, 2013). De façon discutée, la formation de clusters des canaux Kv2.1 est également un élément clé puisque l'ischémie dans le cerveau de rat ou sur des neurones *in vitro* induit une déphosphorylation des sous-unités Kv2.1, la dispersion des clusters et la perte des points de jonction entre la membrane plasmique et le RE entraînant une augmentation de l'efflux d'ions  $K^+$  (Misonou, Mohapatra, Menegola, et al., 2005; Schulien et al., 2020) mais le maintien de ses clusters a été montré comme essentiel à l'insertion de nouveaux canaux à la membrane (Justice et al., 2017).

Bien que peu de littérature existe sur ce sujet, une autre voie d'apoptose pourrait également impliquer le Kv2.1 et la séquestration de la protéine Akt empêchant la survie cellulaire (Forzisi et al., 2022).

### *I. C. 3. b. Rôles non canoniques*

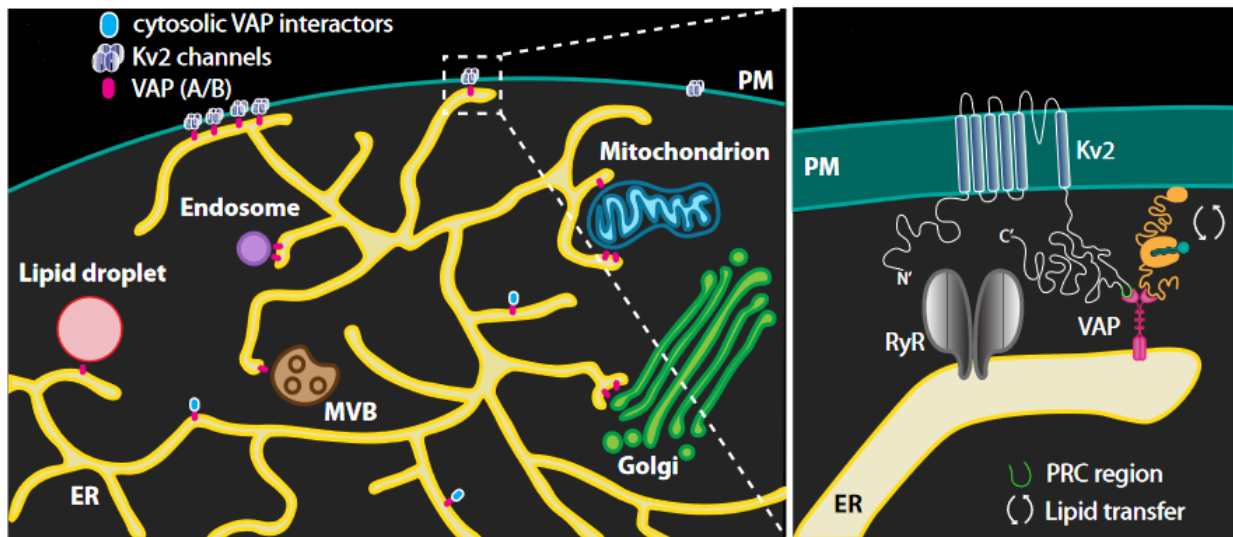
#### **I. C. 3. b. 1. Points de jonction entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique**

Le RE est un organe unique et continu, entouré d'une membrane et composé de domaines distincts sur le plan fonctionnel et structurel. Le RE est divisé en deux domaines : l'enveloppe nucléaire et le RE périphérique, ce dernier correspondant à un réseau de tubules et de feuillettes répartis dans le cytoplasme (English et al., 2009). En 1962, des points d'apposition entre des citernes du RE et la membrane plasmique ont été identifiés dans les neurones du SNC. Les deux membranes sont maintenues à proximité immédiate mais séparées par un petit espace rempli par un cytosol électrodense de 5 à 30 nm (Dickson, 2017; Gallo et al., 2016; Henne et al., 2015; Rosenbluth, 1962). Il a été estimé que ces points de jonction occupaient 10% de la surface totale de la membrane plasmique, que ce soit au niveau du corps cellulaire ou des dendrites proximales (Wu et al., 2017). Parmi les nombreuses protéines identifiées à l'établissement de ces points de jonction, le Kv2.1 tient un rôle particulier grâce sa faculté à s'organiser en clusters. La microscopie électronique, montre une localisation proche entre les membranes plasmique et du

RE proposant que les clusters de Kv2.1 jouent un rôle structurel direct dans l'induction de jonctions stables entre le RE et la membrane plasmique. L'exposition au glutamate pour disperser les clusters de Kv2.1 induirait alors la rétraction du RE de ses points de jonction (Fox et al., 2015).

La question du mécanisme de liaison entre les Kv2.1 de la membrane plasmique et la membrane du RE s'est donc posée. En utilisant des techniques de biotinylation de proximité et de co-immunoprécipitation, les protéines VAP ont été identifiées comme des interacteurs potentiels de Kv2.1. L'interaction entre les deux passe par un motif FFAT (deux phénylalanines dans un milieu acide) de la queue C-ter des sous-unités Kv2.1 dans le domaine PRC et la partie N-ter des protéines VAP (Figure 9) (B. Johnson et al., 2018; Kirmiz et al., 2018; E. W. Sun & De Camilli, 2018). Ces points de jonction sont particulièrement importants car la membrane plasmique mais également la membrane du RE y sont enrichies en canaux calciques impliquées dans la régulation du  $Ca^{2+}$ , telles que le récepteur de la ryanodine (RyR), le récepteur  $IP_3$ , et STIM1 (Carrasco and Meyer, 2011). Le couplage entre le Kv2.1 et le RyR a été étudié dû à la régulation de l'état phosphorylation du canal Kv2.1 de façon calcium-dépendante. La microscopie électronique confirme l'apposition des clusters de Kv2.1 et des clusters de RyR à l'emplacement des points de jonction dans les neurones murin. De plus, la stimulation aiguë des RyR dans des cellules hétérologues provoque un changement hyperpolarisant du  $V_{1/2}$  de l'activation des canaux Kv2.1, typique de leur déphosphorylation dépendante du  $Ca^{2+}$  et de la calcineurine (Mandikian et al., 2014). En plus de colocaliser avec les clusters de RyR, les canaux Kv2.1 sont également à proximité des canaux calciques voltages dépendants de type-L, les Cav1.2. Il a été proposé que cette proximité induirait la formation de microdomaines de signalisation facilitant la génération de signaux calciques très localisés. La dispersion des clusters de Kv2.1 mène à une réduction de la taille des clusters de RyR et de la colocalisation de ces derniers avec les Cav1.2 et inversement. De plus, l'expression de sous-unité Kv2.1 mutée au niveau du pore, donc n'exerçant plus sa fonction conductrice d'ion  $K^+$ , n'a pas d'incidence sur les points de jonction entre la membrane plasmique et le RE ni sur la colocalisation entre le RyR et le Cav1.2 (Vierra et al., 2019). Le Kv2.1 a une influence significative dans la formation de l'activité des canaux calciques voltages dépendants de type-L neuronaux et un rôle critique dans la génération des signaux calciques somato-

dendritiques mais aussi comme protection contre l'excitotoxicité du surplus de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à de forte période d'activité (Mandikian et al., 2014; Vierra et al., 2019).



**Figure 9.** Les points de jonction entre la membrane plasmique et le RE.

Le RE est capable de former des points de contacts avec la membrane de nombreux organites de la cellule dont le Golgi, les mitochondries et la membrane plasmique (panneau de gauche). A ces derniers, l'un des acteurs de cette apposition est le Kv2.1 capable d'interagir avec les protéines VAP de la membrane du RE. Cette interaction met en jeu le domaine PRC de la queue C-ter des Kv2.1 et le segment N-ter des protéines VAP. Adapté de (E. W. Sun & De Camilli, 2018).

### I. C. 3. b. 2. Plateforme d'exocytose

Un rôle supplémentaire de ces domaines membranaires est de servir de plaques tournantes localisées pour l'endo/exocytose et pour le transfert et le métabolisme des lipides (Carrasco & Meyer, 2011; Chang et al., 2017; Fox, Haberkorn, et al., 2013; Kirmiz et al., 2018).

Dans les neurones (ou les cellules neuroendocrines), l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche l'exocytose des vésicules sécrétoires, libérant ainsi des neurotransmetteurs (ou des hormones). L'exocytose repose sur le complexe SNARE (pour « Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor ») composé dans les neurones des protéines v-SNARE sur les vésicules, la protéine VAMP (pour « Vesicle Associated Membrane Proteins »), avec les t-SNARE de la membrane plasmique, SNAP25 (« synaptosomal-associated protein of 25 kDa ») et la syntaxine-1A (Feinshreiber et al., 2009).

Or, l'interaction directe entre Kv2.1 et la syntaxine-1A a été mise en évidence en utilisant des analyses de co-immunoprécipitation et d'immunocytochimie dans les cellules neuroendocrines (Michaevlevski et al., 2003). Des études supplémentaires se sont donc intéressées au rôle de cette interaction dans la machinerie de l'exocytose. Dans un premier temps, la transfection du Kv2.1 dans un système hétérologue, a montré que les canaux Kv2.1 augmentent la libération médiée par les vésicules à noyau dense après une élévation d'ions  $Ca^{2+}$  cytoplasmique et ce même après la perturbation de la fonction du pore (Mohapatra, Vacher, et al., 2007; Singer-Lahat et al., 2007). Dans un second temps, le blocage de l'interaction entre la queue C-ter du Kv2.1 et la syntaxine-1A par des peptides compétitifs ou la transfection avec des sous-unités Kv2.1 sans queue C-ter, dans des systèmes hétérologues ou dans des neurones, montrent que cette facilitation passe par l'association directe et dynamique entre le Kv2.1 et la syntaxine-1A (Barak et al., 2011; Feinshreiber et al., 2009; Singer-Lahat et al., 2008).

Bien que le mécanisme d'intégration entre l'endocytose et le Kv2.1 ne soit pas tout à fait élucidé, les vésicules contenant du Kv2.1 livrent des cargaisons en périphérie des clusters de Kv2.1 à la surface de la membrane plasmique à la fois dans les cellules HEK transfectées et dans les neurones hippocampiques. Ces résultats indiquent que l'une des fonctions non conductrices de Kv2.1 est de former des microdomaines impliqués dans le trafic des protéines membranaires (Deutsch et al., 2012).

### I. C. 3. b. 3. Interaction avec les microglies

De façon intrigante, récemment une potentielle interaction entre la microglie et les clusters des canaux Kv2.1 pourrait être impliquée dans l'établissement de contacts microgliaux avec les corps cellulaires des neurones.

Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes du SNC qui garantissent la surveillance immunitaire et exercent également un rôle modulateur sur le développement synaptique neuronal. En cas de blessure, la microglie est activée et modifie sa morphologie en acquérant un phénotype amiboïde et des caractéristiques pro- ou anti-inflammatoires (Gullotta et al., 2023). Un site d'interaction a été identifié entre les corps cellulaires neuronaux et les processus microgliaux dans le cerveau de la souris et de l'homme. Dans des conditions physiologiques, ces jonctions somatiques microglie-neurone sont présentes sur la plupart des neurones, tant chez la souris que chez l'homme. L'activité des mitochondries neuronales est liée à la formation de jonctions microgliales, qui est induite en réponse à l'activation neuronale et bloquée par l'inhibition des récepteurs P2Y12. Les clusters de Kv2.1 sur les cellules HEK transfectées induisent la formation de

contacts entre les processus microgliaux et la membrane, ce qui n'est pas observé sur les cellules HEK transfectées avec le mutant dominant-négatif Kv2.1 ne formant pas de clusters. En outre, les clusters de récepteurs P2Y12 microgliaux étaient précisément alignés avec les clusters de Kv2.1 neuronaux. Ces jonctions neurone-microglie semblent fonctionner comme des sites de communication qui sont rapidement modifiés en réponse à une lésion cérébrale (Cserép et al., 2020; K. Sharma et al., 2020).

## II. Les mutations de *Kcnb1* dans les encéphalopathies épileptiques

La multiplicité des rôles du Kv2.1 rend compliquée la compréhension des conséquences des mutations causales à des encéphalopathies épileptiques (EE) identifiées ces dernières années. Canoniques ou non canoniques, les rôles proposés mettent en jeu des acteurs multiples et il est donc possible de s'interroger sur les répercussions des modifications de la fonction du Kv2.1 suite à ces mutations.

### II. A. Généralités sur les encéphalopathies épileptiques

#### II. A. 1. Définition(s)

C'est en 1841 que le Dr W. J. West définit pour la première fois les caractéristiques cliniques du syndrome de West qui deviendra le premier type d'encéphalopathie épileptique (West, 1841). Les EE sont définies selon la Ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) comme des affections dans lesquelles l'activité épileptique mène à de graves troubles cognitifs et comportementaux qui peuvent s'aggraver avec le temps. Ces troubles sont souvent intraitables et précoces, caractérisés par des crises fréquentes et un mauvais développement (Berg et al., 2010). Le syndrome d'Ohtahara, le syndrome de Dravet, l'encéphalopathie myoclonique précoce, le syndrome de Lennox-Gastaut, l'encéphalopathie épileptique avec pointes-ondes continues pendant le sommeil lent ou syndrome de Landau-Kleffner sont des exemples des EE les plus courantes (Esmaeeli Nieh & Sherr, 2014; Nabbout & Dulac, 2003). Cependant, une rapide revue de la littérature met en évidence plusieurs points de controverse de cette définition qui inclut de nombreuses pathologies et syndromes à l'étiologie très variée et complexe (Aminoff et al., 2013).

Tout d'abord, la définition proposée en 2010 par l'ILAE pose plusieurs assumptions : (1) les EE peuvent être statiques ou progressives, (2) les crises d'épilepsies seraient un facteur aggravant la cognition ou le comportement et (3) le traitement des crises devrait améliorer les déficits cognitifs ou comportementaux (Jehi et al., 2015; Stafstrom & Kossoff, 2016).

Or, des études génétiques à grande échelle ont conduit à une découverte massive de gènes menant à des EE dont les manifestations cliniques sont variées. Ces nouvelles informations génétiques remettent en question la définition posée des EE, car ces patients présentent

des symptômes cliniques de la pathologie allant du maintien à la dégénérescence des fonctions cognitives, neuropsychiatriques ou comportementales en lien ou non avec des crises d'épilepsies ou activités interictales et ce pour un même syndrome d'EE. Il est donc difficile de faire la distinction entre un groupe d'EE dites « primaires » qui présenteraient une activité épileptique ayant pour conséquence une détérioration des capacités cognitives et comportementaux et un groupe d'EE « secondaires » avec des patients dont les troubles cognitifs sont présents dès l'apparition des crises et sont dus à l'étiologie sous-jacente. L'activité épileptique peut alors aggraver les capacités intellectuelles au fil du temps et, en fin de compte, entraîner une détérioration de l'état neurologique (Cross & Guerrini, 2013; von Deimling et al., 2017). Certains auteurs soutiennent donc que le terme d'EE devrait être réservé aux pathologies dans lesquelles les crises ou les décharges interictales altèrent directement un processus (cognition, neuropsychiatrique ou comportement) plutôt que d'utiliser ce terme pour définir tout trouble qui inclut une épilepsie sévère et un dysfonctionnement intellectuel (Capovilla et al., 2013; Helbig et al., 2017; Howell et al., 2016; Khan & Al Baradie, 2012; Korff et al., 2015; Stafstrom & Kossoff, 2016). Ce point de vue s'explique par le fait que l'épilepsie sévère et les troubles cognitifs ne sont pas rares. Donc si l'étiologie sous-jacente explique les troubles cognitifs et que l'épilepsie n'aggrave pas ces derniers, le terme d'EE ne serait pas approprié (Howell et al., 2016). Un autre argument soulevé est le fait que cette qualification excessive des pathologies sous le terme parapluie d'EE, pousserait les cliniciens à se concentrer uniquement sur l'activité épileptiforme sans prendre en compte les conséquences plus larges de l'étiologie sous-jacente sur le développement cognitif et comportemental, biaisant les efforts de recherche et les thérapies sur une cible trop étroite (Korff et al., 2015).

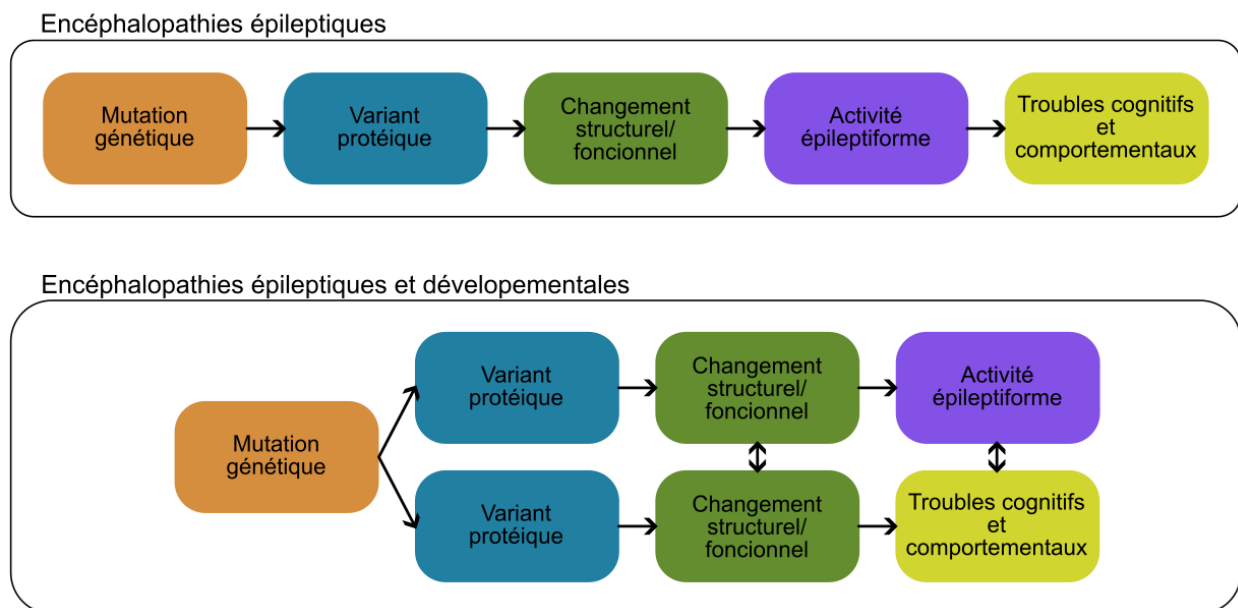
En outre, l'absence de critères diagnostiques clairs pour les EE aurait involontairement donné lieu à des utilisations de plus en plus larges et problématiques, réduisant la signification originale du terme et créant une confusion dans la littérature (Howell et al., 2016).

A la suite de ces controverses le terme d'encéphalopathies épileptogènes ou encéphalopathies avec épilepsies ont été créés mais leurs utilisations ne sont pas unanimes (Capovilla et al., 2013).

Suite à ces différents commentaires et à l'impact de la génétique dans la recherche des causes de EE, l'ILAE a apporté quelques modifications à la définition des EE en 2017. La classification de la pathologie doit désormais décrire le type de crise, le type d'épilepsie et enfin à quel syndrome épileptique (regroupement spécifique de caractéristiques cliniques et électroencéphalogramme (EEG) stéréotypé). La nouvelle classification intègre l'étiologie à chaque étape pour que les implications thérapeutiques soient plus ciblées (Scheffer et al., 2017). De plus, le retard

de développement et la déficience intellectuelle, généralement décrits comme des encéphalopathies de développement, peuvent être observés chez les patients dans les mois qui suivent la naissance. Bien que les manifestations soient diverses, 22,2% des enfants présentant une déficience intellectuelle souffrent également d'une forme d'épilepsie (McTague et al., 2016; Specchio & Curatolo, 2021). Le retard de développement des enfants peut encore une fois être dû à un trouble existant, la conséquence d'une activité épileptiforme intense ou la combinaison des deux facteurs. C'est pourquoi la classification actuelle de l'ILAE a identifié trois entités : l'encéphalopathie de développement, l'EE et l'encéphalopathie épileptique et développementale (DEE) (Scheffer & Liao, 2020; Trivisano & Specchio, 2020). Puisque dans ce dernier cas, les causes sont difficilement identifiables, les DEE concernent également les comorbidités qui se sont développées indépendamment l'une de l'autre (Figure 10) (Specchio & Curatolo, 2021).

Aujourd'hui, avec l'explosion des causes génétiques, structurelles et auto-immunes identifiées d'épilepsie sévère en bas âge et de déficience intellectuelle, la liste des EE présumées s'est considérablement allongée (Stafstrom & Kossoff, 2016).



**Figure 10.** Implications théoriques des EE ou DEE.

Dans les encéphalopathies épileptiques, les troubles cognitifs et comportementaux sont issus d'une conséquence séquentielle des activités épileptiformes. Cependant dans les encéphalopathies épileptiques et développementales, les voies pathologiques sont différentes (bien que des composants puissent être partagés) et se produisent en parallèle bien que l'activité épileptiforme et les troubles cognitifs et comportementaux aient une étiologie génétique commune qui peut être plurielle. Adapté de (Specchio & Curatolo, 2021).



## II. A. 2. Diagnostic, étiologie et symptômes

### II. A. 2. a. L'importance de la génétique

Poser un diagnostic le plus rapidement possible permet de commencer un traitement dès que possible afin de contrer les activités épileptiformes qui pourraient dégrader l'état des jeunes patients atteints d'EE/DEE. Ce sont des pathologies lourdes, dont 40% de la composante épileptiforme survient au cours des trois premières années de vie (Guerrini & Pellock, 2012; Stafstrom & Kossoff, 2016). En réalité, les EE peuvent survenir à tout âge, mais sont le plus souvent observées et le plus grave chez les nourrissons et les jeunes enfants, où l'activité épileptique survenant au cours de cette période critique du développement peut altérer non seulement les fonctions existantes, mais aussi le développement de nouvelles fonctions physiologiques selon l'âge du patient (Berg et al., 2012; Howell et al., 2016). Dans les EE/DEE, chaque gène identifié présente une pléiotropie phénotypique et chaque syndrome présente une hétérogénéité génétique. De nombreux facteurs contribuent à l'hétérogénéité phénotypique, notamment : le type et le moment des mutations au cours du développement, le moment et la localisation de l'expression des gènes physiologiques et les facteurs épigénétiques (McTague et al., 2016). Par conséquent, le diagnostic clinique est difficile en raison de l'hétérogénéité génétique et phénotypique (Kaya Özçora et al., 2023).

L'émergence de technologies génomique a accéléré la capacité des chercheurs à identifier de nouvelles mutations. Par exemple, le séquençage de l'exome entier, qui couvre l'ensemble de la séquence codante soit 1 à 1,5% du génome humain, devient un outil de plus en plus populaire (Musante et al., 2022). En appliquant cette approche à un trio patient-parents, une moyenne de 1 à 68 mutations de-novo est rapportée chez le patient, ce qui permet souvent d'identifier rapidement le gène causal à la pathologie (McTague et al., 2016). Cependant il existe une difficulté liée à la gestion de grandes quantités de données et à l'interprétation du rôle pathogène des variants. Une autre approche consiste à utiliser des panels dans lesquels un ensemble ciblé de gènes connus ou candidats permet une couverture plus dense (McTague et al., 2016; Musante et al., 2022). Peuvent également être cités, les puces chromosomiques qui permettent d'identifier les variants du nombre de copie ou les variants d'un seul nucléotide. Alors que les variants du nombre de copie sont une variabilité normale chez l'Homme, ces microdélétions ou microduplications représente une cause moléculaire importante des EE/DEE. En effet, il a été estimé que 8% des cas d'EE présente une variante du nombre de copie causale ou potentiellement contributive (Hebbar & Mefford, 2020; Mefford et al., 2011; Myers & Mefford, 2016; Shbarou & Mikati,

2016). Bien que les causes génétiques des EE/DEE soient hétérogènes, les mutations *de novo* chez les individus sont les plus souvent rapportées suivies par des anomalies chromosomiques ou des erreurs du métabolisme (McTague et al., 2016).

Un point important à mentionner, est que même si les EE sont des troubles essentiellement pédiatriques, il existe également une proportion de patients adultes auxquels moins d'attention est portée et qui n'ont donc jamais subi de tests génétiques. L'identification des causes étiologiques chez ces patients est particulièrement difficile, car ils ont généralement de longs antécédents de crises et de traitements anticonvulsivants pouvant masquer leurs caractéristiques syndromiques (Minardi et al., 2020).

Un autre outil utilisé dans le diagnostic et la recherche de l'étiologie des EE/DEE est la neuroimagerie. Celle-ci permet notamment d'observer l'activité et la connectivité dans des régions impliquées dans les processus d'attention et de mémoire de travail, ou qui soutiennent l'intégration dynamique du traitement cognitif et émotionnel, souvent dysfonctionnels dans les EE/DEE (Siniatchkin & Capovilla, 2013).

Les troubles génétiques peuvent amener à des dysfonctions du métabolisme comme les EE/DEE du métabolisme énergétiques avec des troubles mitochondriaux, du métabolisme lysosomal ou de la glycosylation des protéines (Kamien et al., 2012). Dans une minorité des cas, les causes symptomatiques peuvent également provenir d'une étiologie structurelle provoquée par une mutation génétique ou un accident vasculaire cérébral ou une encéphalopathie hypoxique-ischémique. Dans ces cas, l'anomalie structurelle est associée à un foyer épileptiforme, entraînant l'épilepsie et la régression du développement. Il a été estimé que des facteurs génétiques jouent un rôle dans au moins 70% des cas d'épilepsie, donc les EE/DEE d'étiologie structurelle représenteraient 30% des cas (Hildebrand et al., 2013). De même, les malformations du développement cortical peuvent être associées à une EE/DEE (McTague et al., 2016). Une activité épileptiforme est en théorie sous-tendue par une fonction cérébrale anormale. Les mécanismes potentiels de cette perturbation peuvent être des changements dans l'excitabilité cellulaire dus aux canaux ioniques, la réorganisation synaptique, la neurogenèse et l'apoptose (Howell et al., 2016). Suite à l'essor de la génétique et l'identification de mutations de canaux ioniques menant à des EE/DEE, l'utilisation du terme de canalopathie, introduit pour la première fois par Louis Ptáček, a été recommandé (Howell et al., 2016; Ptáček, 1997; von Deimling et al., 2017). Un dernier groupe de DEE correspond aux encéphalopathies auto-immunes, où les troubles sont dûs à une réaction du système immunitaire (Stafstrom & Kossoff, 2016). Dans ces derniers une rétroaction positive entre l'inflammation cérébrale et l'épileptogénèse existe : les crises et les lésions cérébrales augmentent l'inflammation, et ces changements pro-inflammatoires augmentent à leur

tour la sensibilité aux crises et l'excitabilité neuronale (D. Xu et al., 2013). La microglie est une cellule immunitaire présente dans le cerveau qui s'active rapidement en cas de lésion cérébrale telle qu'une crise. Le développement postnatal de la microglie est en étroite corrélation avec la prédisposition aux crises d'épilepsie (Stafstrom & Kossoff, 2016). La neuroinflammation qui suit les crises peut à la fois déclencher un dysfonctionnement cérébral et servir de cible thérapeutique potentielle (Vezzani et al., 2011).

### *II. A. 2. c. Manifestations cliniques récurrentes des principales EE décrites*

Les principaux symptômes cliniques des EE comprennent un plateau de développement ou une régression, soit globale, soit limitée à certaines fonctions telles que le langage ou le comportement, et se manifestant ou s'aggravant typiquement à des moments d'activité épileptique fréquente (Howell et al., 2016). Il est remarquable qu'en dépit de la multitude d'étiologies, les phénotypes cliniques de certaines peuvent être très similaires (Stafstrom & Kossoff, 2016).

Dans le syndrome de West, les spasmes infantiles et l'hypsarythmie surviennent à un jeune âge avec des manifestations similaires, que l'étiologie soit l'hypoxie-ischémie périnatale ou une mutation génétique (Stafstrom & Kossoff, 2016).

Les critères du syndrome de Lennox-Gastaut comprennent plusieurs types de crises (généralisées et toniques, d'absences ou myocloniques), des troubles cognitifs et un EEG anormal avec des pointes-ondes lentes. Il est cependant important de préciser que tous les patients ne présentent pas cette triade classique et que les trois caractéristiques ne doivent pas nécessairement apparaître en même temps (Arzimanoglou et al., 2009).

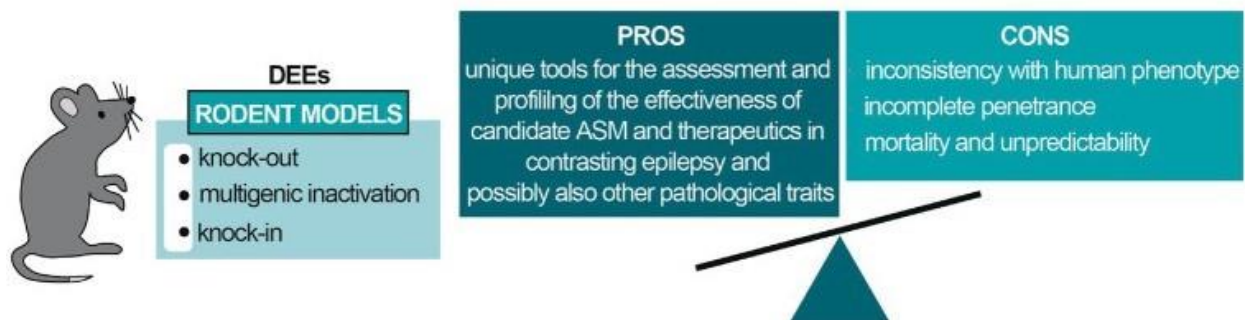
Les syndrome de l'état d'épilepsie électrique pendant le sommeil lent et des ondes de pointes continues dans le sommeil constituent un spectre d'EE dans lesquelles les décharges interictales sont supposées provoquer un déclin intellectuel, langagier ou comportemental (de Saint-Martin et al., 2014). C'est la localisation des pointes interictales qui prédit des formes spécifiques de troubles cognitifs ou moteurs (Stafstrom & Kossoff, 2016).

### **II. A. 3. Traitements envisagés**

Lorsque l'étiologie génétique est découverte, l'expression dans des lignées cellulaires hétérologues peut être utilisée pour étudier le dysfonctionnement de la protéine mis en cause, en

confirmant le changement fonctionnel ou d'expression comparée à la protéine sauvage. Des modèles neuronaux *in vitro* tels que les cultures neuronales primaires de rongeurs, les modèles bidimensionnels et tridimensionnels dérivés de cellules souches humaines ou les organoïdes, peuvent fournir des informations sur l'impact du dysfonctionnement des protéines sur les propriétés des neurones et des réseaux. Enfin, l'expression de la variation génétique dans des modèles animaux (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* et rongeurs) permet différentes approches pour accéder aux mécanismes d'action de la pathologie qui émergent à différentes échelles temporelles et spatiales (Maljevic et al., 2017; McTague et al., 2016).

Les EE/DEE sont parmi les épilepsies les plus complexes qui existent. La question se pose de savoir s'il est possible de créer un modèle animal pour ces troubles complexes qui mettent en relation de nombreuses fonctions de l'organisme car les humains et les systèmes expérimentaux diffèrent à de nombreux égards (Auvin et al., 2012). Bien que certains modèles d'épilepsies existent reproduisant une étiologie structurelle telle que les traumatismes crâniens ou l'hypoxie, les modèles d'épilepsies chroniques sont peu nombreux et la création de modèles animaux réalistes reste donc assez difficile (Figure 11) (Auvin et al., 2012; Stafstrom, 2007; Stafstrom & Kossoff, 2016).



**Figure 11.** L'utilisation des modèles animaux pour les DEE.

Lorsque l'étiologie est connue et que les mutations génétiques sont identifiées, des modèles de KO, délétions multiples ou KI peuvent être utilisés. Ces modèles animaux présentent différents avantages et inconvénients. Les inconvénients principaux sont les différences avec le phénotype humain, en particulier l'absence possible de phénotype épileptique et la pénétrance incomplète de la mutation ainsi que le taux de mortalité de ces animaux. Malgré cela, les modèles animaux génétiques sont des outils uniques et précieux pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Adapté de (Bertocchi et al., 2023).

A cause de la pléiotropie des phénotypes, les traitements de EE/DEE sont variés. L'objectif principal du traitement des EE/DEE est de contrôler les crises et de prévenir ou d'inverser

la perte de fonction neurologique et les déficits cognitifs et comportementaux (Stafstrom & Kossoff, 2016). Une meilleure compréhension de la base physiopathologique des troubles cognitifs chez les enfants atteints d'EE/DEE peut aider à concevoir des stratégies thérapeutiques plus efficaces et plus ciblées. Il faut également prendre en compte le traitement des troubles développementaux et comportementaux (Striano et al., 2013).

L'approche la plus simple consiste à utiliser des agents pharmacologiques qui ciblent directement la protéine anormale ou les voies perturbées. Par exemple, la retigabine ouvre les canaux potassiques Kv7, dont les mutations sont impliquées dans les encéphalopathies KCNQ2, et rétablit sa fonction normale *in vitro* (Orhan et al., 2014). Or, ce type de traitement n'est possible qu'après la découverte du facteur génétique de l'EE/DEE et la recherche subséquente de traitement.

Les EE/DEE sont notoirement difficiles à traiter et sont souvent médicalement réfractaires (Vigevano et al., 2013). Puisque les médicaments anticonvulsivants classiques sont pour la plupart inefficaces, des alternatives telles que l'hormonothérapie (hormone adrénocorticotrophine ou corticostéroïdes) est utilisée. (Stafstrom & Kossoff, 2016).

Des études cliniques suggèrent que le régime cétogène riche en graisses et pauvre en glucides permet de contrôler efficacement les crises d'épilepsie résistantes aux médicaments (Nei et al., 2014; Ruan et al., 2022). Cependant, ce traitement diététique est difficile à suivre, nécessite une surveillance continue, et ne convient pas à tous les patients. Ce régime ne s'applique qu'à une minorité d'EE/DEE comme chez les patients présentant un déficit du transporteur de glucose 1 dû à des mutations du SLC2A1 (Klepper, 2012).

Une autre approche étudiée est l'utilisation des cellules souches pluripotentes. Celles-ci donnent naissance à toutes les cellules d'un organisme (Parent & Anderson, 2015). Les cellules somatiques sont obtenues à partir d'un patient et sont ensuite dédifférenciées en cellules souches qui peuvent ensuite être induites à former des types de cellules spécifiques, comme des neurones ou de cellules gliales. Chez les patients atteints de maladies neurologiques, ces cellules souches pluripotentes induites peuvent être utilisées pour examiner les mécanismes de la maladie, tester la réponse ou la toxicité des médicaments ou rechercher de nouvelles thérapies (Stafstrom & Kossoff, 2016).

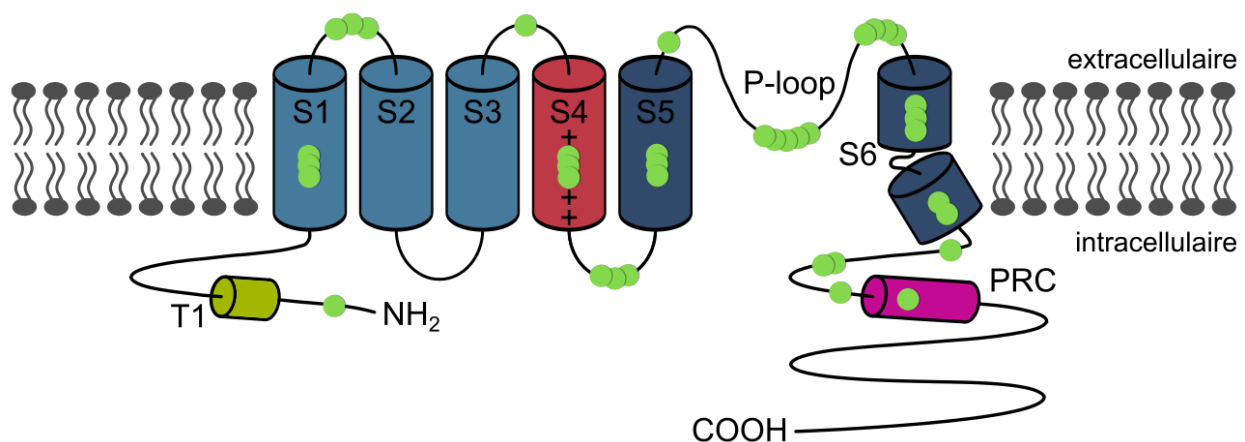
Dans de nombreux cas, les mécanismes par lesquels les mutations génétiques produisent des EE/DEE sont mal compris. Cependant, des approches bio-informatiques alliées à l'utilisation des modèles *in vitro* ou *in vivo* peuvent permettre d'identifier des liens entre des mécanismes pathologiques ou une convergence des voies pathologiques (McTague et al., 2016).

## II. B. *Kcnc1* et ses mutations

Depuis ces dix dernières années, près de 56 mutations du gène *Kcnc1* ont été identifiées comme causales à des encéphalopathies épileptiques dont le phénotype est très variable d'un patient à l'autre et ce même pour une mutation donnée (Figure 12).

En France, une association regroupant les familles des jeunes patients, « KCNB1 France » permet aux cliniciens de mener leurs recherches sur les mutations impliquées dans le but de pouvoir diagnostiquer, prendre en charge et traiter ces EE/DEE (KCNB1 France : [Association KCNB1 France – Informer, recenser et faire avancer la recherche sur la mutation du gène KCNB1 \(kcnc1-france.org\)](http://AssociationKCNB1France-Informer_recenser_et_faire_avancer_la_recherche_sur_la_mutation_du_gene_KCNB1_kcnc1-france.org)).

### II. B. 1. Identification des mutations de *Kcnc1*



**Figure 12.** Représentation schématique d'une sous-unité Kv2.1 et quelques mutations identifiées.

Près d'une cinquantaine de mutations, certaines schématisées par les ronds verts, ont été identifiées impactant plusieurs parties de la sous-unité Kv2.1. Ces différentes mutations donnent lieu à des EE/DEE au phénotype différent.

L'encéphalopathie KCNB1 se transmet selon un mode autosomique dominant, ce qui signifie qu'une copie du gène altéré dans chaque cellule suffit à provoquer le trouble. La plupart des cas résultent d'une nouvelle mutation du gène et surviennent chez des personnes n'ayant pas d'antécédents familiaux. C'est par des approches de séquençage de l'exome entier que sont identifiés les premiers mutants du gène *Kcnc1*. Ces séquençages ont été réalisés chez de jeunes patients atteints d'EE dont les symptômes cliniques étaient variés et également chez les membres

de leur famille lorsque cela a été possible. Des mutations *de novo* du gène *Kcnc1* conduisant à des variants faux-sens ont été mis en évidence. Ces trois variants sont situés dans le domaine du pore de la protéine du canal Kv2.1 et leur étude dans des systèmes hétérologues confirme la réduction du courant porté par les canaux Kv2.1 ce qui laisse présager de leur importance sur le plan fonctionnel (Torkamani et al., 2014). Après l'identification d'une nouvelle mutation de *Kcnc1* un patient atteint d'un trouble neurodéveloppemental (Soden et al., 2014), une autre équipe décide de réaliser le séquençage de l'exome entier de 437 patients atteints d'épilepsie infantile et découvre de nouvelles mutations hétérozygotes *de novo* de *Kcnc1*. Ces deux nouvelles mutations abolissent les courants Kv2 endogènes dans les neurones pyramidaux transfectés, ce qui indique un effet dominant-négatif (Saitou et al., 2015). Depuis ces études, la littérature recense 76 patients pour 56 mutations, faux-sens ou non-sens, du gène *Kcnc1* (Bar, Kuchenbuch, et al., 2020, 2020; Bar et al., 2022; Calhoun et al., 2017; de Kovel et al., 2017; Hawkins et al., 2021; Kang et al., 2019, 2023; Marini et al., 2017; Púa-Torrejón et al., 2021; Saitou et al., 2015; Soden et al., 2014; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014; Uctepe et al., 2022; Veale et al., 2022; Xiong et al., 2022).

La moyenne d'âge des patients est de 8 ans et il est important de noter que dans 74/76 cas, les mutations sont *de novo* et seulement 2/76, les mutations R583\* et L147\*, ont été identifiées comme héréditaire par la mère (Bar, Kuchenbuch, et al., 2020; Uctepe et al., 2022). Sur ces mutations, la totalité des patients présente un retard développemental avec des degrés de sévérité variés et dans 85% des cas, de l'activité épileptiforme pharmacorésistante (Veale et al., 2022). Le type d'activité épileptiforme décrit est variable sur un spectre allant de crises d'épilepsie multifocales ou généralisées, d'absence, de spasmes infantiles ou des pointes-ondes lentes pendant le sommeil. Puisque les symptômes cliniques sont divers selon les mutations, peu de généralités peuvent être faites, néanmoins les mutations affectant la partie C-ter des sous-unités Kv2.1 semblent être entraîner moins de cas d'activité épileptiforme (de Kovel et al., 2017).

Il n'existe pas de traitement aux encéphalopathies liées aux mutations du gène *Kcnc1* et comme dans la grande majorité des cas d'EE/DEE, les traitements consistent à gérer les activités épileptiformes par des médicaments antiépileptiques pour contrôler les crises et diverses thérapies pour traiter les problèmes de développement et de comportement.

## II. B. 2. Les modèles animaux

Comme mentionné précédemment, chaque mutation peut entraîner un phénotype différent. La littérature se compose donc de plusieurs études sur chacune des mutations, généralement sous forme d'expression de variants dans des systèmes hétérologues ou dans des neurones murins. Ces études cherchent à mettre en avant des modifications dans la localisation ou le courant porté par les canaux Kv2.1 mutés (Calhoun et al., 2017; Kang et al., 2019; Saitsu et al., 2015; Thiffault et al., 2015; Torkamani et al., 2014; Veale et al., 2022). Puisque les mutations sont rares et leurs identifications récentes, les phénomènes pathologiques à l'échelle du réseau ne font pas l'objet d'une recherche active. Cependant quelques types de modèle d'organismes entiers existent et sont étudiés dans la recherche de traitement.

Dans une étude de 2014, un modèle de souris KO Kv2.1 a été généré pour réaliser la première caractérisation complète des phénotypes comportementaux et neurologiques de souris chez lesquelles le Kv2.1 est supprimé. Les souris KO présentent des caractéristiques normales sans perte de vision ou de coordination motrice et sans anomalie structurelle du cerveau. L'étude des courants électrophysiologiques *ex vivo* montrent une diminution du courant  $I_{Kdr}$ , une hyperexcitabilité et une activité épileptiforme en réponse à des convulsivants ou des stimulations électriques. Les souris KO Kv2.1 sont hyperactives, présentent des défauts d'apprentissage spatial lors de tests dans le labyrinthe aquatique de Morris et sont moins anxieuses dans un labyrinthe plus surélevé. De façon importante, les souris KO Kv2.1 sont hypersensibles aux effets des convulsivants mais ne sont pas sujettes à des crises spontanées. Bien que reproduisant une perte totale du Kv2.1, ce modèle permet d'envisager l'effet de la perte du courant  $I_{Kdr}$  d'une mutation perte de fonction sur un modèle d'organisme entier (Specia et al., 2014).

Le premier modèle induisant une variation du Kv2.1 est introduit par une étude de 2020 avec le mutant G379R, identifié chez un nourrisson souffrant de spasmes épileptiques et de crises atoniques, focales et tonico-cloniques réfractaires au traitement par les médicaments antiépileptiques standards. D'autres études se sont intéressées à l'impact de ce variant sur la conductance du voltage dans des cellules hétérologues (Kang et al., 2019). En utilisant la technologie CRISPR/Cas9, les auteurs de l'étude ont pu créer une lignée de souris hétérozygotes et homozygotes portant la mutation G379R. Ces souris présentent une hyperactivité profonde, des comportements répétitifs, une impulsivité et une anxiété réduite. Les deux modèles sont plus sensibles aux convulsivants et des crises spontanées ont été observées chez les souris homozygotes pour le variant. De plus, les deux modèles murins présentent une activité EEG interictale anormale, notamment des pointes isolées et des ondes lentes. Dans l'ensemble, ces deux modèles



récapitulent de nombreuses caractéristiques observées chez les personnes atteintes d'une EE/DEE due à des variants du gène *Kcnb1* (Hawkins et al., 2021).

Sur la même lancée, une variante récurrente plus fréquemment identifiée, la mutation R306C a également été exprimée dans un modèle murin. Cette mutation faux-sens située dans le domaine S4 induit chez les patients des retards de développement légers à sévères, des troubles du comportement et un spectre diversifié de crises d'épilepsie. Une caractérisation *in vitro* antérieure du variant R306C a décrit un phénotype perte de fonction dominant-négatif avec une sélectivité ionique altérée (Torkamani et al., 2014). Comme précédemment, en utilisant l'édition génétique CRISPR/Cas9, un modèle de souris hétérozygotes et homozygotes portant la mutation R306C a été généré. Ces souris présentent une hyperactivité prononcée, une sensibilité altérée aux crises induites par convulsivants, et de fréquentes et longues séries de décharges d'ondes de pointes sur l'EEG (Kang et al., 2023).

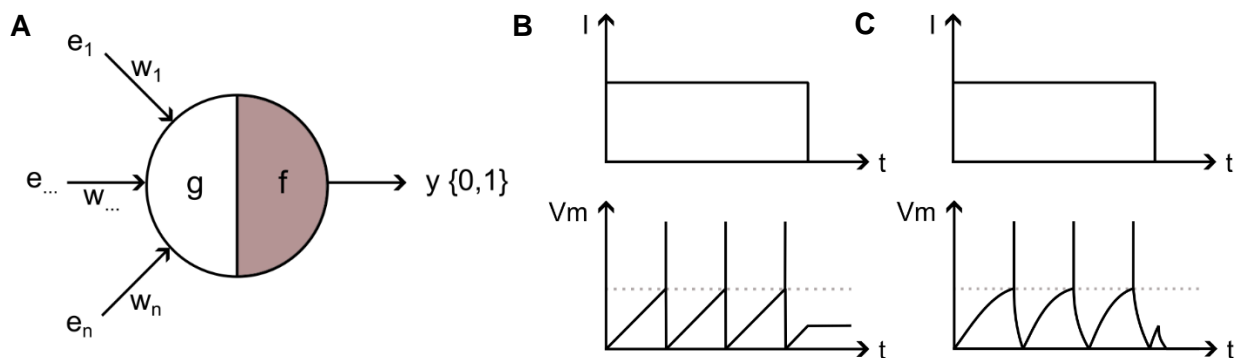
Encore en cours, une dernière étude utilise le modèle poisson-zèbre, *Danio rerio*, en raison de la relative facilitée de manipulation génétique, de son développement rapide et de sa petite taille qui se prête aux méthodes de criblage à haut débit. Dans ce modèle il existe un orthologue de *Kcnb1* chez le poisson zèbre qui partage 67% d'homologie avec le *Kcnb1* humain. L'étude du *Kcnb1* chez le poisson-zèbre est d'ailleurs déjà utilisée sur l'altération du développement de l'oreille interne dans ce même modèle (Jedrychowska et al., 2021). En utilisant ce modèle l'étude en cours cherche à décrire le phénotype comportemental associé à la perte de fonction de *Kcnb1* chez le poisson-zèbre en développement, en recherchant des caractéristiques phénotypiques pertinentes de l'encéphalopathie KCNB1. La génération de ces différents modèles de poisson-zèbre rendra les approches thérapeutiques plus facilement mises en œuvre par criblage à haut débit (Bar Maillet, 2021).

### III. L'utilisation de modèle *in silico* en neurosciences

Les modèles *in vivo* ou *in vitro* sont des modèles complexes sujets à une grande variabilité et certaines contraintes expérimentales. En revanche, les modèles informatiques sont de plus en plus populaires d'une part pour tenter d'améliorer les performances d'un système, voire de les rapprocher de celles d'un cerveau et d'autre part dans l'étude des régulations fines au niveau d'un neurone unique et de l'implication du changement d'excitabilité au niveau d'un réseau (L. S. Smith, 2006).

Lors de l'étude approfondie d'un acteur de l'excitabilité neuronale tel que le Kv2.1, la diversité biologique peut créer des difficultés d'analyses empêchant d'identifier les paramètres importants. L'utilisation d'un modèle permet de faire face à cette diversité, notamment en modifiant paramètre par paramètre, par exemple la conductance ou le  $V_{1/2}$  dans le cas d'un canal voltage dépendant, et d'attribuer tout changement dans le modèle à des phénomènes précis.

#### III. A. Les premiers modèles de neurones *in silico*



**Figure 13.** Schéma des premiers modèles neuronaux.

**(A)** Premier modèle de neurone artificiel de McCulloch-Pitts. Ce modèle simple peut intégrer plusieurs entrées  $e$ , chacune liée à un poids  $w$ , pouvant correspondre aux entrées synaptiques d'un neurone au niveau des dendrites. Après sommation des entrées, le modèle répond de façon à produire une réponse binaire  $y$ .

**(B)** Réponse d'un modèle « integrate-and-fire » à une simulation d'injection de courant. Le  $V_m$  augmente de façon linéaire et progressive à l'injection de courant jusqu'à atteindre un seuil et déclencher un PA. A l'arrêt de la stimulation, le  $V_m$  reste constant.

**(C)** Réponse d'un modèle « leaky integrate-and-fire » à une simulation d'injection de courant. L'ajout d'une fuite dans le modèle rend l'augmentation et la diminution du  $V_m$  non linéaire et à l'arrêt de la stimulation, le  $V_m$  reste revient à 0.

Le premier modèle neuronal aussi appelé neurone formel voit le jour en 1943 par McCulloch et Pitts. Le modèle McCulloch-Pitts pose les bases de l'étude du traitement de l'information neuronale à l'aide d'une approche mathématique et logique. Le modèle est divisé en deux parties : la première partie,  $g$ , reçoit des entrées binaires,  $e_n$ , et la seconde partie,  $f$ , et produit une sortie binaire,  $y$ , basée sur un seuil prédéfini. Les entrées du modèle peuvent être considérées comme des signaux reçus d'autres neurones. Chaque entrée se voit attribuer un poids,  $w_n$ , qui représente la force ou l'importance de cette entrée dans l'influence de la sortie du neurone. Les poids peuvent être positifs, négatifs ou nuls. En appliquant ce principe, une synapse excitatrice à un poids  $w > 0$  et une synapse inhibitrice à un poids  $w < 0$ . Le modèle utilise une valeur seuil, qui détermine le niveau d'activation du neurone. Si la somme pondérée des entrées dépasse le seuil, le neurone se déclenche et produit une sortie de 1 ; dans le cas contraire, il reste inactif et produit une sortie de 0 (Figure 13A) (McCulloch & Pitts, 1943; L. S. Smith, 2006). Le neurone de McCulloch-Pitts a longtemps été critiqué pour sa simplification excessive, à cause de l'absence de dynamique temporelle et car il n'utilise que le poids pour représenter la force de la connexion entre deux neurones. Cependant son faible coût computationnel a ouvert la voie à des développements ultérieurs dans le domaine des réseaux neuronaux (beim Graben & Wright, 2011; H. Yu et al., 2023). Ce modèle a inspiré plusieurs autres modèles plus complexes, notamment au perceptron, modèle de neurone formel évolutif (L. S. Smith, 2006). Le perceptron constitue un algorithme d'apprentissage profond en utilisant la loi de Hebb « cells that fire together, wire together » (Hebb, 1950). Franck Rosenblatt introduit le perceptron en 1957 par un premier modèle utilisant trois couches de perceptrons : S, A et R assemblées pour reproduire la perception d'un cerveau par des neurones. Ces couches sont couplées en série par des connexions « synaptiques ». S est la couche sensorielle, A contient des « cellules » de détection des caractéristiques, et R contient des « cellules de reconnaissance » (Van Der Malsburg, 1986). Le modèle est capable de déterminer les données d'entrée en deux catégories possibles, par exemple : vrai/faux, droite/gauche ou chien/chat. Le perceptron fait une prédiction et s'il y a erreur, le modèle s'adapte pour faire une prédiction plus éclairée la prochaine fois. Il devient de plus en plus précis au fil des itérations (Kanal, 2003).

Un deuxième type de modèle générant des PA voit le jour, rajoutant plus de complexité aux modèles neuronaux. Dans son étude pionnière de 1907, Lapique présentait un modèle de nerf qu'il comparait aux données obtenues par stimulation des nerfs froids. Ce modèle, basé sur un simple circuit de condensateur, servira de base aux modèles ultérieurs de la membrane (Brunel & van Rossum, 2007). C'est Knight, en reprenant le modèle de membrane de Lapique, qui introduit le terme de modèle de neurone « integrate-and-fire » en 1972 (Knight, 1972). Ce modèle

repose sur l'idée qu'un neurone intègre les signaux électriques entrants au fil du temps et génère un pic de sortie lorsque le  $V_m$  atteint un certain seuil. La membrane plasmique des neurones est représentée par un condensateur qui accumule des charges au fur et à mesure de l'intégration des entrées, augmentant ainsi le  $V_m$  du modèle (Figure 13B) (L. S. Smith, 2006):

$$I = C_m \frac{dV_m}{dt}$$

Lorsque qu'un seuil défini est atteint, le modèle considère qu'un PA stéréotype est généré et le  $V_m$  revient à son potentiel de repos. Le modèle utilise le fait que les PA d'un neurone ont toujours à peu près la même forme. Si la forme d'un PA est toujours la même, elle ne peut pas être utilisée pour transmettre de l'information, celle-ci est plutôt contenue dans la présence ou l'absence d'un pic. Les PA sont donc réduits à des « événements » qui se produisent à un moment précis dans le temps (Gerstner et al., 2014). Le principal inconvénient de ce type de modèle survient lorsque les entrées ne sont pas suffisantes pour déclencher un PA, le  $V_m$  reste alors constant de façon indéfinie ce qui n'est pas réaliste. Pour y remédier une variante de ce modèle a été créé en rajoutant une résistance  $R_m$  qui dissipe une partie du courant (Figure 13C) (Gabbiani & Cox, 2010; L. S. Smith, 2006) :

$$I = C_m \frac{dV_m}{dt} + \frac{V_m}{R_m}$$

De façon générale, les modèles « integrate-and-fire » ou « leaky integrate-and-fire » sont des modèles simples permettant de représenter des neurones générant des PA lorsque les processus qui sous-tendent ces derniers ne sont pas pertinents. Ce sont donc de bons modèles unitaires dans les réseaux neuronaux pour réduire le coût en ressources computationnelles (Gabbiani & Cox, 2010).

D'abord créé dans une optique d'élucider les mécanismes liés à la communication neuronale, les modèles se sont par la suite complexifiés au cours du temps pour répondre à des réponses plus appliquées liées aux modifications d'excitabilité et/ou d'intégration dans un réseau.

### *III. B. Un modèle biophysique basé sur les équations de Hodgkin et Huxley*

Dans une recherche de rendre les modèles plus proches de la réalité biologique, les modèles dits biophysiques ont été développés. Ceux-ci prennent en compte les différents types de canaux étudiés, leurs conductances, leurs localisations différentielles dans les neurones ainsi que la présence de synapses et leurs distributions. La morphologie est aussi prise en compte, souvent basée sur des images d'immunohistochimie de neurones en culture ou en tissu.

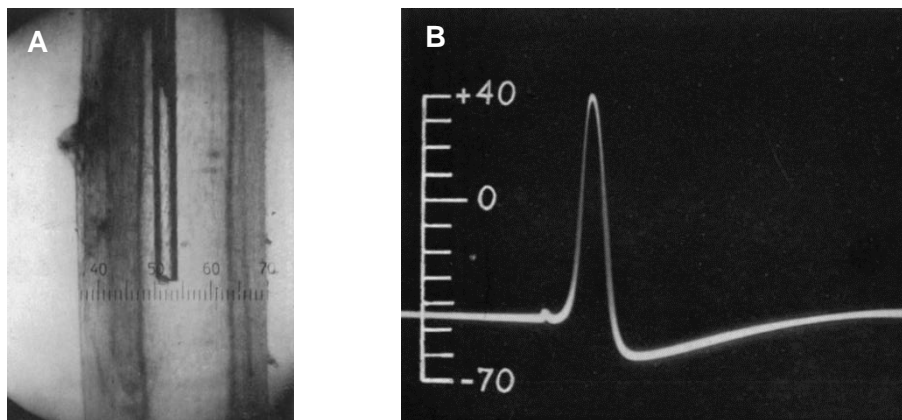
Ces modèles ont pour but d'étudier l'intégration synaptique mais aussi les mécanismes de génération de PA. Ce sont des modèles plus coûteux en ressources computationnelles dû à leur complexité et niveau de détail.

### III. B. 1. Hodgkin-Huxley-Eccles : le prix Nobel de Physiologie/Médecine 1963

Les cinq articles publiés par Hodgkin et Huxley en 1952 dans *The Journal of Physiology* sont des ouvrages fondamentaux dans le domaine de la physiologie, qui leur ont valu de partager le prix Nobel avec Eccles en 1963 (Hodgkin et al., 1952; Hodgkin & Huxley, 1952b, 1952c, 1952d, 1952a). Sont également considérés comme importants deux articles publiés à la même période, rédigés en collaboration avec Bernard Katz (Hodgkin & Katz, 1949) et Richard Keynes (Hodgkin & Keynes, 1955). Le premier sert d'introduction logique à la série de publications de 1952, et le second fournit une conclusion appropriée. L'objectif des expériences de Hodgkin et Huxley était de comprendre les changements de perméabilité de la membrane de l'axone, puisque la littérature de l'époque indiquait que le mouvement transmembranaire des ions était à l'origine du PA (Hopper et al., 2022). Les données expérimentales issues de ces articles notamment sur les conductances dépendantes du voltage dans l'axone géant du calmar, *Loligo pealei*, et l'établissement du modèle appelé Hodgkin-Huxley (HH) posent les bases conceptuelles à trois échelles d'études : (1) au niveau moléculaire avec l'explication des propriétés structurales et fonctionnelles des canaux ioniques y compris les mécanismes de perméation, de sélectivité et de fermeture des ions, (2) au niveau cellulaire avec la génération de PA, les conditions qui contrôlent le moment de l'apparition du potentiel d'action, y compris les périodes seuil et réfractaire et enfin (3) au niveau du circuit par les prédictions du modèle HH sur lequel est basé des modèles neuronaux biophysiques (Catterall et al., 2012).

Pour enregistrer la différence de potentiel à travers la membrane, Hodgkin et Huxley s'inspirant des premières expériences d'électrophysiologie, ont inséré une fine électrode capillaire à l'intérieur de la fibre nerveuse (Figure 14A) (Häusser, 2000; Hodgkin & Huxley, 1939). Les expériences reposaient sur plusieurs paradigmes. Pour déterminer l'importance des ions à la membrane, ils ont estimé que chaque ion semblait se déplacer passivement le long de son gradient électrochimique, de sorte que des arguments thermodynamiques pouvaient être utilisés pour prédire si le mouvement net d'un ion serait dirigé vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la membrane à un  $V_m$  donné. Par exemple, les courants transportés par les ions  $\text{Na}^+$  devraient être entrants à des potentiels négatifs par rapport au potentiel d'équilibre,  $E_{\text{Na}^+}$ , et sortants à des potentiels positifs par rapport à  $E_{\text{Na}^+}$ . Si le  $V_m$  de la membrane est maintenu à  $E_{\text{Na}^+}$ , les ions  $\text{Na}^+$  ne devraient

pas contribuer au courant membranaire observé, et si le courant s'inverse autour de  $E_{Na^+}$ , il est probablement transporté par des ions  $Na^+$ . La même logique peut être appliquée au ions  $K^+$  (Hodgkin & Huxley, 1939). Puis des ions peuvent être ajoutés, substitués ou enlevés des solutions extracellulaires. Enfin, la modification de la concentration d'ions  $Na^+$  ou  $K^+$  dans l'eau de mer dans laquelle baignait l'axone devait révéler à quelle composante du potentiel d'action ces ions contribuaient (Hodgkin & Huxley, 1952c). Ces expériences ont fourni les premiers enregistrements de PA intracellulaire et les explications électrophysiologiques de la génération de PA (Figure 14B). Ils ont également été capable d'enregistrer les courants sodique et potassique suivant un changement de  $V_m$  et subséquemment déterminer les conductances de chaque flux ionique (Brown, 2020).



**Figure 14.** Enregistrement intracellulaire d'un PA dans l'axone de calmar géant.  
**(A)** Photographie d'une électrode à l'intérieur d'un axone géant de calmar d'un diamètre  $\approx 500 \mu m$  (Hodgkin & Huxley, 1945).  
**(B)** Le premier enregistrement intracellulaire d'un PA. Le marqueur temporel de l'onde sinusoïdale a une fréquence de 500 Hz soit 2 msec (Hodgkin & Huxley, 1945).

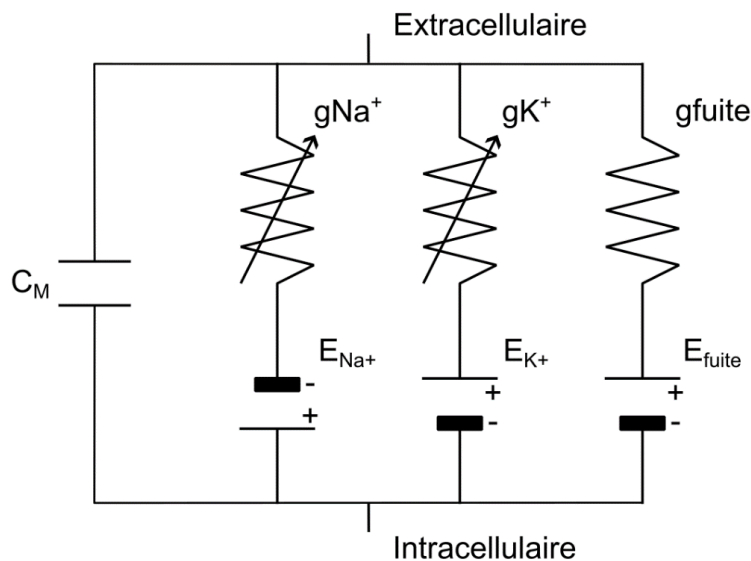
Le point culminant de la collaboration entre Hodgkin et Huxley a été la publication de leur modèle mathématique décrivant les changements de perméabilité qui se produisent dans la membrane excitable lors d'un PA. Il s'agissait non seulement de la première description quantitative de l'excitabilité électrique dans les cellules nerveuses, mais aussi de corrélats physiques qui prédisaient les mécanismes théoriques d'ouverture et de fermeture des canaux ioniques (Hodgkin & Huxley, 1952a).

### III. B. 2. Les équations de Hodgkin-Huxley

#### III. B. 2. a. Le postulat théorique

Les modèles basés sur les équations de HH font intervenir les conductances de différents canaux ioniques, permettant de représenter les propriétés électriques de la membrane des cellules sous la forme d'un circuit électrique (Hodgkin & Huxley, 1952a).

En modélisation computationnelle, la membrane plasmique représente une séparation entre deux milieux, intra- et extracellulaire, empêchant l'échange de charge, elle agit donc comme un condensateur où les charges peuvent s'accumuler de part et d'autre de la bicouche lipidique (Hille, 1985). Dans un modèle basique, seuls trois types de conductances ont été prises en compte pour expliquer la décharge des neurones : (1) une conductance de fuite invariable et responsable du  $V_m$  de repos, (2) une conductance potassique et (3) une conductance sodique, ces deux dernières variables en fonction du  $V_m$  et responsables de la génération des PA. Puisque la concentration en ions dans le milieu intra- et extracellulaire est différente, les courants portés par les flux ioniques dont le sens est déterminé par l'équation de Nernst, sont représentés par une résistance (variable pour le sodium et le potassium) et le potentiel d'inversion par une batterie (Figure 15) (Hodgkin & Huxley, 1952a).



**Figure 15.** Représentation d'un modèle biophysique basé sur les équations HH. Dans un modèle basé sur les équations HH, la membrane est représentée comme un condensateur,  $C_M$ , accumulant les charges de part et d'autre de la bicouche lipidique et les canaux sont représentés par des résistances et des batteries. Dans un modèle

basique sont considérées les conductances sodique, potassiques et de fuite. Adapté de (Hodgkin & Huxley, 1952a).

A l'injection d'un courant de stimulation,  $I_{stim}$ , dans le neurone, la conservation de charge implique que le courant est divisé entre un courant capacitif qui charge le condensateur et les courants portés par les ions qui passent au travers des canaux selon l'équation :

$$I_{stim} = Cm \frac{dVm}{dt} + I_{ions}$$

Dans cette équation, le facteur  $Cm \frac{dVm}{dt}$  correspond au courant capacitif qui est proportionnel à la taille du condensateur et à la variation de voltage. Dans un modèle classique, le courant ionique ( $I_{ions}$ ) est la somme des courants sodique, potassique et de fuite (Figure 15). Selon la loi d'Ohm, on peut décrire le courant porté par un ion comme :

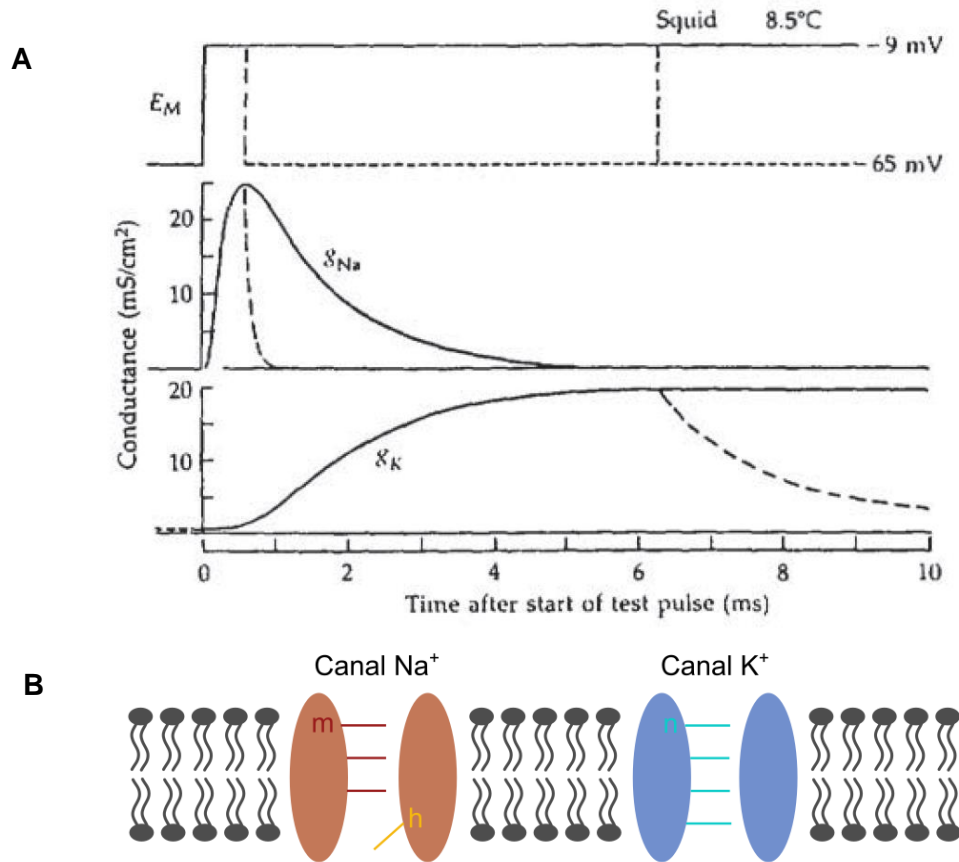
$$I_{ion} = g (Vm - E_{ion})$$

Le  $I_{ions}$  peut donc être décrit comme :

$$I_{ions} = g_{maxNa+} (Vm - E_{Na+}) + g_{maxK+} (Vm - E_{K+}) + g_{maxleak} (Vm - E_{leak})$$



III. B. 2. b. L'importance de la cinétique des canaux



**Figure 16.** Schéma des portes des canaux voltages dépendants.

**(A)** Décours des conductances sodique  $g_{Na+}$  et potassique  $g_{K+}$ , lors d'une dépolarisation de -65 mV à -9 mV (panel du haut, le  $V_m$  est noté  $E_M$  ici). Les lignes pointillées montrent le décours lors d'une repolarisation à -65 mV à 0.63 pour la conductance sodique (panel central) ou 6,3 msec pour la conductance potassique (panel du bas). Adapté de (Hille, 1985).

**(B)** Les enregistrements intracellulaires de PA mènent Hodgkin et Huxley à considérer le nombre de charges nécessaires pour ouvrir les canaux sodique et potassique voltages dépendants. Les bases moléculaires et structurales du fonctionnement des canaux voltages dépendants n'étant pas encore élucidées à cette époque, Hodgkin et Huxley propose ce concept en utilisant une comparaison à des particules ou des portes bloquant le passage des ions, dont la probabilité d'ouverture change avec le  $V_m$ .

L'équation proposée par Hodgkin et Huxley est légèrement différente de cette théorie. En effet, se basant sur leurs enregistrements intracellulaires, notamment sur la forme des courbes de conductances selon le voltage (Figure 16A), ils proposent que les canaux voltage dépendants

peuvent être considérés comme des tunnels fermés par des portes. Pour qu'un canal puisse laisser passer des ions, chaque porte doit être ouverte. Les portes s'ouvriraient de façon indépendante les unes des autres et aléatoirement mais la probabilité d'ouverture  $\alpha$  dépend du  $V_m$ . Ces portes sont classées en deux catégories, les portes d'activation dont la probabilité d'ouverture augmente avec la dépolarisation et les portes d'inactivation dont la probabilité d'ouverture décroît avec la dépolarisation (Hodgkin & Huxley, 1952a).

Leurs données expérimentales sont en adéquation avec un modèle de canal sodique comportant trois portes d'activations ( $m$ ) capables de s'ouvrir rapidement avec la dépolarisation et une porte d'inactivation ( $h$ ) répondant plus lentement au changement de  $V_m$ . Dans le cas d'un canal potassique, les quatre portes d'activation présumées ( $n$ ) répondraient lentement à la dépolarisation (Figure 16B). Le nombre de porte défini dans chaque cas est lié au nombre de particules chargées devant se déplacer pour l'ouverture des canaux et le passage des ions lors de l'activation ou l'inactivation (Hodgkin & Huxley, 1952a).

La conductance macroscopique d'un canal est déterminée par la proportion de canaux, c'est-à-dire la conductance d'un seul canal et le nombre total de canaux de ce type, dans la membrane. Pour les canaux potassiques et sodiques, la conductance peut être définie comme (Hille, 1985; Hodgkin & Huxley, 1952a) :

$$g_{max K^+} = n^4 g_{K^+}$$

$$g_{max Na^+} = m^3 h g_{Na^+}$$

Pour un canal sodique, au  $V_m$  de repos, la porte  $h$  est ouverte mais pas les portes  $m$  donc les ions ne peuvent pas passer. Lorsque la membrane des neurones se dépolarise, les portes  $m$  s'ouvrent rapidement ce qui permet au flux d'ions de  $Na^+$  de traverser la membrane. Puis la porte  $h$  se ferme, le canal est dans un état inactivé. A la repolarisation de la membrane, les portes  $m$  se ferment. Si une dépolarisation survient après, ces portes  $m$  peuvent se rouvrir ce qui n'est pas le cas de la porte  $h$  qui reste fermée, c'est la période réfractaire absolue. Enfin lorsque la membrane est suffisamment repolarisée, les portes  $m$  se ferment et après un certain temps, la porte  $h$  se réouvre, le canal est revenu à son état de repos. Dans le cas d'un canal potassique, lorsque la membrane se dépolarise les quatre portes  $n$  s'ouvrent de façon plus lente que les portes  $m$  des canaux sodiques. Les portes  $n$  restent ouvertes tant que la membrane est dépolarisée et se referment lentement lors de la repolarisation. La cinétique lente de fermeture induit un flux d'ion continu après le PA conduisant une hyperpolarisation responsable de la période réfractaire absolue (Brown, 2020).

Les équations de HH se décrivent donc de la façon suivante (Hodgkin & Huxley, 1952a) :

$$I = g_{Na^+} m^3 h (Vm - E_{Na^+}) + g_{K^+} n^4 (Vm - E_{K^+}) + g_{leak} (Vm - E_{leak}) + Cm \frac{dVm}{dt}$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n$$

### III. C. Les modèles biophysique de Hodgkin-Huxley en pratique

Les modèles biophysiques basés sur les résultats de Hodgkin et Huxley, sont capables à partir des équations de HH de modéliser le comportement d'ouverture des canaux sodiques et potassiques ainsi que la réponse de la membrane lors de ces ouvertures. Cependant, pour obtenir un niveau de précision supérieur et le plus proche de la réalité biologique, il est également nécessaire de prendre en compte, la probabilité des canaux à être en conformation ouverte et leur cinétique à atteindre cette conformation. Ces paramètres sont introduits dans la modélisation par des équations supplémentaires utilisant des données électrophysiologiques obtenues par expérimentation. De la même manière, les études de Hodgkin et Huxley sur l'axone de calmar ont été réalisées en maintenant la température de l'échantillon à 4°C (Hodgkin & Huxley, 1952a). Or, la température est un facteur important à prendre en compte et est incorporée dans le modèle via ces équations supplémentaires (Ranjan et al., 2019).

#### III. C. 1. Modéliser l'ouverture des canaux et leur cinétique

Dans le modèle de HH, l'ouverture des portes est aléatoire mais leur probabilité d'ouverture  $\alpha$  est dépendante du voltage. Il est considéré qu' $\alpha$  est le nombre de fois par seconde où la porte est dans un état ouvert et à l'inverse,  $\beta$ , la probabilité de fermeture correspond au nombre de fois par seconde où la porte est dans un état fermé (Borg-Graham, 1989; Brown, 2020; Hodgkin & Huxley, 1952a) :

$$\begin{array}{c} \alpha \\ \text{fermé} \rightleftharpoons \text{ouvert} \\ \beta \end{array}$$

En considérant,  $P$  comme la proportion de portes ouvertes qui varie entre 0 et 1,  $(1 - P)$  va donc correspondre à la proportion de portes fermées :

$$\text{fraction d'ouverture} = \alpha (1 - P)$$

$$\text{fraction de fermeture} = \beta P$$

A l'équilibre, le système peut s'écrire :

$$\alpha (1 - P_\infty) = \beta P_\infty$$

$$P_\infty = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

Lorsque le  $V_m$  varie, les probabilités d'ouverture  $\alpha$  et  $\beta$  changent, donc la fraction  $P$  de portes ouvertes aussi. Si la porte ou particule a une charge négative,  $\alpha$  doit augmenter et  $\beta$  doit diminuer lorsque la membrane est dépolarisée. Il est important de considérer que le changement de la valeur  $P$  n'est pas instantané et dépend de la différence entre la fraction d'ouverture et la fraction de fermeture (Hodgkin & Huxley, 1952a) :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha(1 - P) - \beta P$$

La solution à cette équation différentielle est :

$$P = P_\infty - (P_\infty - P_{start}) e^{-\frac{t}{\tau}}$$

avec :

$$\tau = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

En simplifiant ces équations, il est possible d'exprimer  $\alpha$  et  $\beta$ , selon  $P_\infty$  et  $\tau$  :

$$\alpha = \frac{P_\infty}{\tau}$$

$$\beta = \frac{1 - P_\infty}{\tau}$$

Une relation simple peut être établie entre  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $P_\infty$  et  $\tau$ , la constante de temps nécessaire à  $P$  pour atteindre l'équilibre.

Or, lorsque les modèles biophysiques se complexifient pour s'approcher de la réalité biologique, et le cas simpliste de HH ne suffit pas. Dans les années 1870, Boltzmann a proposé une équation basée sur la notion d'atomes et de molécules et définissant la probabilité de trouver une molécule dans un état donné. Si l'on suppose qu'un canal, activé par une dépolarisation, peut se trouver dans deux états, fermé et ouvert, la probabilité de le trouver à l'état ouvert est dérivée de l'équation de Boltzmann (Dubois et al., 2009) :

$$P_\infty = \frac{1}{1 + e^{\frac{-zF}{RT} \left( V_m - V_{\frac{1}{2}} \right)}}$$

À l'état d'équilibre, la conductance d'une population de canaux est une fonction sigmoïde du potentiel de membrane avec un point d'inflexion correspondant au potentiel  $V_{1/2}$  où  $g = \frac{g_{max}}{2}$ . En d'autres termes, la conductance est décrite par l'équation :

$$\frac{g}{g_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2}}{k}}}$$

où  $k$  est un facteur de pente égal à :

$$k = \frac{zF}{RT}$$

Ce sont ces équations qui sont utilisées dans les modélisations biophysique actuelles. Ces équations sont à ajuster, notamment le  $V_{1/2}$ , avec des données expérimentales obtenues par de expériences d'électrophysiologie ou publiées dans la littérature (Dr. Astrid Prinz, 2018).

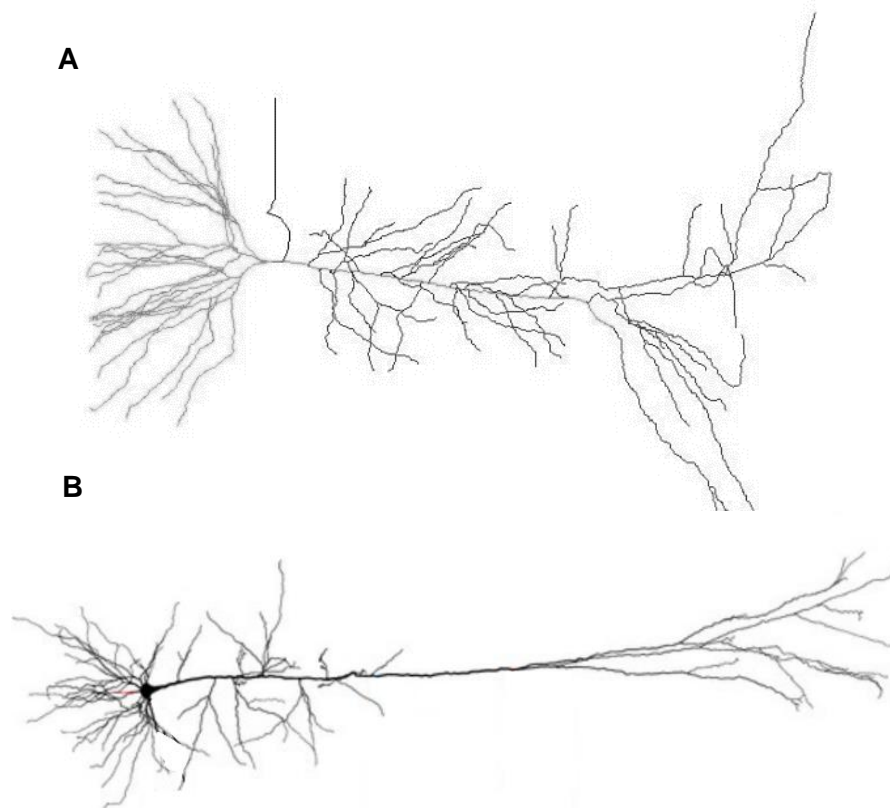
### III. C. 2. Choisir son modèle

La modélisation computationnelle permet de simuler et d'étudier divers phénomènes, explorant ainsi le fossé entre la théorie et les observations expérimentales. Cependant, avec un large éventail de modèles informatiques disponibles, sélectionner celui qui convient le mieux à un projet peut s'avérer une tâche difficile.

Depuis les débuts de la modélisation computationnelle neuronale, de nombreux modèles ont vu le jour cherchant à élucider des mécanismes différents. Forte de plus de 1800 modèles, ModelDB est une base de données dédiées constituant une plateforme de stockage et d'échange de modèles utilisés en neurosciences computationnelles ayant fait l'objet d'une publication (ModelDB : [ModelDB: Home \(yale.edu\)](http://ModelDB: Home (yale.edu))). L'utilisation d'un modèle se fait de façon générale en adaptant un modèle préexistant aux processus biologique étudiés.

Dans la plupart des modèles biophysiques, une des premières caractéristiques à considérer est la morphologie du modèle (Borg-Graham, 1989). La morphologie des modèles dépend des besoins expérimentaux et du niveau de détails liés aux objectifs expérimentaux. La variété de morphologie va de la plus grande simplification, où le neurone est représenté par une sphère à la représentation détaillée obtenue par traçage d'un neurone véritable, en passant par des modèles intermédiaires avec le soma et un (modèle « ball and stick ») ou plusieurs prolongements représentant dendrites et axone. Lorsque le modèle contient plusieurs compartiments, chacun est représenté par un segment, approximé à un circuit électrique comme décrit précédemment (Figure 15). Il existe alors une continuité entre chaque segment et leur organisation spatiale est

capitale dans la transmission des courants modélisés. La plupart des modèles détaillés sont donc basés sur des expériences de marquage de neurone dont le but est de reconstruire la morphologie. A partir de ces données il est alors possible de construire un modèle dont les différents segments s'enchainent imitant la continuité des neurones réels (Figure 17). Dans ce cas, la longueur des dendrites peut être prise en compte, ainsi que leur arborisation. Il est alors aisé de créer plusieurs points de stimulation que ce soit une modélisation d'injection de courant ou d'entrées synaptiques ainsi que l'enregistrement du Vm à différents points du modèle (Herz et al., 2006). Le site NeuroMorpho.org représente un inventaire de reconstructions morphologiques de neurones et de cellules gliales (NeuroMorpho.org : [NeuroMorpho.Org - a centrally curated inventory of digitally reconstructed neurons and glia](https://neuroMorpho.org/)). Il contient des contributions de plus de 900 laboratoires internationaux.



**Figure 17.** Schémas exemples de morphologie de modèles biophysiques.

La plupart des modèles biophysiques sont basés sur l'arborisation réelle de cellules identifiées ce qui permet un détail de modélisation plus important. La répartition des dendrites peut imiter l'arborisation dendritique d'un neurone pyramidal de CA1 (**A**) ou du cortex (**B**). La majeure différence morphologique entre ces deux modèles est la disposition des dendrites et l'arborisation de ces dernières. Adapté de (Combe et al., 2018; Galloni et al., 2020).

Une autre caractéristique principale à prendre en compte lors du choix du modèle est le type et le nombre de conductance exprimé dans chaque segment. Alors que le modèle d'HH ne prend en compte qu'une conductance sodique, potassique et de fuite, l'avancée des travaux d'électrophysiologie a permis d'identifier depuis les différents acteurs, notamment les différents canaux responsables de l'excitabilité et de la transmission de l'information dans les neurones et de les positionner dans des compartiments particuliers. Pour modéliser au plus près la réalité biologique, il est donc possible d'inclure plus de conductances dans les différents segments. Cette expression différentielle des conductances dans les segments permet alors de modéliser les gradients d'expression des canaux voltages dépendants dans la cellule selon les données d'expression membranaire réalisées sur des échantillons biologiques. Comme discuter précédemment, pour chaque type de conductance, les données expérimentales ou tirées de la littérature peuvent être utilisées pour indiquer la cinétique de chaque canal inséré dans le modèle (Achard & Schutter, 2006).

Le dernier point essentiel avant de s'engager avec un modèle neuronal est la validation des performances. Il s'agit d'évaluer dans quelle mesure le modèle reproduit des résultats expérimentaux en adéquation avec les propriétés physiologique connues. Dès lors qu'un modèle passe cette étape de validation, il peut être utilisé pour réaliser des prédictions du phénomène étudié de façon plus robuste (Almog & Korngreen, 2016).

Depuis quelques années, des outils d'optimisation de modèles à partir de données expérimentales ont été proposés. Peut être cité, BluePyOpt, une bibliothèque Python qui utilise un algorithme qui fait « évoluer » le modèle pour que sa réponse aux stimulations approche au plus près les données expérimentales (BluePyOpt : [BluePyOpt - Tools - EBRAINS](#)) (Van Geit et al., 2016).

### III. C. 2. Avantages et limitations

De façon paradoxale, un point important à soulever ici est que le réalisme morphologique et biophysique qui font des modèles biophysiques un outil puissant, peuvent également représenter un inconvénient majeur. En effet, un modèle très détaillé peut fournir une représentation plus précise des processus biologiques, mais peut être très exigeant sur le plan informatique et nécessiter un réglage approfondi des paramètres. L'optimisation des paramètres, notamment dans les calculs complexes nécessaires à modéliser les réponses des canaux ioniques, lors de la phase de validation du modèle requiert de nombreux efforts et un temps considérable pour que le modèle puisse s'aligner aux données électrophysiologiques (Achard & Schutter, 2006; Prinz et

al., 2003). Le coût informatique important de ce type de modèle le rend peu utilisable dans l'incorporation de simulation de réseaux comprenant plusieurs modèles de neurones (Almog & Korngreen, 2016; Poirazi & Pissadaki, 2010).

Une erreur à ne pas commettre suite à l'ajustement des paramètres est l'extrapolation des résultats donnés par un modèle. Bien que les modèles biophysiques sont généralement ajustés par l'expérimentateur aux données d'électrophysiologie passées, l'expérimentateur doit garder en tête que les résultats émis par le modèle sont des prédictions et doit faire attention à ne pas surinterpréter les phénomènes locaux ou transitoires mis en évidence (Achard & Schutter, 2006; D. H. Johnson & Cook, 2013).

De nombreux processus à l'échelle du neurone restent pour le moment inexplicables dû aux limitations des techniques actuelles. Une question intéressante serait par exemple, quels détails des conductances ioniques et de la morphologie sont pertinents pour la dynamique spécifique à un type de cellule donnée ou comment cette dynamique contribue-t-elle au traitement de l'information par le neurone ? La question de comment sont intégrés les entrées synaptiques au niveau des dendrites peut aussi être pertinente. Or dans ce dernier cas la structure et le diamètre des dendrites rend l'expérimentation dans ces compartiments limitée. En revanche, les modèles biophysiques détaillés peuvent être utilisés pour simuler des entrées synaptiques comme cela serait le cas *in vivo* ou la modification d'une conductance spécifique dans un modèle peut permettre d'explorer son impact sur la dynamique des neurones (Herz et al., 2006; Poirazi & Pissadaki, 2010).

Un travail intéressant réalisé récemment par Goillard et Marder, met en lumière le concept de « degeneracy » des canaux ioniques et l'implication dans les propriétés intrinsèques des neurones. Il est expliqué que plusieurs combinaisons de canaux ioniques peuvent donner la même signature électrophysiologique. En parallèle, les données de séquençage d'ARN montrent que le niveau d'expression de canaux est variable d'un neurone à l'autre (Goillard & Marder, 2021). Un modèle représente donc une seule possibilité parmi plusieurs autres. Pour pallier à ce problème, une nouvelle approche basée un algorithme évolutif permet d'optimiser un modèle computationnel. Le résultat consiste alors en une population de modèles, chacun exprimant une légère variation dans les paramètres des canaux modélisés, de façon à reproduire la variabilité biologique.

De nombreux types de modèles existent à différentes échelles et adressent des questions biologiques différentes. Cette pluralité sur différentes échelles permet de dénouer des questionnements au niveau d'un compartiment comme l'axone, au niveau de la cellule entière comme



décrit précédemment, au niveau d'un réseau local ou bien même au niveau de l'entièreté du cerveau (Herz et al., 2006; Nowotny et al., 2022).

## IV. Rationnel du projet

Les canaux Kv2.1 dont la fonction de conduction des ions  $K^+$  lors de la repolarisation du PA, indique un rôle dans le contrôle de l'excitabilité lors de décharges à hautes fréquences. Ces canaux sont singuliers par leur patron d'expression membranaire sous forme de clusters et leur localisation restrictive dans le compartiment somato-dendritique proximal et le segment initial de l'axone. Bien que les processus de régulation des clusters soient de plus en plus étudiés, le lien entre cette expression particulière et la fonction des canaux Kv2.1 n'est que peu considéré. De plus les canaux Kv2.1 semblent être impliqués dans une variété de rôles non canoniques dont la majorité repose sur cette expression membranaire particulière. Les mutations de *Kcnc1*, le gène codant pour Kv2.1, sont associées à un dysfonctionnement cérébral généralisé, combinant crises épileptiques avec des troubles moteurs et cognitifs catégorisés comme des encéphalopathies épileptiques. Plusieurs mutations non caractérisées du point de vue fonctionnel ciblent l'extrémité C-ter de la sous-unité Kv2.1, donnent des protéines tronquées dépourvues du domaine PRC responsable de la formation des clusters. Les patients portant ces mutations n'ont pas forcément de troubles épileptiques mais présentent des retards cognitifs et troubles autistiques. Le lien causal entre ces mutations et les troubles observés demeure inconnu car les fonctions du canal sont encore mal connues.

Au cours de ma thèse l'objectif a été de comprendre comment le Kv2.1 peut être impliqué dans l'excitabilité neuronale en caractérisant deux mutations qui supposément altère la localisation et le clustering :

- La mutation non-sens Y533\*, identifiée *de novo* chez un homme de 32 ans atteint de crises d'épilepsie.
- Les mutations non-sens R583\* identifiées *de novo* dans la majorité des cas mais également identifiée dans un cas héréditaire, chez des patients de 8 à 12 ans atteint ou pas de crises d'épilepsie.

Par une première approche, j'ai utilisé des méthodes d'imagerie telles que la microscopie d'épifluorescence conventionnelle ou confocale, de super-résolution, et le suivi de particules uniques pour déterminer si la localisation des canaux formés par les sous-unités mutées et leur dynamique latérale, est différente des canaux non mutés. J'ai ensuite voulu mettre en évidence des changements dans la fonctionnalité des canaux en utilisant l'électrophysiologie et l'imagerie calcique. Finalement, la dernière approche pour élucider l'impact de la modification des propriétés de conductance ou de dépendance au voltage du Kv2.1 dans l'excitabilité neuronale, a été l'utilisation d'un modèle computationnel biophysique d'un neurone pyramidal de CA1 permettant de

s'approcher des phénomènes dendritiques dans lesquels le Kv2.1 a été proposé comme étant impliqué.

Ce travail a pour objectif final de constituer une première caractérisation des deux mutations Y533\* et R583\*, de proposer un raisonnement sur l'implication du Kv2.1 dans l'excitabilité neuronale et subséquemment poser des hypothèses quant à la génération des encéphalopathies épileptiques dans ces cas précis.



# VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été exposés lors de congrès internationaux suivants :

- Paupiah AL, Russeau M, Renner M (2022)  
**How Kv2.1 contributes to dendrite active properties?**  
13th FENS Forum of Neuroscience  
7 au 11 Juillet, Paris, France
- Paupiah AL, Russeau M, Renner M (2023)  
**How Kv2.1 contributes to dendrite active properties?**  
NeuroFrance 2023  
24 au 26 Mai, Lyon, France
- Paupiah AL, Renner M (2023)  
**Predicting the effects on dendrite active properties of wild type and mutated delayed-rectifier Kv2 channels**  
32nd Annual Computational Neuroscience Meeting (CNS\*2023)  
15 au 19 Juillet, Leipzig, Germany



# MATERIEL ET METHODES

## Culture neuronale

Toutes les procédures animales ont été effectuées conformément à la directive du Conseil de la Communauté européenne du 24 novembre 1986 (86/609/CEE), aux directives du ministère français de l'Agriculture et de la Direction départementale des services vétérinaires de Paris (École normale supérieure, Animalerie des Rongeurs, licence B 75-05-20), et ont été approuvées par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Charles Darwin (licence Ce5/2012/018). Tous les efforts ont été faits pour minimiser la souffrance animale et réduire le nombre d'animaux utilisés. Les cultures primaires de neurones hippocampiques ont été préparées comme décrit précédemment (Chamma et al., 2013) avec quelques modifications du protocole.

Brièvement, les hippocampes ont été disséqués à partir de rats Sprague-Dawley de 18 ou 19 jours embryonnaires des deux sexes. Le tissu a ensuite été trypsinisé (0,25% v/v ; ThermoFisher Scientific, Etats-Unis d'Amérique) et dissocié mécaniquement dans du HBSS (1X ; Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France) contenant de l'HEPES (10 mM ; Invitrogen). Les neurones ont étéensemencés à une densité de  $120 \times 10^3$  cellules/ml sur des lamelles de verre de 18 mm de diamètre (Assistent ; Winigor, Allemagne) pré-enduites de poly-DL-ornithine (50 µg/ml ; Sigma-Aldrich) dans un milieu composé de Milieu Minimum Essentiel (MEM ; Sigma-Aldrich ; Lyon, France) complété par du sérum de cheval (10% v/v ; Invitrogen), de L-glutamine (2 mM ; Invitrogen) et de pyruvate Na<sup>+</sup> (1 mM ; Invitrogen). Après fixation pendant 3-4 h, les cellules ont été incubées dans un milieu de culture composé de Neurobasal (ThermoFisher) supplémenté en B27 (1X ; Invitrogen), L-glutamine (2 mM ; Invitrogen) et antibiotiques (pénicilline 200 unités/ml et streptomycine 200 µg/ml ; Invitrogen) jusqu'à 4 semaines à 37 °C dans un incubateur humidifié à 5% de CO<sub>2</sub>. Chaque semaine, un tiers du volume du milieu de culture a été renouvelé.

## Transfection neuronale et constructions ADN

Les transfections ont été réalisées à jours 9-10 DIV (« Day In Vitro ») à l'aide du réactif TransFectin (BioRad ; France) selon les instructions du fabricant (ratio ADN:TransFectin de 1 µg:3 µl), avec 1 à 1,2 µg d'ADN plasmidique par puits de 20 mm. Kv2.1WT-GFP et Kv2.1WT-tomato ont été dérivés de rKv2.1WT-GFPHis, aimablement fourni par J. R. Martens (Université de Floride, Etats-Unis d'Amérique). Kv2.1Y533\*-GFP, Kv2.1R583\*-GFP, Kv2.1Y533\*-tomato et

Kv2.1R583\*-tomato ont été dérivés de Kv2.1WT-GFP et Kv2.1WT-tomato par mutagenèse dirigée. Homer-DsRed est un don de D. Choquet et GCaMP6f, CheRiff et a1m ont été gracieusement fournis par A. Triller.

Les expériences ont été réalisées entre 21 et 27 DIV.

## Pharmacologie

Pour moduler l'activité des neurones, les drogues suivantes ont été utilisées : gabazine (gbz ; 10  $\mu$ M ; HelloBio ; Princeton, Etats-Unis d'Amérique) et TTX (1  $\mu$ M ; HelloBio), diluées dans un milieu contenant du glucose (30 mM ; Sigma-Aldrich), NaCl (130 mM ; Sigma-Aldrich), HEPES (10 mM ; Invitrogen), KCl (5 mM ; Sigma-Aldrich), CaCl<sub>2</sub> (2 mM ; Sigma-Aldrich), MgCl<sub>2</sub> (1 mM ; Sigma-Aldrich) dans de l'eau stérile pour un pH de 7,45.

## Immunocytochimie

### *Expression de surface - confocal*

Pour la détection de surface de Kv2.1WT-, Kv2.1Y533\*- et Kv2.1R583\*-GFP, les neurones vivants ont été incubés pendant 10 mins à 37°C avec des nanocorps d'alpaca anti-GFP couplés au fluorochrome AlexaFluor647 (GFP-Booster 647 ; 1/100 ; Proteintech ; Sankt Leon-Rot, Allemagne) dilués dans le milieu de culture, suivi de deux lavages dans du PBS 1X. Les neurones ont ensuite été fixés pendant 10 mins à -20°C dans du méthanol (100%) et lavés dans du PBS 1X.

### *Marquage du Kv2.1 non muté - épifluorescence*

Pour la détection des canaux Kv2.1 non mutés, les neurones ont été fixés pendant 15 mins dans du paraformaldéhyde (PFA, 4% w/v ; Sigma-Aldrich) enrichi de sucrose (4% w/v ; Sigma-Aldrich) et lavés dans du PBS 1X. Après perméabilisation par du Triton X100 (0,25% v/v ; Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS 1X pendant 4 mins, les neurones ont été incubés dans une solution bloquante (PBS enrichi de sérum de chèvre, PBS-GS, 3% v/v ; Invitrogen) pendant 30 mins. Par la suite, les neurones ont été incubés 1 heure avec des anticorps primaires anti-Kv2.1 produits chez le lapin (1/200 ; Alomone Labs ; Jerusalem, Israël) dilués dans du PBS-GS (3%). Les neurones sont



ensuite incubés avec des anticorps secondaires anti-lapin produit chez l'âne couplés au fluorochrome AlexaFluor647 (1/250 ; Jackson Immunoresearch ; West Grove, Etats-Unis d'Amérique) dilués dans du PBS-GS (3%) pendant 45 mins avant lavages au PBS 1X. Toutes ces étapes se sont déroulées à température ambiante.

#### *Marquage du Kv2.1 après modification de l'activité - épifluorescence*

Après traitement pharmacologique, les neurones ont été fixés pendant 15 mins dans du PFA et lavés dans du PBS 1X. Après perméabilisation par du Triton X100 (0,25%) pendant 4 mins, les neurones ont été incubés dans du PBS-GS (3%) pendant 30 mins puis 1 heure avec des anticorps primaires anti-Kv2.1 produits chez le lapin (1/200) et primaires anti-GAD67 produits chez la souris (1/200 ; Sigma-Aldrich) dilués dans du PBS-GS (3%). Les neurones sont ensuite incubés avec des anticorps secondaires anti-lapin produit chez l'âne couplés au fluorochrome Cy3 (1/250 ; Jackson Immunoresearch) et anti-souris produits chez l'âne couplés au fluorochrome AlexaFluor647 (1/250 ; Jackson Immunoresearch) dilués dans du PBS-GS (3%) pendant 45 mins avant lavages au PBS 1X. Toutes ces étapes se sont déroulées à température ambiante.

#### *Marquage de l'internalisation du Kv2.1 - épifluorescence*

Après traitement pharmacologique, pour la détection du Kv2.1WT-, Kv2.1Y533\*- et Kv2.1R583\*-GFP, les neurones ont été incubés 10 minutes à 37°C avec des GFP-Booster 647 (1/100) dilués dans le milieu de culture, suivi de deux lavages au PBS 1X. Les neurones ont ensuite été fixés pendant 15 mins à température ambiante dans du PFA et lavés dans du PBS 1X.

#### *Colocalisation avec les récepteurs à la ryanodine - confocal*

Pour la détection du Kv2.1WT-, Kv2.1Y533\*- et Kv2.1R583\*-GFP en colocalisation avec les récepteurs à la ryanodine, les neurones ont été incubés 10 mins à 37°C avec des nanocorps d'alpaca anti-GFP couplés au fluorochrome AlexaFluor 488 (GFP-Booster 488 ; 1/100 ; Proteintech) dilués dans le milieu de culture, suivi de deux lavages dans du PBS 1X. Les neurones ont ensuite été fixés pendant 10 mins -20°C dans du méthanol à 100% et lavés dans du PBS 1X.

Après perméabilisation par du Triton X100 (0,25%) pendant 4 mins, les neurones ont été incubés avec une solution de sodium citrate (50 mM ; pH 6 ; Sigma-Aldrich) pendant 10 mins. Les neurones ont été incubés dans une solution de PBS-GS (3%) pendant 30 mins puis pendant 1 heure

avec des anticorps primaires dirigés contre les récepteurs à la ryanodine (RyR ; 1/200 ; Abcam ; Cambridge, Royaume-Uni) dilués dans du PBS-GS (3%). Après lavage au PBS 1X, les neurones sont ensuite incubés avec des anticorps secondaires anti-souris produits chez l'âne, couplés au fluorochrome AlexaFluor647 (1/250) dilués dans du PBS-GS (3%) puis lavés au PBS 1X. Ces étapes se sont déroulées à température ambiante.

#### *Colocalisation avec les récepteurs à la ryanodine - STORM*

Pour la détection du Kv2.1WT-, Kv2.1Y533\*- et Kv2.1R583\*-GFP, les neurones ont été incubés 10 mins à 37°C avec des GFP-Booster 647 (1/200) dilués dans le milieu de culture, suivi de deux lavages dans du PBS 1X. Les neurones ont ensuite été fixés pendant 10 mins à -20°C dans du méthanol (100%) et lavés dans du PBS 1X.

Après perméabilisation par du Triton X100 (0,25%) pendant 4 mins, les neurones ont été incubés avec une solution de sodium citrate (50 mM) pendant 10 mins. Les neurones ont ensuite été incubés dans une solution de PBS-GS (10%) pendant 30 mins puis pendant 1 heure avec des anticorps primaires dirigés contre les récepteurs à la ryanodine (1/200) dilués dans du PBS-GS (10%) puis lavés dans du PBS 1X. Les neurones sont ensuite incubés avec des anticorps secondaires anti-souris produits chez l'âne, couplés au fluorochrome CF568 (1/250 ; Sigma-Aldrich) dilués dans du PBS-GS (10%) puis lavés dans du PBS 1X. Ces étapes se sont déroulées à température ambiante.

<b>Protocole</b>	<b>Méthode de fixation</b>	<b>Anticorps primaire</b>	<b>Anticorps secondaire</b>	<b>Blocage</b>	<b>Sodium citrate</b>
Expression de surface - confocal	Méthanol -20 °C	GFP-Booster 647 (1/100)	x	PBS-GS 3%	x
Marquage du Kv2.1 non muté - épifluorescence	PFA Température ambiante	Anti-Kv2.1 lapin (1/200)	Anti-lapin 647 (1/250)	PBS-GS 3%	x
Marquage du Kv2.1 après modification de l'activité - épifluorescence	PFA Température ambiante	Anti-Kv2.1 lapin (1/200) Anti-GAD67 souris (1/200)	Anti-lapin Cy3 (1/250) Anti-souris 647 (1/250)	PBS-GS 3%	x
Marquage de l'internalisation du Kv2.1 – épifluorescence	PFA Température ambiante	GFP-Booster 647 (1/100)	x	PBS-GS 3%	x
Colocalisation avec RyR - confocal	Méthanol -20 °C	GFP-Booster 488 (1/100) Anti-RyR souris (1/200)	Anti-souris 647 (1/250)	PBS-GS 3%	oui
Colocalisation avec RyR - STORM	Méthanol -20 °C	GFP-Booster 647 (1/200) Anti-RyR souris (1/200)	Anti-souris CF568 (1/250)	PBS-GS 10%	oui

Les lamelles sont montées sur des lames de verre à l'aide de Mowiol 4-88 (48 mg/mL ; Sigma-Aldrich) ou conservées dans du PBS 1X pour les acquisitions en microscopie de super-résolution. Les ensembles de neurones comparés pour la quantification ont été marqués simultanément.

## Acquisition des images

### *Epifluorescence*

Les images ont été acquises à l'aide d'un objectif à immersion dans l'huile 63X (NA 1,40) monté sur un microscope à épifluorescence droit DM6000 (Leica ; Nussloch, Allemagne) équipé d'une caméra EMCCD refroidie de 12 bits (Micromax ; Roper Scientific ; Evry, France) fonctionnant avec le logiciel MetaMorph (Roper Scientific).

### *Confocal*

Les images ont été acquises sur un microscope confocal droit TCS SP5 (Leica) en utilisant un objectif à immersion dans l'huile 100X (NA 1.32) avec un grossissement optique 1.5X et un laser Ar/Kr réglé à 561, 488 et 633 nm pour l'excitation du HOMER-dsRed, de la GFP et de l'AlexaFluor647 respectivement. Des piles de sections optiques de 3 à 9  $\mu\text{m}$  ont été acquises à une résolution de 1024 x 1024 pixels avec un pas z de 0,25  $\mu\text{m}$ .

### *Super-résolution*

L'imagerie de super-résolution a été réalisée sur un microscope inversé N-STORM Eclipse Ti (Nikon ; Melville, Etats-Unis d'Amérique) avec un objectif à immersion dans l'huile 100X (NA 1,49) et une caméra Andor EMCCD iXon Ultra 897 (taille du pixel 105 nm), en utilisant des lasers spécifiques pour l'imagerie STORM de double couleur CF568 (405 et 561 nm) et AlexaFluor647 (640 nm). Lors de l'acquisition, les images AlexaFluor647 ont d'abord été acquises sans réactivation des fluorochromes par le laser 405 nm puis les images CF568 ont été acquises de façon standard.

Les échantillons ont été imagés dans un tampon capteur d'oxygène à base de PBS contenant un tampon d'imagerie (Tris 100 mM, NaCl 20 mM ; pH 8), glucose (40% w/v ; Sigma-Aldrich), PBS 1X, chlorhydrate de cystéamine (MEA ; Sigma-Aldrich), catalase (5 mg/mL ; Sigma-Aldrich) et pyranose oxydase (200 unités/mL ; Sigma-Aldrich). La catalase a été diluée dans MgCl (4 mM),

EGTA (2 mM) et PIPES (24 mM ; pH 6,8 ; Sigma-Aldrich). La pyranose oxydase a été diluée dans le même tampon complété par du glycérol (50% ; v/v). Des vidéos de 30 000 images ont été acquises à une fréquence de 20 msec. La position z a été conservée pendant l'acquisition par un système Nikon Perfect Focus.

## Analyse d'images

Les temps d'exposition de chaque fluorophore ont été ajustés afin d'obtenir le meilleur rapport fluorescence/bruit et d'éviter la saturation des pixels. Ces temps d'exposition sont restés inchangés d'un échantillon à l'autre et d'une condition à l'autre. Les régions d'intérêts (ROI) ont été définies sur les corps cellulaires ou sur les dendrites en utilisant le marquage HOMER-dsRed. Pour les dendrites, les ROI ont été réalisés aux localisations : proximal, intermédiaire et distal, placées à ~50, ~100 et ~150  $\mu\text{m}$  du soma respectivement, en utilisant les outils fournis par le logiciel d'analyse Fiji Image. La fluorescence moyenne a été quantifiée dans chaque ROI, divisée par la moyenne du ROI proximal pour la normalisation.

### *Immunofluorescence en champ large*

Pour l'analyse de clustering, l'arrière-plan a été atténué à l'aide de l'outil *Subtract Background* dans Fiji. L'arrière-plan résiduel a été soustrait sur l'ensemble de l'image avant d'appliquer un seuil d'intensité pour la segmentation. Les images segmentées ont été utilisées comme masque pour récupérer les valeurs totales de fluorescence dans l'image originale et pour extraire l'aire des clusters, en utilisant des routines personnalisées dans Matlab.

### *Immunofluorescence en confocal*

Pour les images de microscopie confocale, les projections maximales des stacks ont été réalisées avant de dessiner les ROI.

Pour l'analyse de clustering, l'arrière-plan a été atténué à l'aide de l'outil *Subtract Background* dans Fiji. L'arrière-plan résiduel a été soustrait sur l'ensemble de l'image avant d'appliquer un seuil d'intensité pour la segmentation. Les images segmentées ont été utilisées comme masque pour récupérer les valeurs totales de fluorescence dans l'image originale et pour extraire l'aire des clusters, en utilisant des routines personnalisées dans Matlab.

Pour la colocalisation entre les clusters de Kv2.1 et les récepteurs à la ryanodine, le plugin DiAna de ImageJ a été utilisé (Gilles et al., 2017) sur les images de microscopie confocale. Brièvement, les corps cellulaires des neurones sont délimités comme ROI puis les stacks sont segmentés à l'aide d'un seuil d'intensité de pixel de façon à identifier les objets correspondant aux clusters de Kv2.1 ou de RyR en 3D. La colocalisation est ensuite calculée en se basant sur la distance des volumes entre objets pour chaque cluster de Kv2.1 en contact ou superposé à au moins un cluster de RyR.

### *Immunofluorescence en super résolution*

La localisation des coordonnées moléculaires et la reconstruction d'images 2D ont été réalisées comme décrit dans Specht et al., 2013 en ajustant la PSF aux fluorophores séparés dans l'espace à une distribution gaussienne 2D. Les pics mal localisés ( $R^2$  d'ajustement  $< 0,7$ ) n'ont pas été inclus pour la suite de l'analyse. La dérive de la platine a été corrigée en utilisant des billes fluorescentes multicolores de 100 nm (TetraSpeck ; 1/300 ; Invitrogen) pour suivre le mouvement à travers les images et a été annulé en superposant les localisations de chaque image. Les images reconstruites ont été obtenues en superposant les coordonnées des détections de molécules uniques, à des courbes gaussiennes 2D d'intensité unitaire et des écarts-types représentant la précision de la localisation (Baddeley et al., 2010).

Toutes les analyses de données ont été effectuées à l'aide de *Diinamic* ([GitHub - mlrennerfr/Diinamic: Clustering analysis on single-molecule localization microscopy data](#)), un logiciel personnalisé développé dans le laboratoire (Paupiah et al., 2023). La détection des clusters a été effectuée sur des ROI dessinées sur des images pointillistes construites à partir des coordonnées des détections. Les détections ont d'abord été triées en fonction de leur localisation par rapport à un masque de segmentation pour déterminer si elles appartenaient ou non à des clusters candidats. Ce masque a été créé par seuillage de l'intensité des pixels de l'image reconstruites correspondante. Les frontières des clusters ont été définies par la fonction *boundary* de Matlab. Les clusters candidats ont été retenus si 1) leur densités, calculées par pixel, dépassaient un seuil ; 2) leurs tailles étaient comprises entre des seuils donnés (minimum et maximum). Les seuils ont été choisis en tenant compte du nombre attendu de détections par molécule, de la taille de la molécule et de la taille attendue des clusters compte tenu d'autres données de microscopie déjà publiées.

Ce travail fait l'objet de l'annexe.

## Biochimie

Après traitement pharmacologique, les cellules ont été lysées mécaniquement sur glace dans un tampon de lyse contenant : Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%), DOC (0.5%), SDS (0.5%), EDTA (1 mM), NaF (50 mM) et Triton X100 (1%) dans de l'eau MilliQ (Merck). Les échantillons ont été centrifugés à 16 000g à 4°C pendant 10 mins et le surnageant a été recueilli. La quantification des protéines a été effectuée à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific ; Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique).

Les protéines ont été dénaturées dans un tampon de LDS 1X (NuPAGE LDS Sample Buffer ; ThermoFisher) et  $\beta$ -mercaptoéthanol 1X (NuPAGE Sample Reducing Agent ; ThermoFisher) à 90°C pendant 5 mins. Après homogénéisation, les protéines sont soumises à une électrophorèse à raison de 20  $\mu$ g par échantillon sur des gels de polyacrylamide (NuPAGE Bis-Tris 4-12% ; ThermoFisher) dans un tampon de migration (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer ; ThermoFisher) puis transférées sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare) dans un tampon de transfert (NuPAGE Transfer Buffer ; ThermoFisher). Les poids moléculaires ont été indiqués par un marqueur de poids moléculaire (Novex Sharp Pre-Stained ; 5  $\mu$ L ; ThermoFisher). Les membranes ont été rincées avec une solution TBS-tween (TBST ; Invitrogen) et bloquées avec du TBST enrichi de lait écrémé à 5% (w/v). Les membranes ont ensuite été soumises à un marquage avec des anticorps primaires anti-Kv2.1 produit chez le lapin (1/250 ; Invitrogen) et anti-Tuj1 produit chez la souris (1/3000 ; R&D Systems ; Minneapolis, Etats-Unis d'Amérique) dilués dans du TBST enrichi de lait écrémé à 5% (w/v) pendant une nuit à 4 °C.

Les membranes ont ensuite été lavées trois fois avec de l'eau distillée puis incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin IRDye 800 produit chez la chèvre (1/3000 ; LI-COR ; Lincoln, Etats-Unis d'Amérique) et anti-souris IRDye 700 produit chez la chèvre (1/3000 ; LI-COR) dilués dans du TBST enrichi de lait écrémé à 1% (w/v) pendant une heure à température ambiante. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois avec du TBST et une fois avec du TBS.

La fluorescence a été détectée et les intensités relatives des bandes de l'immunoblot ont été déterminées à l'aide du système d'imagerie infrarouge Odyssey (LI-COR).

Les graphiques linéaires des intensités de fluorescence ont été réalisés grâce à la fonction « Plot Profile » du logiciel Fiji.

## Suivi de particules uniques

Pour suivre les Kv2.1 membranaires liés à la GFP, des quantum dots (QD) ont été pré-couplés à des anticorps primaires de lapin anti-GFP (Roche ; Basel, Suisse) comme indiqué précédemment (Renner et al., 2017). a1m a été suivi par des QD couplés à un anticorps monoclonal anti-myc (Roche). Brièvement, des QDs marqués F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-lapin émettant à 655 nm (Q11422MP ; Invitrogen) ont d'abord été incubés avec l'anticorps pendant 30 min dans du PBS, puis bloqués pendant 15 min avec de la caséine (10X v/v ; Sigma-Aldrich) dans un volume final de 10 µL à température ambiante. Les neurones ont ensuite été incubés avec les QDs pré-couplés (1/6000-1/10000) pendant 5 min à 37°C.

Les cellules ont été imagées à l'aide d'un microscope inversé Olympus IX71 équipé d'un objectif à immersion d'huile 60X (NA 1,42 ; Olympus ; Tokyo, Japon) et d'une lampe X-Cite 120Q (Lumen Dynamics ; Waltham, Etats-Unis d'Amérique). Les images individuelles des enregistrements en temps réel de Kv2.1-GFP, Homer-DsRed et QD (temps d'intégration de 75 ms sur 1200 images consécutives) ont été acquises avec une caméra EMCCD Hamamatsu ImagEM et le logiciel MetaView (Meta Imaging 7.7).

Le suivi des QDs et la reconstruction des trajectoires ont été réalisés avec des routines Matlab comme décrit dans (Renner et al., 2017). Les trajectoires hors du neurone ou se croisant ont été supprimées. Dans le cas de neurones transfectés avec du Kv2.1WT-GFP, les trajectoires ont été séparées en suivant un masque créé avec ImageJ pour isoler les populations dans et hors clusters.

Le suivi a été effectué avec un logiciel maison (SPTrack\_v4) dans Matlab. Le centre des spots de fluorescence a été déterminé par un ajustement à une courbe gaussienne 2D. La résolution spatiale était de ~10-20 nm. Les taches dans une image donnée (point temporel) ont été associées aux trajectoires les plus probables estimées sur les images précédentes de la séquence d'images. Dans certaines expériences, les trajectoires ont été définies comme appartenant à un cluster si elles se trouvaient au-dessus de clusters définis par un masque binaire de fluorescence Kv2.1WT-GFP. Le déplacement quadratique moyen (*MSD*) a été calculé comme suit :

$$MSD(n dt) = (N - n)^{-1} \sum_{i=1}^{N-n} ((x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2)$$

où  $x_i$  et  $y_i$  sont les coordonnées d'un objet sur l'image  $i$ ,  $N$  est le nombre total d'étapes de la trajectoire,  $dt$  est l'intervalle de temps entre deux images successives,  $n$  est le nombre d'images et  $n dt$  est l'intervalle de temps sur lequel le déplacement est moyenné. Le coefficient de diffusion

$D$  a été calculé en ajustant les 2 à 5 premiers points du tracé de  $MSD$  en fonction du temps avec l'équation suivante :

$$MSD(t) = 4 D_{2-5} t + 4 \sigma_x^2$$

avec  $\sigma_x$  la précision de localisation du point (précision de position) dans une direction.

Le coefficient de compaction ( $Pc$ ) à chaque point temporel  $i$  a été calculé comme suit

$$Pc_i = \sum_i^{i+n-1} \frac{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}{S_i^2}$$

où  $x_i, y_i$  sont les coordonnées au temps  $i$ ;  $x_{i+1}, y_{i+1}$  sont les coordonnées au temps  $i+1$ ,  $n$  est la longueur de la fenêtre temporelle ( $n = 30$  points temporels) et  $S_i$  est la surface de la coque convexe du segment de trajectoire entre les points temporels  $i$  et  $i+n$ . Si a été calculée à l'aide de la fonction *convhull* de Matlab (Renner et al., 2017).

## Modélisation

Nous avons utilisé le modèle multi-compartimental du neurone pyramidal CA1 proposé par Combe et al., 2018 (ModelDB [244416](#)) avec quelques modifications. Le modèle original comprend un courant de fuite, deux courants  $Na^+$  rapides (somato-dendritique et axonal), un courant à rectification retardée (DR), deux courants  $K^+$  de type A (proximal et distal), un courant  $K^+$  de type M, un courant  $h$  à conductance mixte activé par hyperpolarisation, un courant  $Ca^{2+}$  de type T, un courant  $Ca^{2+}$  de type R, deux courants  $Ca^{2+}$  de type L (somatique et dendritique), un courant  $K^+$  lent dépendant du  $Ca^{2+}$  (SK) et un courant  $K^+$  dépendant du  $Ca^{2+}$  et du voltage (BK). Les courants de distribution ont suivi les données expérimentales rapportées, avec une densité plus élevée des conductances SK et BK dans les dendrites apicales de 50 à 200  $\mu m$  du soma, une densité plus élevée des canaux  $Ca^{2+}$  de type L à des distances  $> 50 \mu m$  du soma, et la densité des canaux  $Ca^{2+}$  de type T n'étant non nulle qu'à des distances  $> 100 \mu m$  du soma (Magee, 2016; Poirazi et al., 2003).

Pour modéliser spécifiquement les changements de conductance de Kv2, nous avons divisé la conductance DR originale en deux : 30 % de la valeur a été modélisée avec le modèle DR original, et 70 % ( $g_{kdr2}$ ) modélisée avec un algorithme modifié prenant en compte l'inactivation induite par la température rapportée par Ranjan et coll. ([Channelpedia \(epfl.ch\)](#), Ranjan et al., 2019).

Nous avons ensuite modifié systématiquement la conductance ( $g_{kdr2}$ ) et la dépendance au voltage des courants médiés par Kv2. La morphologie correspondait à la cellule Pc2b (Megías et al., 2001), qui possède 144 compartiments. La capacité spécifique était de 1,5  $\mu F/cm^2$  dans le soma



et la dendrite apicale. La résistivité axiale et membranaire a été maintenue constante dans les dendrites apicales. La stimulation synaptique a été modélisée en incluant 45 synapses excitatrices, contenant des récepteurs AMPA et NMDA (Combe et al., 2018), dans les dendrites obliques apicales connectées à la dendrite apicale principale entre 250 et 450  $\mu\text{m}$  du soma.

## Imagerie calcique

Le milieu d'imagerie est composé de contenant du glucose (30 mM ; Sigma-Aldrich), NaCl (130 mM ; Sigma-Aldrich), HEPES (10 mM ; Invitrogen), KCl (5 mM ; Sigma-Aldrich),  $\text{CaCl}_2$  (2 mM ; Sigma-Aldrich),  $\text{MgCl}_2$  (1 mM ; Sigma-Aldrich) dans de l'eau stérile pour un pH de 7,45.

### *Libération de glutamate et GCaMP6f*

Des cultures primaires d'hippocampe ont été transfectées avec la sonde GCaMP6f codée génétiquement ainsi que Kv2.1WT- Y533\*- ou R583\*-tomato. Les acquisitions ont été réalisées sur un microscope inversé Eclipse Ti (Nikon) avec un objectif à immersion d'huile 100X (NA 1,49), une caméra Andor EMCCD iXon et des lasers (405 nm et 561nm ; Coherent, Santa Clara, Etats-Unis d'Amérique). Les enregistrements ont été effectués en continu à 43,5 Hz.

Les cellules ont été stimulées par libération de glutamate 4-méthoxy-7-nitroindoliny (MNI)-cagé, ajouté préalablement au milieu, avec un laser 405 nm défocalisé pour illuminer l'ensemble de l'arborescence dendritique. Dans une première série d'expériences, la libération a été effectuée après 46 s pour observer l'activité spontanée avant la stimulation (durée totale de l'enregistrement, 57,5 s). Ensuite, la puissance du laser 405 a été réglée pour produire des transitoires de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ordre des transitoires spontanés. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons évalué le photoblanchiment induit par le laser 405 et l'imagerie continue de la sonde GCaMP6f. Les cellules ont d'abord été stimulées tout en étant imagées dans des conditions de contrôle, en suivant la séquence suivante : imagerie de la ligne de base de la fluorescence GCaMP6f pendant 500 images (11,5 s), libération du glutamate, imagerie de la sonde GCaMP6f pendant 1000 images (23 s). Ensuite, le GxTx (100nM ; Alomone Labs) a été ajouté au milieu. 10 minutes plus tard, une deuxième séquence de stimulation et d'imagerie identique à la première a été réalisée. Les valeurs moyennes de fluorescence ont été calculées dans des ROI à différentes positions sur une dendrite (typiquement avant la première bifurcation ou à  $\sim 20 \mu\text{m}$  du soma, puis à  $\sim 40$  et

~60 µm du soma) à l'aide du logiciel d'imagerie Fiji. Les réponses à la stimulation ont été exprimées en tant que changements relatifs de la fluorescence au repos provoqués par le stimulus, comme suit :

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_{max} - F_0}{F_0}$$

où  $F_{max}$  est l'intensité maximale de fluorescence et  $F_0$  l'intensité de départ (intensité moyenne de ~10-20 images enregistrées avant le stimulus). À partir des transitoires normalisés a été extraite la largeur à mi-hauteur (FWHM). Comme la décroissance n'était pas nécessairement mono-exponentielle dans toutes les cellules, elle n'a pas été prise en compte.

### *CheRiff*

Des cultures primaires d'hippocampes ont été transfectées avec la channelrhodopsine CheRiff et les constructions Kv2.1WT- Y533\*- et R583\*-GFP. Les neurones transfectés ont été incubés avec la sonde calcique CaTM3 (BioTracker 609 Red Ca<sup>2+</sup> AM Dye ; Sigma-Aldrich) pendant au moins 45 minutes, puis avec des GFP-Booster 647 (1/100) pendant 10 minutes avant l'imagerie. Les acquisitions ont été réalisées sur un microscope inversé Eclipse Ti (Nikon) équipé d'un objectif à immersion d'huile 100X (NA 1.49) et d'une caméra Andor EMCCD Ultra. Des vidéos de 4518 images avec un échantillonnage de 4x4 pour un temps d'exposition de 8 ms ont été acquises avec le logiciel Nis-Elements (Nikon). Un laser de 561 nm pour imager la sonde calcique et une LED de 405 nm pour activer le CheRiff, ont été utilisés et positionnés de façon à éclairer au maximum le champ d'enregistrement de la caméra. Les cellules ont d'abord été stimulées tout en étant imagées dans des conditions de contrôle. La séquence de stimulation et d'imagerie a commencé par l'imagerie de la ligne de base de la fluorescence du CaTM3 pendant 500 images (4 s), puis la séquence suivante répétée trois fois : activation du laser pendant 6 images, imagerie du CaTM3 pendant 1000 images (durée totale de l'acquisition 36 s). Un délai de 10 minutes a été observé après l'ajout de GxTx (100 nM), puis une seconde séquence d'acquisition identique à la première a été réalisée.

Les mesures de l'intensité moyenne du corps cellulaire ont été obtenues à l'aide de Fiji, puis analysées à l'aide de routines créées spécifiquement sur Matlab. Les lignes de base ont d'abord été linéarisées et les images d'activation supprimées. Les transitoires calciques ont ensuite été identifiés et les traces ont été moyennées et analysées. À partir des transitoires normalisés, a été extraite l'amplitude maximale.

## Electrophysiologie

Les enregistrements somatiques de neurones pyramidaux cultivés ont été réalisés dans la configuration cellule entière par patch clamp, à l'aide de pipettes en verre borosilicaté de 4-5 M $\Omega$ . Les signaux ont été acquis avec un amplificateur Multiclamp 700B (Molecular Devices ; San Jose, Etats-Unis d'Amérique), filtrés à 10 kHz et numérisés à 20 kHz. Les cellules ont été maintenues à -70 mV. Tous les potentiels ont été corrigés *a posteriori* avec le potentiel de jonction liquide de 14,5 mV.

Les cultures neuronales ont été maintenues à 33°C dans un milieu contenant (en mM) : 120 NaCl, 20 D-glucose, 10 HEPES, 3 MgCl<sub>2</sub>, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub> à pH 7,4 avec des bloqueurs synaptiques (en mM) : 0,01 NBQX, 0,05 dAPV et 0,02 bicuculline. La solution interne contenait (en mM) : 120 K-Gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 0,1 EGTA, 4 MgATP, 0,4 Na<sub>3</sub>GTP (pH ajusté à 7,4 avec KOH). La résistance d'entrée (R<sub>in</sub>) a été déterminée en voltage-clamp selon la loi d'Ohm en mesurant le courant induit par un pas de -5 mV pendant 1000 ms. La valeur  $\tau$  a été déterminée dans la current-clamp en ajustant une fonction exponentielle à la réponse capacitive provoquée par l'injection de courant (-25 pA). En cas d'application de GxTx, les cellules ont d'abord été enregistrées dans des conditions de contrôle, puis les aliquotes de GxTx ont été rapidement décongelées avant utilisation et dilués dans l'ACSF avant l'application du bain.

Les courbes entrée-sortie ont été générées en traçant la fréquence de déclenchement en réponse à des injections de courant par pas de 25 pA allant de -25 à +475 pA (durée de 0,8 s). Toutes les propriétés des PA ont été déterminées à partir du premier PA déclenché à la rhéobase. Les changements dans les formes d'onde des PA ont été étudiés en générant des diagrammes de phase. Les diagrammes de phase ont été construits en traçant la dérivée temporelle du V<sub>m</sub> somatique (dV/dt) en fonction du V<sub>m</sub> somatique du premier PA.

Toutes les analyses ont été réalisées *a posteriori* avec des codes Matlab établis dans le laboratoire en utilisant des fonctions intégrées, Chronux ([Chronux Home](#)) et FMAToolbox ([FMAToolbox \(sourceforge.net\)](#)) (Goutierre et al., 2019).

## Analyse statistique

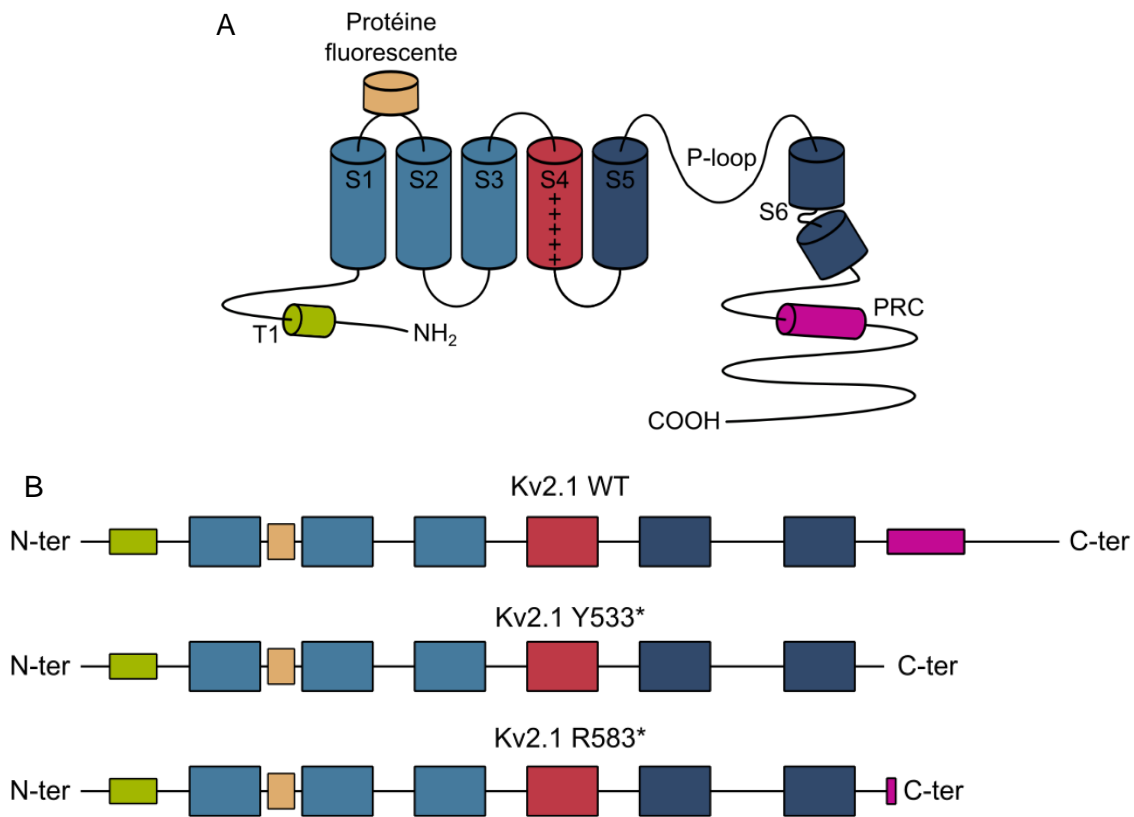
Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 9 (Dotmatics). Les tests appliqués sont détaillés dans les légendes. Les images ont été préparées à l'aide de Photoshop (Adobe Systems, USA).



# RESULTATS

## Avant-propos, contexte et hypothèses

Les canaux Kv2.1 sont proposés comme étant des régulateurs homéostatiques de l'excitabilité neuronale (P. W. Liu & Bean, 2014; Misonou, Mohapatra, & Trimmer, 2005). Une des caractéristiques particulières de ces canaux est la formation de clusters dans le compartiment somato-dendritique proximal dont certaines fonctions non canoniques seraient dépendantes (Cserép et al., 2020; Kirmiz et al., 2018). Des mutations causales à des encéphalopathies épileptiques ont été identifiées depuis ces dernières années (Bar, Barcia, et al., 2020; de Kovel et al., 2017) mais étant donné que la fonction des canaux est encore mal comprise, la relation causale entre ces mutations et les troubles observés reste incertaine. Une des questions qui peut alors être soulevée est la relation entre le patron d'expression de surface (clustering et restriction somato-dendritique) et la fonction des canaux Kv2.1.



**Figure 18.** Schémas des constructions utilisées.

**(A)** Ce travail utilise comme modèle des cultures primaires de neurones pyramidaux transfectés avec différentes constructions afin d'exprimer les Kv2.1 WT ou mutés. Les constructions utilisées contiennent une protéine fluorescente dans la boucle extracellulaire entre le segment S1 et S2. Cette protéine fluorescente peut-être une GFP, Dendra2 ou tomato.

**(B)** Les mutations Y533\* et R583\* introduisent un codon stop au niveau de la partie C-ter de la sous-unité Kv2.1. Il en résulte des sous-unités tronquées respectivement avant ou au début du domaine PRC.

Pour étudier le lien entre la localisation et la fonctionnalité du Kv2.1, je me suis concentrée sur deux mutations *de novo* de la sous-unité, Y533\* et R583\*, qui impactent la partie C-ter de la protéine. La protéine finale est alors tronquée et ne possède plus de domaine PRC impliqué dans le comportement de clustering des canaux Kv2.1. Découvertes chez des patients atteints d'encéphalopathie épileptique, ces mutations n'ont pas toujours de troubles épileptiques mais présentent des retards cognitifs et troubles autistiques. J'ai donc mené mon projet en utilisant différentes approches expérimentales sur un modèle de culture primaire de neurones pyramidaux dans lesquelles j'ai transfecté différentes constructions du Kv2.1 WT ou mutés. Puisque les mutations étudiées ici sont en grande majorité identifiées *de novo*, le choix de ce modèle biologique permet l'étude d'un mélange de populations de sous-unités Kv2.1 (endogènes ou transfectées WT ou mutés) comme cela est le cas chez les patients. Chaque construction porte une protéine fluorescente au niveau de la boucle extracellulaire entre le S1 et S2 (Figure 18).

Dans un premier temps, j'ai caractérisé l'expression de surface des mutations Y533\* et R583\* en utilisant diverses techniques de microscopie. Mes résultats en microscopie confocale ont mis en évidence l'expression des sous-unités mutantes sur l'entièreté de l'arbre dendritique mais l'hypothèse que ces sous-unités ne forment pas de clusters s'est révélée incorrecte puisque la microscopie de super-résolution a révélé la formation de clusters de petite taille. Ces premières données ont été renforcées par les expériences de suivi de particule unique où la diffusion latérale s'est révélée accrue. En m'appuyant sur le fait que les événements de stabilisation des trajectoires des sous-unités mutantes ne soient pas abolis, j'ai formulé l'hypothèse que les canaux mutés peuvent être formés en hétérotétramères avec des sous-unités non mutés. Cette hypothèse est renforcée par le marquage des sous-unités endogènes qui se retrouvent redistribuées vers les parties distales de l'arbre dendritique dans les neurones exprimant les Kv2.1 mutés. Ces résultats sont détaillés dans l'article principal. Les sous-unités modifient donc la stœchiométrie des canaux non mutés et change également leur localisation, modifiant potentiellement la fonction des canaux.

Dans un second temps, j'ai cherché à étudier l'impact de la modification du clustering sur un des rôles non canoniques du Kv2.1, l'organisation des points de jonction entre la membrane plasmique et le RE, proposé en lien avec la signalisation calcique. L'hypothèse émise ici est que la diminution de clusters de Kv2.1 dans les neurones exprimant les mutations induirait une diminution de la colocalisation avec les clusters de RyR sur la membrane du RE. Par la microscopie confocale et de super-résolution, j'ai alors quantifié une diminution de la colocalisation des clusters de Kv2.1 mutés et de RyR. Cependant, les résultats concernant les sous-unités WT ne semblent pas refléter la forte colocalisation publiée dans la littérature et sont discutés dans la partie II des résultats.

En prenant compte le rôle proposé en lien avec la signalisation calcique expliqué précédemment, j'ai utilisé l'imagerie calcique pour étudier l'impact du Kv2.1 en utilisant un bloqueur spécifique. Mes résultats indiquent une implication du Kv2.1 dans les transients calciques au niveau du soma et le long des dendrites. Toutefois, le blocage de Kv2 a eu des effets similaires sur les cellules transfectées avec les canaux WT et mutants. Ces données sont développées dans l'article principal.

Puis, pour caractériser les hypothétiques modifications de l'excitabilité des neurones exprimant des mutations, j'ai réalisé des expériences de patch clamp sur des neurones transfectés. Les changements d'excitabilité mis en évidence sont mineurs et ces résultats sont décrits dans l'article principal.

De plus, l'utilisation d'un modèle computationnel de neurone hippocampique de CA1 m'a permis d'étudier l'interaction entre la conductance et la dépendance au voltage du canal Kv2.1, deux paramètres vastement décrits de façon différente dans la littérature. Ces descriptions hétérogènes indiquent des fourchettes de valeurs qu'il m'a été possible de tester indépendamment. Le modèle suggère des changements subtils de l'excitabilité qui pourraient modifier la fenêtre de performance optimale de la cellule. Ces résultats sont décrits dans l'article principal.

Pour confirmer les observations publiées dans la littérature sur la phosphorylation et le clustering du Kv2.1 WT suite à des changements d'activité, j'ai réalisé des expériences d'étude de clustering, de biochimie et d'enregistrement extracellulaire. En accordance avec la littérature, l'augmentation de l'activité induit un declustering du Kv2.1 en corrélation avec une déphosphorylation de la protéine dans les neurones pyramidaux et inversement pour une diminution de l'activité. Mes résultats dans les interneurones ne montrent pas de changement de clustering. Ces données sont développées dans la partie III des résultats.

## I. Article principal

# Altered distribution of Kv2.1 truncation C-ter mutants modify neuronal excitability and responses to sustained synaptic stimulation

Anne-Lise Paupiah<sup>1,2,3</sup>, Melvyn Ginisty<sup>2,3</sup>, Marion Rousseau<sup>1,2,3</sup>, Xiaojie Yu<sup>4,5,6,7</sup>, Imane Moutine<sup>1,2,3</sup>, Antoine Triller<sup>4,5,6,7</sup>, Sabine Levi<sup>1,2,3</sup>, Jean-Christophe Poncer<sup>1,2,3</sup>, Marianne Renner<sup>1,2,3</sup> \*

<sup>1</sup> INSERM UMR-S 1270, Paris, France

<sup>2</sup> Sorbonne Université, Paris, France

<sup>3</sup> Institut du Fer à Moulin, Paris, France

<sup>4</sup> INSERM U1024, Paris, France

<sup>5</sup> CNRS UMR8197, Paris, France

<sup>6</sup> Université Paris Sciences et Lettres, Paris, France

<sup>7</sup> Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris, France

### \* Correspondence to :

Marianne Renner

Institut du Fer à Moulin

INSERM-Sorbonne Université UMR-S 1270

17 rue du Fer à Moulin

75005 Paris, France

Tel. +33145876119

E-mail: [marianne.renner@sorbonne-universite.fr](mailto:marianne.renner@sorbonne-universite.fr)



## *Abstract*

Kv2 channels, which underlie 60-80% of the delayed-rectifier K<sup>+</sup> current, were shown to sustain high frequency firing by avoiding depolarization block in patch clamp experiments. Several mutations of *Kcnb1*, coding for Kv2.1, have been described in patients with epileptic encephalopathy. Wild type channels are localized at the soma, proximal dendrites and axons, forming large aggregates (clusters). Clustered channels would be in a low-conductance state. This work focused on two patient-derived mutations that introduce a stop codon (Y533\* and R583\*) before or within the C-ter region responsible for clustering in the  $\alpha$  subunit of the channel. As expected, the formation of clusters was impaired in neurons expressing these mutated subunits, which also redistributed channels into dendrites and reduced cell excitability. Overexpression of WT subunits, on the other hand, increased clustering, and enhanced excitability. One of the mutations (Y533\*) has been reported to change the voltage dependence of the channel. To obtain more insight into the consequences of varying Kv2 conductance and its voltage dependence, we made use of a biophysically detailed model of CA1 pyramidal neuron. The model reproduced our experimental results, confirming that the changes in the level of expression of Kv2 channels or changes in their voltage dependence could modify calcium signals in dendrites but only in case of sustained synaptic activation. Interestingly, the capacity of the model to fire with the same frequency than that of synaptic stimulation was strongly dependent upon Kv2 conductance and voltage dependence. Altogether, our results suggest that 1) mutations could affect excitability by impairing clustering, and 2) Kv2 is an important actor controlling the fidelity of neuronal responses and contributing to active properties of dendrites, roles that can be modified by mutations or phosphorylation.

## *Introduction*

Voltage-gated K<sup>+</sup> (Kv) channels are fundamental determinants of intrinsic excitability in neurons. Neuronal excitability and therefore neuronal function can be substantially impacted by changes in the restricted subcellular localization of Kv (Trimmer, 2015). Kv2.1 are the main  $\alpha$  subunits responsible for delayed-rectifier (DR) K<sup>+</sup> currents, and are widely expressed in the brain playing an important role on intrinsic neuronal excitability (Du et al., 2000; Liu & Bean, 2014; Murakoshi & Trimmer, 1999; Vacher et al., 2008).

These channels have a relatively slow activation kinetics and therefore influence action potential (AP) width and trough voltage after a spike (Guan et al., 2007; Liu & Bean, 2014). Their main described role is to facilitate high-frequency firing in pyramidal neurons during sustained activity avoiding depolarization block in CA1 neurons (Guan et al., 2013; Liu & Bean, 2014; Steinert et al., 2011). It is of interest that, a recent report involved Kv2 channels in controlling bursting in CA3 pyramidal cells, suggesting a role of these channels in active dendritic mechanisms (Raus Balind et al., 2019).

Within individual neurons, the staining of Kv2.1 shows large aggregates (clusters) in the soma, proximal dendrites and axonal initial segment (Trimmer, 2015) and it has been proposed that Kv2.1 conductance could be downregulated by local channel density (Fox et al., 2013). Early works had shown that some of these clusters co-localize with areas of contact between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane (ER-PM) which was correlated to the regulation of dendritic calcium transients (Antonucci et al., 2001). It has been proposed that Kv2.1 may have a role as an organizer of these contacts independently of its potassium channel function (Kirmiz, et al., 2018a; Vierra et al., 2019).

Remarkably, Kv2.1 channels undergo activity-driven modulation of their expression, localization and voltage dependence ( $V_{1/2}$ ). Kv2.1 is extensively modified by phosphorylation, totalizing 124 serine, threonine and tyrosine residues in its cytoplasmic N- and C-termini, which provide numerous consensus phosphorylation sites for various protein kinases and phosphatases (Park et al., 2006). High and sustained levels of excitatory activity lead to dephosphorylation and de-clustering of Kv2.1. Dephosphorylated Kv2.1 activate at more hyperpolarized membrane potentials, suppressing high frequency firing. This could be a homeostatic mechanism of reduction of excitability (Misonou et al., 2004, 2005). It is important to note that the level of Kv2.1 phosphorylation is diverse in different cellular backgrounds (Misonou et al., 2005).

Although knocking down Kv2.1 does not induce seizure in mice, slices from Kv2.1<sup>-/-</sup> animals are hyperexcitable and display accelerated seizure progression in response to convulsants (Speca et al., 2014). Recently, several *de novo* mutations in Kv2.1 gene *Kcnc1* were reported in patients with epileptic encephalopathy (reviewed in Bar et al., 2020). The impact of mutations on Kv2.1 activity has been studied for some of them but mostly on heterologous systems, which raises questions of conductance state of channels, given their possible different phosphorylation state (Kang et al., 2019; Saitsu et al., 2015; Thiffault et al., 2015). Therefore, the involvement of Kv2.1 in the control of neuronal activity is not totally understood. Interestingly, several functionally uncharacterized *Kcnc1* mutations target the C-ter end, resulting in truncated proteins lacking the domain responsible for aggregation (PRC or proximal restriction domain, (Lim et al., 2000)). In these patients, seizures are rare or absent but they have important cognitive delays and autistic disorders (Bar et al., 2020).

We analyzed the consequences of expressing C-ter truncation mutations Y533\* and R583\* of Kv2.1 in cultured hippocampal neurons, focusing on the subcellular distribution of the channel and changes of neuronal excitability. As expected, mutations impaired -but not completely abolish- the formation of clusters, as most probably mutant and endogenous  $\alpha$  subunits formed heterotetramers. Mutated subunits redistributed channels into dendrites and reduced cell excitability whereas overexpression of WT subunits had the opposite effect. Single particle tracking experiments showed that channels with mutant subunits alternate between immobilized (thus probably clustered) and free diffusing periods (non-clustered channels) suggesting that clusters are reservoirs of channels. Therefore, mutations could lower excitability by reducing the proportion of low-conductance state channels. To investigate in which conditions a modification of Kv2.1 conductance and voltage dependence could affect neuronal activity, we set a biophysical model that pointed out the involvement of Kv2 in controlling the fidelity of neuronal responses as well as contributing to active properties of dendrites under sustained synaptic activation.

## *Materials and methods*

### **Neuronal culture**

All animal procedures were carried out according to the European Community Council directive of November 24<sup>th</sup> 1986 (86/609/EEC), the guidelines of the French Ministry of Agriculture and the Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris (Ecole Normale Supérieure, Animalerie des Rongeurs, license B 75-05-20), and were approved by the Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale Charles Darwin (licence Ce5/2012/018). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described (Chamma et al., 2013) with some modifications of the protocol. Briefly, hippocampi were dissected from embryonic day 18 or 19 Sprague-Dawley rats of either sex. Tissue was then trypsinized (0.25% v/v; ThermoFisher Scientific, USA), and mechanically dissociated in 1X HBSS (1X; Invitrogen; Cergy-Pontoise, France) containing HEPES (10mM; Invitrogen). Neurons were plated at a density of  $120 \times 10^3$  cells/ml onto 18-mm diameter glass coverslips (Assistent; Winigor, Germany) pre-coated with poly-D,L-ornithine (50 µg/ml; Sigma-Aldrich; Lyon, France) in plating medium composed of Minimum Essential Medium (MEM; Sigma-Aldrich) supplemented with horse serum (10% v/v; Invitrogen), L-glutamine (2 mM; Invitrogen) and Na<sup>+</sup> pyruvate (1 mM; Invitrogen). After attachment for 3-4 hours, cells were incubated in culture medium that consists of Neurobasal medium supplemented with B27 (1X), L-glutamine (2 mM), and antibiotics (penicillin 200 units/ml, streptomycin, 200 µg/ml) (Invitrogen) for up to 4 weeks at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. Each week, one third of the culture medium volume was renewed.

### **Neuronal transfection and DNA constructs**

Transfections were carried out at DIV 9-10 using TransFectin (BioRad; France) according to the manufacturer’s instructions (DNA:TransFectin ratio 1 µg:3 µl), with 1-1.2 µg of plasmid DNA per 20 mm well. Kv2.1WT-GFP and Kv2.1WT-tomato were derived from rKv2.1WT-GFPHis, kindly provided by J. R. Martens (University of Florida, USA). Kv2.1Y533\*-GFP, Kv2.1R583\*-GFP, Kv2.1Y533\*-tomato and Kv2.1R583\*-tomato were derived from Kv2.1WT-GFP and Kv2.1WT-tomato by site-directed mutagenesis. Homer-DsRed was a kind gift of D. Choquet and GCaMP6f, CheRiff and a1m were kindly provided by A. Triller. Experiments were performed between 21-27 DIV.

## **Immunocytochemistry**

For detection of surface Kv2.1WT-GFP or GFP-tagged mutants, live neurons were incubated 10 min at 37°C with alpaca nanobodies against GFP coupled to AlexaFluor647 (GFP-Booster, 1/200; Proteintech; Sankt Leon-Rot, Germany) diluted in the culture medium, followed by two washes in PBS 1X. Neurons were then fixed for 10 min at -20°C in 100% methanol and washed in PBS 1X.

For intracellular labeling, cells were fixed for 15 min at room temperature (RT) in paraformaldehyde (PFA, 4% w/v; Sigma-Aldrich) and sucrose (4% w/v; Sigma-Aldrich) solution prepared in PBS. Following washes in PBS, were permeabilized with Triton (0.25% v/v; Sigma-Aldrich) diluted in PBS. Cells were washed again in PBS and incubated for 30 min at RT in blocking solution (PBS enriched with goat serum, GS, 10% v/v; Invitrogen). Subsequently, neurons were incubated for 1h with rabbit anti-Kv2.1 antibody (1:100; Alomone Labs; Jerusalem, Israel) diluted in blocking solution and 45 min at RT with the corresponding secondary antibody (Alexa647- or Cy3-tagged donkey anti-rabbit; Jackson Immunoresearch; West Grove, USA). After final rinsing, coverslips were mounted on glass slides using Mowiol 4-88 (48 mg/ml; Sigma-Aldrich). Sets of neurons compared for quantification were labeled simultaneously.

## **Fluorescence image acquisition and analysis**

Confocal imaging was performed on a Leica TCS SP5 (Nussloch, Germany) equipped with a 100X oil-immersion objective, acquiring optical sections of 0.25  $\mu\text{m}$  in depth.

For wide-field imaging, image acquisition was performed using a 63X oil-immersion objective (NA 1.32) on a Leica DM6000 upright epifluorescence microscope (Nussloch, Germany) with a 12-bit cooled CCD camera (Micromax, Roper Scientific; Evry, France) run by MetaMorph software (Roper Scientific). Quantification was performed using custom software written in Matlab (The Mathworks). Camera exposure time was determined on bright cells to obtain best fluorescence to noise ratio and to avoid pixel saturation. All images from a given culture were then acquired with the same exposure time and acquisition parameters.

Surface staining was quantified on maximal projections (confocal images, typically 2-3 optical slices) or fluorescence images (widefield) in which three regions of interest (ROI) were manually chosen at different locations on a dendrite. Proximal, intermediate and distal ROIs were placed at ~50, ~100 and ~150  $\mu\text{m}$  from the soma, respectively, using tools provided by Fiji Image analysis software. Average fluorescence was quantified in each ROI divided by the mean of the proximal ROI for normalization.

For clustering analysis, background was flattened using the “Subtract Background” tool in Fiji. Residual background was subtracted on the whole image before applying an intensity threshold for segmentation. Segmented images were used as mask to recover total fluorescence values in the original image and to extract the area of clusters, using home-made custom routines in Matlab.

### **Super-resolution imaging**

Super-resolution imaging on fixed samples was conducted on an inverted N-STORM Nikon Eclipse Ti microscope with a 100X oil-immersion objective (NA 1.49) and an Andor iXon Ultra 897 EMCCD camera (image pixel size, 105 nm), using specific lasers for STORM imaging of Alexa647 (405 and 640 nm). Samples were imaged in a PBS-based oxygen-scavenging medium containing imaging buffer (Tris 100 mM, NaCl 20 mM, pH 8), glucose (40% w/v; Sigma-Aldrich), PBS 1X, cysteamine hydrochloride (MEA; Sigma-Aldrich), catalase (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) and pyranose oxidase (200 U/ml; Sigma-Aldrich). Catalase was diluted in MgCl (4 mM), EGTA (2 mM) and PIPES (24 mM; Sigma-Aldrich, pH 6.8). Pyranose oxidase was diluted in the same buffer supplemented with glycerol (50% v/v). Videos of 30 000 frames were acquired at a frame rate of 20 ms. The z position was retained during the acquisition by a Nikon Perfect Focus System.

### **Single-molecule localization and clustering analysis**

Single-molecule localization and 2D image reconstruction was performed as described in Specht et al., 2013 by fitting the PSF of spatially separated fluorophores to a 2D Gaussian distribution. Poorly localized peaks (fitting  $R^2 < 0.7$ ) were not included for further analysis. The drift of the stage was corrected using 100 nm multicolor fluorescent beads (TetraSpeck, 1/300; Invitrogen) to follow the movement through the frames; and was nullified by superimposing the molecular localizations of each frame. Rendered images were obtained by superimposing the coordinates of single-molecule detections, which were represented with 2D Gaussian curves of unitary intensity and SDs representing the localization precision (Baddeley et al., 2010).

All data analyses were performed using *Diinamic* ([GitHub - mlrennerfr/Diinamic: Clustering analysis on single-molecule localization microscopy data](#)), a custom software developed in the lab (Paupiah et al., 2023). Clustering detection was carried out on regions of interest (ROIs) drawn on top of pointillistic images constructed from the coordinates of detections. Detections were initially sorted into belonging to candidate clusters or not depending on their localization with respect to a segmentation mask. This mask was created by either thresholding the pixel intensity of the

corresponding rendered image. The clusters' borders were defined by the *boundary* function of Matlab. Candidate clusters were retained if: 1) their density, calculated in a pixel-wise manner, exceeded a threshold; 2) their sizes were between given thresholds (minimum and maximum). Thresholds were chosen considering the expected number of detections per molecule, the size of the molecule and the expected size of clusters given other microscopy data already published.

### Live cell staining for single particle imaging

To track membrane GFP-tagged channels, quantum dots (QDs) were pre-coupled to anti-GFP primary antibodies (rabbit; Roche; Basel, Switzerland) as reported previously (Renner et al., 2017). Kv2.1 was tracked by QD coupled to a monoclonal anti-myc antibody (Roche). Briefly, goat anti-rabbit F(ab')<sub>2</sub>-tagged QDs emitting at 655 nm (Q11422MP; Invitrogen) were incubated first with the antibody for 30 min in PBS, and then blocked for 15 min with casein in a final volume of 10  $\mu$ L. Neurons were incubated with the pre-coupled QDs (1:6000–1:10000 final QD dilution) for 5 min at 37°C.

### Single particle tracking and analysis

Cells were imaged using an Olympus IX71 inverted microscope equipped with a 60X oil-immersion objective (NA 1.42; Olympus; Tokyo, Japan) and a X-Cite 120Q lamp (Lumen Dynamics; Waltham, USA). Individual images of Kv2.1-GFP, Homer-DsRed and QD real time recordings (integration time of 75 ms over 1200 consecutive frames) were acquired with Hamamatsu Im-agEM EMCCD camera and MetaView software (Meta Imaging 7.7).

Tracking was performed with homemade software (SPTTrack\_v4) in Matlab. The center of the spot fluorescence was determined by 2D-Gaussian fit. Spatial resolution was ~10-20 nm. The spots in a given frame (time point) were associated with the maximum likely trajectories estimated on previous frames of the image sequence. In some experiments, trajectories were defined as belonging to a cluster if they were on top of clusters defined by a binary mask of Kv2.1WT-GFP fluorescence. The mean square displacement (*MSD*) was calculated using:

$$MSD(n dt) = (N - n)^{-1} \sum_{i=1}^{N-n} ((x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2)$$

where  $x_i$  and  $y_i$  are the coordinates of an object on frame  $i$ ,  $N$  is the total number of steps in the trajectory,  $dt$  is the time interval between two successive frames,  $n$  is the number of frames and

$ndt$  is the time interval over which displacement is averaged. The diffusion coefficient  $D$  was calculated by fitting the first 2 to 5 points of the  $MSD$  plot versus time) with the equation:

$$MSD(t) = 4 D_{2-5} t + 4 \sigma_x^2$$

with  $\sigma_x$  the spot localization accuracy (positional accuracy) in one direction.

The packing coefficient ( $PC$ ) at each time point  $i$  was calculated as

$$PC_i = \sum_i^{i+n-1} \frac{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}{S_i^2}$$

where  $x_i, y_i$  are the coordinates at time  $i$ ;  $x_{i+1}, y_{i+1}$  are the coordinates at time  $i+1$ ,  $n$  is the length of the time window ( $n = 30$  time points) and  $S_i$  is the surface area of the convex hull of the trajectory segment between time points  $i$  and  $i+n$ .  $S_i$  was calculated using the *convhull* function in Matlab (Renner et al., 2017).

### Glutamate uncaging and $Ca^{2+}$ imaging

Primary hippocampal cultures were transfected with the genetically encoded nuclear  $Ca^{2+}$  sensor GCaMP6f together with Kv2.1WT- Y533\*<sup>-</sup> or R583\*<sup>-</sup>-tomato. Transfected neurons were recorded in ACSF medium (pH 7.45) containing glucose (30 mM; Sigma-Aldrich), NaCl (130 mM; Sigma-Aldrich), HEPES (10 mM; Invitrogen), KCl (5 mM; Sigma-Aldrich),  $CaCl_2$  (2 mM; Sigma-Aldrich) and  $MgCl_2$  (1 mM; Sigma-Aldrich). Acquisitions were made on an inverted microscope Eclipse Ti (Nikon) with a 100X oil-immersion objective (NA 1,49) and a EMCCD iXon camera (Andor), and laser lines (405 nm and 561nm; Coherent, Santa Clara, US). Recordings were done in streaming mode at 43.5 Hz.

Cells were stimulated uncaging 4-methoxy-7-nitroindolinyI (MNI)-caged glutamate, added previously to the medium, with a 405 nm laser defocused to illuminate the whole dendritic arbor. In a first series of experiments, uncaging was done after 46 s to observe spontaneous activity before stimulation (total duration of the recording, 57.5 s). Then the power of the 405 laser was set to produce  $Ca^{2+}$  transients in the order of the spontaneous ones. In a second series of experiments, we evaluated photobleaching induced by the 405 laser and continuous imaging of GCaMP6f. Cells were first stimulated while imaged in control conditions, following the sequence: imaging of GCaMP6f fluorescence baseline for 500 frames (11,5 s), uncaging, imaging of GCaMP6f for 1000 frames (23 s). Then GxTx (100nM; Alomone Labs) was added to the medium. 10 min later, a second stimulation and image sequence identical to the first one was performed.



Average fluorescence values were computed in ROIs at different positions on a dendrite (typically before the first bifurcation or at ~20  $\mu\text{m}$  of the soma, then at ~40 and ~60  $\mu\text{m}$  from the soma) using Fiji. The responses to stimulation were expressed as relative stimulus-evoked changes in resting fluorescence as

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_{max} - F_0}{F_0}$$

where  $F_{max}$  is the maximal fluorescence intensity and  $F_0$  the intensity at the initial time (mean intensity of ~10-20 frames recorded before the stimulus). From the normalized transients, we extracted their full width at half maximum (FWHM). As decay was not necessarily mono-exponential in all cells, we did not consider it.

### **Optogenetic activation and $\text{Ca}^{2+}$ imaging**

Primary hippocampal cultures were transfected with the channelrhodopsin CheRiff together with the Kv2.1WT- Y533\*- and R583\*-GFP constructs. Transfected neurons were incubated with the CaTM3 calcium probe (BioTracker 609 Red  $\text{Ca}^{2+}$  AM Dye; Sigma-Aldrich) for at least 45 mins, then with GFP-Booster 647 (1/100) for 10 mins before imaging in the ACSF medium. Acquisitions were made on an Eclipse Ti inverted microscope (Nikon) equipped with a 100X oil-immersion objective (NA 1.49) and an EMCCD Ultra camera (Andor). Videos of 4518 images with 4x4 sampling for an exposure time of 8 ms were acquired with Nis-Elements software (Nikon). A 561 nm laser was used to image the calcium probe and a 405 nm LED to activate the CheRiff, positioned to maximally illuminate the camera's recording field. Cells were first stimulated while imaged in control conditions. The stimulation and imaging sequence started by imaging CaTM3 fluorescence baseline for 500 frames (4 s), and then the following sequence, repeated three times: laser activation for 6 frames, imaging of CaTM3 for 1000 frames (total duration of the acquisition 36 s). A 10-minute delay was observed after the addition of GxTx (100 nM), then a second acquisition sequence identical to the first one was performed.

Measurements of mean cell body intensity were obtained using ImageJ, then analyzed using routines created specifically on Matlab. Baselines were first linearized and activation images removed. The calcium transients were then identified and the traces averaged and analyzed. From the normalized transients, we extracted the maximum amplitude.

## Electrophysiological recordings

Somatic recordings of cultured pyramidal neurons were recorded in the whole-cell configuration of the patch clamp technique, using 4-5 M $\Omega$  borosilicate glass pipettes. Signals were acquired with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices; San Jose, USA), low-pass filtered at 10 kHz, and digitized at 20 kHz. Cells were recorded in whole-cell configuration and maintained at -70 mV. All voltages were corrected offline for liquid junction potential (of 14.5 mV).

Neuronal cultures were maintained at 33°C in a medium containing (in mM): 120 NaCl, 20 D-glucose, 10 HEPES, 3 MgCl<sub>2</sub>, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub> at pH 7.4 with synaptic blockers (in mM): 0.01 NBQX, 0.05 dAPV and 0.02 bicuculline. Internal solution contained (in mM): 120 K-Gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 4 MgATP, 0.4 Na<sub>3</sub>GTP (pH adjusted to 7.4 with KOH).

Input resistance ( $R_{in}$ ) was determined in voltage-clamp according to Ohm's law by measuring the steady-state current induced by a -5 mV step for 1000 ms. The  $\tau$  value was determined in current clamp by adjusting an exponential function to the capacitive response elicited by current injection (-25 pA). In case of GxTx application, cells were first recorded in control conditions, then GxTx aliquots were promptly thawed before use and pre-dissolved in ACSF before bath application.

Input-output curves were generated by plotting firing frequency in response to 25 pA-step current injections ranging from -25 to +475 pA (0.8 s duration). All AP properties were determined from the first AP elicited at rheobase. Changes in AP waveforms were investigated by generating phase plots. Phase plots were constructed by plotting the time derivative of the somatic membrane potential ( $dV/dt$ ) versus the somatic membrane potential of the first action potential.

All the analyses were performed *offline* using home-made codes in Matlab employing built-in functions, Chronux ([Chronux Home](#)) and FMAToolbox ([FMAToolbox \(sourceforge.net\)](#)) (Goutierre et al., 2019).

## Computational modeling

We employed the multicompartmental model CA1 neuron proposed by Combe et al., 2018 (2018, ModelDB [244416](#)) with some modifications. The original model includes a leak current, two fast Na<sup>+</sup> currents (somato-dendritic and axonal), a delayed rectifier (DR), two A-type K<sup>+</sup> currents (proximal and distal), an M-type K<sup>+</sup> current, a mixed conductance hyperpolarization-activated h-current, a T-type Ca<sup>2+</sup> current, an R-type Ca<sup>2+</sup> current, two L-type Ca<sup>2+</sup> currents (somatic and dendritic), a slow Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> (SK) current and a Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent K<sup>+</sup> (BK) current. The

distribution currents followed reported experimental data, with higher density of SK and BK conductances in the apical dendrites from 50 to 200  $\mu\text{m}$  from the soma, higher density of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at distances  $> 50 \mu\text{m}$  from the soma, and the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel density being only nonzero at distances  $> 100 \mu\text{m}$  from the soma (Poirazi et al., 2003; Magee, 2016).

To specifically model changes in conductance of Kv2, we split the original DR conductance into two: 30% of the value was modelled with the original DR model, and 70% ( $g_{\text{Kdr2}}$ ) modelled with a modified algorithm that took into account temperature-induced inactivation reported by Ranjan and coll ([Channeledia \(epfl.ch\)](https://www.epfl.ch/research/channeledia/), Ranjan et al., 2019) (see supplemental materials and Supplemental Fig. S6). We then systematically modified the conductance ( $g_{\text{Kdr2}}$ ) and voltage dependence ( $V_{1/2}$ ) of Kv2-mediated currents. Morphology corresponded to cell Pc2b (Megías et al., 2001), which has 144 compartments (Fig. 5A). The specific capacitance was  $1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  in the soma and apical dendrite. Axial and membrane resistivity were held constant in the apical dendrites. Synaptic stimulation was modelled by including 45 excitatory synapses, containing AMPA and NMDA receptors (Combe et al., 2018), in apical oblique dendrites connected to the main apical dendrite between 250 and 450  $\mu\text{m}$  from the soma (Fig. 7A).

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were done using GraphPad Prism 9 (Dotmatics). The tests that were applied are detailed in the main text. Images were prepared using Photoshop (Adobe Systems, USA).

## Results

Kv2.1 are thoroughly expressed in the brain but their expression are particularly high in cortical and CA1 pyramidal neurons (Vacher et al., 2008). We therefore chose cultured hippocampal neurons as our model. Kv2.1 channels are composed of four  $\alpha$  subunit polypeptides with six transmembrane segments (termed S1–S6). Channels can be homo or hetero-tetramers, forming for instance 2:2 tetramers with silent Kv6 subunits (Möller et al., 2020). Amino- and carboxyl-termini of  $\alpha$  subunits are cytoplasmic, such that all extracellular domains are found within the transmembrane segments. To be able to identify mutant channels, we engineered fluorescently tagged chimeras of wild type (WT) and mutated  $\alpha$  subunits, based on a GFP-tagged channel described in the literature. This modification does not impact the activity of the channel (O’Connell et al., 2010). Therefore, all our constructs had a fluorescent protein inserted between the first and second transmembrane loop.

### **Y533\* and R583\* mutations shifted Kv2.1 distribution towards dendrites and reduced the size of Kv2.1 clusters**

We first assessed the consequences of expressing the mutated forms of Kv2.1 on the subcellular distribution of the channels. Neurons were co-transfected with GFP-tagged WT or mutated forms of Kv2.1, together with Homer-DsRed (Bats et al., 2007) to detect the presence of dendritic spines and thus identify pyramidal neurons. As Y533\* and R583\* are *de novo* mutations (Bar et al., 2020), we did not silence the expression of the endogenous protein.

We verified the expression of Kv2.1 chimeras at the plasma membrane by surface staining of GFP with Alexa647-coupled anti-GFP nanobodies. Confocal microscopy confirmed that the chimeric proteins are well expressed at the surface of cells and that mutated forms have a completely different distribution with respect to the WT protein (Fig. 1A). The average surface fluorescence decreased very rapidly along dendrites in case of WT, whereas this decrease was less important for both mutants (Fig. 1B). In more distal dendrites (> 100  $\mu\text{m}$  from the soma) the remaining average fluorescence was ~7 % of the soma for the WT, ~44% for Y533\* and ~63% for R583\* mutants (Fig. 1B). It must be noted that the average fluorescence included here clustered and non-clustered channels and therefore it did not represent the Kv2 current density, that was described as homogeneous at least in soma and main apical dendrite compartments by patch-clamp experiments (reviewed in Yuan & Chen, 2006).

Both mutations affect the PRC thus they were expected to abolish clustering. We used STORM super-resolution microscopy to characterize changes in clustering using the same strategy than above to label only surface channels. The use of this technique allowed us to evaluate the proportion of channels that belonged to clusters, as well as to detect clusters whose size was below the optical resolution limit. We focused only on the top surface of the soma to be in optimal conditions to describe clusters (a relatively flat membrane, Fig. 1C). The clustering behavior of Kv2.1 was modified in the mutant-expressing neurons with a large decrease in cluster size (Fig. 1D1). However, clustering was not completely abolished and the proportion of mutated channels in clusters was still ~25% (Fig. 1D2). Mutated channels were still forming clusters but much smaller than WT ones (Fig. 1D1).

An important issue is whether the expression of mutated Kv2.1 affected the expression and distribution of the endogenous protein. Using an antibody directed to an epitope in the C-ter that is missing in the mutated forms, we could immunolabel only endogenous Kv2.1 (Supplemental Fig. S1). We observed that its distribution was modified by the expression of mutants (Fig. S1AB). Whereas the average fluorescence of endogenous Kv2.1 was reduced by ~6 fold between proximal and distal dendrites in non-transfected cells, the reduction was limited to ~1.5 fold in presence of mutated channels (Fig. S1C). Clustering of endogenous channels was also reduced in presence of mutated forms (Fig. S1D2). There were no significant changes of the density of channels, therefore mutations did not reduce cluster size by splitting them (Fig. S1E2). Thus, the expression of a mutant subunit had a dominant negative effect on endogenous Kv2.1 distribution, which could be explained by the formation of heterotetramers of endogenous and mutated Kv2.1.

It has been reported that over-expressing WT channels increases clustering (Antonucci et al., 2001). We confirmed this result observing larger clusters with no changes on the distribution along the dendrite (Fig. S1E1). Taken together, these results showed that the equilibrium between clustered and non-clustered channels may be shifted to one or to the other side by expressing  $\alpha$  subunits that present or not the PRC domain.

### **Kv2.1 channels were highly immobilized in and out clusters and Y533\* and R583\* mutations decreased their capture in clusters**

As biological membranes are fluid at physiological temperature, the formation of clusters rely on protein-protein interactions that immobilize or stabilize molecules by a diffusion-capture mechanism (Ribault et al., 2011, Fig. 2A1). Kv2.1 was shown to interact through a sequence in the PRC

with VAP proteins in the endoplasmic reticulum (ER), at plasma-membrane-ER junctions (Kirmiz, et al., 2018b) therefore these proteins could represent a scaffold to stop the lateral diffusion of Kv2.1.

In homomers with four PRC, the probability of being stabilized by a scaffolding interaction would be maximal. However, when subunits missing the PRC (i.e., mutated subunits) form a channel, the lack of one or more PRC would lead to less and shorter stabilizations. We then sought to describe the composition of the population of Kv2.1 by examining their stabilization. The analysis of lateral diffusion is very convenient method to address this question (Renner et al., 2017), so we performed quantum-dots based single particle tracking (QD-SPT) to analyze the movements of surface WT or mutated Kv2.1-GFP.

Kv2.1-GFP molecules were labeled with quantum dots (QDs) coupled to an anti-GFP antibody (QD-GFPGPI, Fig. 2A2). QD-GFPGPI were detected with a localization accuracy of 20-30 nm and tracked at 18 Hz. To detect stabilization periods, we applied the *Pc* analysis method developed in the lab (Renner et al., 2017). The packing coefficient parameter (*Pc*) gives an estimate of the degree of free movement that a molecule displays in a period of time, independently of its global diffusivity. Therefore, the thresholding of *Pc* can detect and localize temporary changes of diffusive behavior both in time and in space. Given the localization precision in our experiments, we set the threshold to detect stabilization at  $4500 \mu\text{m}^2$  (see materials and methods section, Supplemental Fig. S2).

The difference in diffusive behavior between WT and mutated channels was striking: whereas most of WT channels were highly confined (stabilized), mutated ones alternate between free diffusion and stabilized periods (Fig 2A3, Supplemental Fig. S2). These transient stabilizations could be due to statistical fluctuations of random movement, so we also analyzed the diffusion of a non-related chimeric molecule (a1m, an engineered version of glycine receptor that is non-functional and lacks intracellular domains) that does not display any scaffolding interaction (Meier et al., 2001).

The distribution of diffusion coefficient (*D*) showed the presence of two subpopulations for the molecules analyzed, one very slowly mobile or immobile ( $D < 0.001$ ) and the other more mobile (Fig. 2B). The differences between the different molecules studied arose from the proportion of molecules belonging to each group: it was  $62.85 \pm 12.25 \%$ ,  $33.34 \pm 9.28$  and  $19.68 \pm 5.87$  (mean  $\pm$  SD) for Kv2.1WT -GFP, Kv2.1Y533\*-GFP and Kv2.1R583\*-GFP, respectively and only  $6.89 \pm 2.42 \%$  (mean  $\pm$  SD) for a1m (not shown). In case of a1m, we assumed that the slowly mobile

group represented the effect of non-specific interactions that slow-down diffusion. In case of Kv2.1 chimeras, the percentage observed correlated well with their clustering.

*Pc* analysis showed that most of WT channels were stabilized, that is, displayed at least one stabilization event during the recording (Fig. 2C); and remained stabilized ~55% of the time (median value, Fig. 2D1). Following the tendency observed in the distribution of *D*, Kv2.1Y533\*-GFP and Kv2.1R583\*-GFP were stabilized ~37 and ~25% of the time (Fig. 2C). Only ~5% of a1m trajectories had stabilization events, that spanned in total ~11% of the time (Fig. 2CD).

Overall, most stabilized WT channels had several and more frequent stabilization events than mutated channels, whereas stabilized a1m mainly displayed only one (Fig. 2D2). The distribution of values of frequency (Fig. 2D2) and duration (not shown) of stabilization events were very large, what could be expected considering that Kv2.1 molecules had variable numbers of PRC. In addition, heterogeneity could arise from variable levels of phosphorylation.

Altogether, these results agreed with a decreased clustering of mutants due to a reduced probability to engage scaffolding interactions. Data also hints to a population of Kv2.1 with variable combinations of  $\alpha$  subunits, that would provide a subpopulation of channels that easily exchange between clustered and non-clustered distribution and a subpopulation that remain essentially clustered.

As ~80% of WT channels were found in clusters, we expected to have a high proportion of stabilized channels but also a small subpopulation of mobile ones. However, the overall *D* values of Kv2.1WT-GFP were much lower than those of a1m (Fig. 2B). As we could image the clusters thanks to GFP fluorescence, we sorted trajectories into those belonging to clusters and those not. The distribution of *D* of trajectories outside clusters was shifted to the right as expected (Fig. 2E). However, there was still a high proportion of stabilized molecules outside clusters (Fig. 2F) which suggests that Kv2.1 also established stabilizing interactions outside large clusters.

In agreement with the results obtained with ICC (Fig. 1), trajectories of mutated channels populated proximal and distal dendrites (not shown). Interestingly, a recent report involved Kv2 in the control of bursting in CA3 pyramidal neurons, which suggest that these channels would participate to dendritic active mechanisms. The pioneer work of Du and coll. also suggested that Kv2 expression modulate  $Ca^{2+}$  transients in dendrites (Du et al., 2000). As Kv2.1 are high-voltage activated, they could participate to the regulation of the backpropagation of action potential. We investigated this possibility using glutamate uncaging and calcium imaging.

### **Blockade of Kv2 increases calcium transients in dendrites**

Spontaneous or evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signals were detected in dendrites of primary hippocampal neurons co-transfected with GCaMP6f and tomato-tagged Kv2.1 (WT or mutated, Fig. 3A). To stimulate the cells, MNI-glutamate was uncaged by a short pulse of a 405 nm laser. We evaluated the level of photobleaching due to imaging and to the uncaging laser pulse (Supplemental Fig. S3B). As the amplitude of the peak was more affected than its width by photobleaching, we based our analysis on the full width at half maximum (FWHM). Even if the decrease of fluorescence between the first and the second imaging period was quite important, we reasoned that if blockade of Kv2 increase  $\text{Ca}^{2+}$  transients as expected, photobleaching can only reduce the effect.

Glutamate uncaging was followed by large fluorescence transients in the soma and dendrites. We verified that the power and duration of the 405 nm laser pulse was evoking signals with an amplitude in the order of the spontaneous ones (Fig. 3B), which probably are due to single AP.

The contribution of Kv2 channels was evaluated using their specific blocker, Guanxitoxin-1E (GxTx, Herrington et al., 2006; Liu & Bean, 2014). We first validated the concentration used by patch clamp experiments. As reported previously on hippocampal slices (Liu & Bean, 2014), GxTx application (100 nM) initially increased the excitability of cells but also induced a faster entry into depolarization block (Supplemental Fig. S3A). It also increased the duration of APs and reduced the afterhyperpolarization (AHP) (Supplemental Fig. S3A).

$\text{Ca}^{2+}$  signals were normalized to the initial GCaMP6f fluorescence value  $F_0$ .  $\Delta F/F_0$  signals measured at different locations (proximal, intermediate and distal) along dendrites showed a significant enlargement of the transient in both cells expressing WT or mutant channels (Fig3C-D). The ratio between after and before GxTx application shows a comparable enlargement of the transient between WT and mutated Kv2.1 (Fig. 3E).

These results show that even though Kv2 channels are slow to activate, they can contribute to the limitation of AP backpropagation into dendrites. Contrary to what we expected, the blockade of Kv2 had similar effects on cells transfected with WT and mutant channels. However, we were not able to monitor GCaMP6f far away from the soma, where the difference in Kv2.1 expression is maximal.

The increase of  $\text{Ca}^{2+}$  signals was not limited to dendrites. Additional experiments using optogenetic stimulation using CheRiff channelrhodopsin provided similar results (Supplemental Fig. S3C). Fluorescence traces of the calcium dye CaTM3 were recorded at the cell body before and after GxTx application (Supplemental Fig. S3C2). The maximum amplitude increased after drug



application for WT and mutated Kv2.1 (Supplemental Fig. S3C3) in accordance with GCaMP6f results. To further characterize the functional effects of mutations, we performed patch clamp experiments to evaluate neuronal excitability.

### **The level of clustering of Kv2.1 is correlated to neuronal excitability**

Whole-cell recordings from transfected and non-transfected neurons were obtained while blocking synaptic transmission (Fig. 4A). We detected inhibitory interneurons looking at the firing pattern and the passive properties of the membrane, and we kept only cells that display features of pyramidal neurons. The majority of cells were identified as “regular-spiking” cells. In transfected cultures, we confirmed the identification thanks to the presence of Homer-DsRed puncta along dendrites, which correspond to dendritic spines. Input resistance was between 227-566 M $\Omega$ ,  $\tau$  between 26-77 ms and  $C_m$  between 85-154 pF (25-75% IQR,  $n = 30$ ). Cells expressing WT or mutant channels had similar passive properties than non-transfected cells (not shown).

Finally, we kept only cells that responded to prolonged, suprathreshold current pulses of incrementing amplitude with trains of APs with progressively increasing frequency. Although this was the case for at least four steps, we observed a large variability in terms of presence and position of the depolarization block (Supplemental Fig. S4). Considering each group, 56% of non-transfected neurons had a depolarization block below the maximum injected current (475 pA), 52% in case of Kv2.1WT-GFP, 45% for Kv2.1Y533\*-GFP and 35% for Kv2.1R583\*-GFP.

Counterintuitively, overexpressing Kv2.1WT-GFP increased excitability, as it can be observed by the higher slope of the frequency–current (F-I) curve (Fig. 4B1). This could be explained by two mutually exclusive situations. One possibility is that the overexpression of Kv2.1WT-GFP increased Kv2 conductance in the cell, which would help to maintain high frequency firing. However, previous reports suggested that clustered channels are held in a low-conducting state (Fox et al., 2013 and references therein), therefore the alternative explanation is that overexpression could decrease Kv2 conductance by increasing the proportion of clustered channels.

In case of mutated channels, curves were shifted to the right meaning less excitability (Fig. 4B2). For injected currents below 225 pA, mutations reduced the frequency of firing (ANOVA with Friedman test,  $p < 0.001$ ). The appearance of the depolarization block was delayed happening at higher stimulation levels although the difference between WT and mutant channels was not significant. There was no significant change on the characteristics of the AP or its dynamics, visualized by phase plots (Fig. 4C).

One possible explanation of these results is that Kv2 conductance is increased when mutant subunits are expressed, may be because of the reduction of clustering. However, in case of Y533\* it was reported a change in voltage dependence when expressed in HEK cells. Even if the results of this study were surprising, with a shift towards more depolarized  $V_{1/2}$  when the mutant was expressed alone, and towards negative  $V_{1/2}$  when expressed together with WT subunits, we could not exclude a combined effect of modified conductance and voltage dependence.

To better understand the interplay between Kv2 conductance, voltage dependence and neuronal excitability, we made use of a biophysically detailed model of CA1 pyramidal neuron to analyze the consequences of systematically changing these parameters in controlled situations.

### **Modelling the consequences on excitability of variable Kv2 conductance and voltage dependence**

We modified an already published NEURON-based model of a CA1 pyramidal neuron (Combe et al., 2018) (Fig. 5A). The algorithm to calculate Kv2-mediated current was modified from the original DR model to account for the inactivation of the model reported at near-physiological temperature (Ranjan et al., 2019) using experimental data freely available on <https://channelpedia.epfl.ch> (Supplemental Fig. S5). In CA1 pyramidal neurons, Kv2 channels are responsible for ~60–80% of the delayed rectifier current recorded at the soma (Du et al., 2000; Liu & Bean, 2014; Murakoshi & Trimmer, 1999). Thus, the DR conductance in the model was divided into one generic conductance (30% of the total) that remained unchanged, and one conductance representing Kv2 channels ( $g_{kdr2}$ , 70% of the total, see materials and methods). Even if the immunolabeling of Kv2.1 showed lower staining in dendrites at higher distance from the soma, this difference raised mainly from the differential presence of large clusters at the soma and proximal dendrites. Considering that clustered channels are in a low-conductance state, and given published patch clamp data (Yuan & Chen, 2006), we distributed  $g_{kdr2}$  homogeneously in all compartments. Following the literature (Kang et al., 2019; Liu & Bean, 2014; Misonou et al., 2005; Murakoshi et al., 1997; Park et al., 2006), we tested different combinations of  $g_{kdr2}$  (from 0 to 0.03 S/cm<sup>2</sup>) and  $V_{1/2}$  (from -20 to 20 mV).

In a first series of simulations, we analyzed the excitability of the model by simulating a patch clamp protocol injecting current into the soma to obtain a train of AP (Fig. 5A). As expected, input/output curves showed lower excitability when  $g_{kdr2}$  was increased or when  $V_{1/2}$  had negative values (Fig. 5BC). Rheobase was changed in almost all cases, except with positive  $V_{1/2}$  (Fig. 5C).

Higher values of  $g_{kdr2}$  decreased excitability and shifted depolarization block towards higher stimuli (Fig. 5B).

Therefore, our patch clamp results are compatible with two situations: 1) mutants increase  $g_{kdr2}$  or 2) mutants shift  $V_{1/2}$  to hyperpolarized values reducing  $g_{kdr2}$  in parallel.

Besides controlling neuronal firing, Kv2 channels were recently involved in dendrite-dependent mechanisms responsible for bursting (Raus Balind et al., 2019). As the distribution of mutated channels is shifted towards dendrites, we sought to evaluate the effect of increasing Kv2 currents on the backpropagation of AP in the main apical dendrite. The model was stimulated again by injecting current into the soma (Fig. 6AB) but we tried two different protocols to obtain only one AP (protocol 1) or a train of AP (protocol 2). Fig. 6C-F shows examples of traces obtained with three values of  $g_{kdr2}$  (0, 0.005 and 0.01 S/cm<sup>2</sup>) and two values of  $V_{1/2}$  (10 and -10 mV) that represent typical results obtained with positive and negative  $V_{1/2}$ . Larger  $g_{kdr2}$  and more negative  $V_{1/2}$  reduced the peak voltage achieved in the distal part of the dendrite. This reduction was weak and only observable for negative  $V_{1/2}$  in the case of one AP (Fig. 6C) but it was noticeable after a train of AP at distances above 200  $\mu$ m from the soma (Fig. 6E). Thus, the slow kinetics did not preclude a reduction in the backpropagation of AP, but this effect would likely be observable experimentally only during after firing of several AP.

The repolarization of the membrane after one backpropagated AP (bAP) observed in a segment at  $\sim$ 250  $\mu$ m from the soma (point X) was slowed down in absence of  $g_{kdr2}$  but the profiles obtained with other  $g_{kdr2}$  were similar (Fig. 6D). However, the response of the model to a short train of AP was more complex, in agreement with the results showed in Fig. 5. For higher  $g_{kdr2}$ , firing was abolished in case of positive  $V_{1/2}$  but enhanced for negative  $V_{1/2}$  (Fig. 6F).

### **Increasing Kv2 currents reduced the reliability of the model neuron**

Slow kinetics would also imply a kind of memory of the previous state of the membrane, and we could expect that the effect of Kv2 currents accumulate in time. The stimulation by current injection at the soma, even if it represents patch clamp experiments, it is not the ideal situation as synaptic activity imposes time-dependent complex patterns of membrane voltage fluctuation and activation of voltage-gated channels. Therefore, in the next series of simulations we simulated synaptic activity in apical dendrites. We placed 45 excitatory synapses, containing AMPA and NMDA receptors (Combe et al., 2018) at different positions along apical oblique dendrites attached the apical trunk between 250 and 450  $\mu$ m from the soma (Fig. 7A). We did not reinitialize

the random number generator of NEURON between trials, so we had the same sequence of synaptic activation in each trial.

Firstly, we characterize the response to the model to increasing frequencies of synaptic stimulation. In absence of  $g_{kdr2}$ , the model fired AP at the same frequency than the stimuli from 25 to 70 Hz, then it started to fail (Fig. 7B). In presence of  $g_{kdr2}$ , the model started to fail at lower frequencies (Fig. 7B). The lower rate of success happened with the hyperpolarized  $V_{1/2}$  (Fig. 7B). Therefore, increasing Kv2 currents could reduce the reliability of neurons by decreasing the probability of reaching the threshold to fire a AP.

### **Kv2 affected dendritic $Ca^{2+}$ transients under sustained synaptic activation**

Next, we evaluated the consequences of Kv2 currents in dendrites, either using a protocol to obtain one AP (activating all the synapses once, protocol 1) or activating synapses ten times at 40 Hz, to generate a train of AP (protocol 2) (Supplemental Fig. S6).

Fig. 7 shows examples of the time course of membrane voltage ( $V_m$ ) and  $Ca^{2+}$  currents at point X as before, for both protocols. The presence of Kv2 conductance reduced the afterdepolarization of dendritic spikes and  $Ca^{2+}$  transients, the effect being more important in case of multiple AP as before (Fig. 7C-F). As the effect on  $Ca^{2+}$  transients was complex (Fig. 7D2, F2), we calculated the area under the curve (AUC) for each combination of  $g_{kdr2}$  and  $V_{1/2}$  (Fig. 7G). When the model fired only one AP, increasing Kv2 currents reduced  $Ca^{2+}$  AUC but the gradient between the minimum and maximum was limited (Fig. 7G1). In case of several AP, the extent of variation was more important and not always monotonic (Fig. 7G2).

Taken as a whole, the model confirmed that varying Kv2 current has complex effects of on excitability, making impossible to propose a simple statement about how modifying Kv2 channels will alter neuronal excitability. The model also pointed out that Kv2 channels could affect synaptic plasticity phenomena by acting on the backpropagation of AP, but that this effect could be significant only under conditions of sustained activity.

## Discussion

Kv2 channels, in particular Kv2.1, have a widespread distribution in the brain and provide a major component of neuronal delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. Despite this, their physiological roles are less well known than for other voltage-gated K<sup>+</sup> channels, probably due to the relatively recent characterization of their specific blocker, GxTx (Hönigsperger et al., 2017; Liu & Bean, 2014). Moreover, their slow kinetics and high voltage activation, that preclude effects observable on a single AP, oriented early research towards roles independent from their channel function (Antonucci et al., 2001; reviewed in Johnson et al., 2019).

The recent description of an increasing number of mutations found in patients suffering from epileptic encephalopathies drove new interest on these channels. Kv2.1 is unique among voltage-gated potassium channels in its localization in clusters, which would reduce the conductance of the channel (Fox et al., 2013). We characterized two mutations that eliminate an important part of the C-ter, including the domain PRC responsible for clustering. Patients expressing these mutations (non-inherited, with one exception) have mild epileptic phenotypes with cognitive impairments with autistic behavior (Bar et al., 2020).

Our data showed that the overexpression of mutated subunits, which are well expressed at the surface of the cell, reduced the proportion of clustered Kv2.1 as expected, but also redistribute channels into dendrites. Despite the lack of PRC domains, clustering was still present though at low level, most probably due to the heterotetramerization of mutated subunits with endogenous ones. This is likely the situation that would be found in patients, as they are *de novo* mutations affecting only one allele of *Kcnc1* gene. Endogenous WT channels would assure the normal trafficking of heterotetramers containing mutated subunits (Kang et al., 2019). A consequence of this was the change in distribution of endogenous Kv2.1 in presence of mutated subunits. The observed modifications meant that Y533\* and R583\* acted as dominant negative mutations for the distribution of Kv2.1.

In agreement with the hypothesis of heterotetramerization, SPT experiments showed that channels bearing mutated subunits have a diffusive behavior that was intermediate between WT channels and a non-related channel known to freely diffuse in the plasma-membrane. These results hint to the presence of a diverse population of Kv2.1 composed by the several possible combinations of endogenous and mutated  $\alpha$  subunits, together with the reported heteromerization with

silent subunits (Möller et al., 2020). From the distribution of diffusion coefficients, we could distinguish already two distinct populations of WT channels. The less mobile population could be constituted by homotetramers, thus four C-termini with PRC domains, which were immobilized very efficiently by scaffolding interactions. The more mobile would be heterotetramers, for instance Kv2.1-Kv6 subunits, which would have only two PRC and thus are less often or less longer immobilized. When mutated subunits were introduced, the proportion of tetramers with less PRC was increased, therefore the proportion of Kv2.1 belonging to each group changed accordingly. Therefore, whereas homomers were clustered most of the time, heterotetramers constituted by variable combinations of WT, silent (such as Kv6) and mutant subunits (if present) switched between clustered and free states. Considering that Kv2 current would be essentially generated by non-clustered channels, we could expect a large diversity in terms of conductance and voltage dependence of individual channels, that would be influenced by mutated subunits (Kang et al., 2019) or by phosphorylation (Park et al., 2006). This heterogeneity stresses the difficulty to find a good model to investigate the consequences of mutations, that should be ideally neurons instead of heterologous cells. Another consequence is the impossibility to fix a value of Kv2.1 conductance and voltage dependence that represents the ensemble of cells.

Interestingly, the overexpression of WT subunits increased cell excitability. This is compatible with the described role of Kv2 channels in helping to fire AP at high frequencies. However, the results obtained with the model neuron showed that increasing *gkdr2* conductance always decrease cell excitability. Alternatively, we could then explain the higher excitability of cells by a reduction of Kv2 currents due to increased clustering. If we consider that clustering in a dynamic process in which the equilibrium between clustered vs non-clustered fractions would depend upon the probability of binding to scaffolding sites, introducing Kv2.1 WT subunits in excess would mean increasing the proportion of homomeric Kv2.1 that were very efficiently stabilized, as shown by SPT experiments. Thus, our data supports the second possibility.

The results obtained with calcium imaging and patch clamp experiments on cultured hippocampal neurons were in good agreement with previous results (Antonucci et al., 2001; Guan et al., 2007; Hönigsperger et al., 2017; Liu & Bean, 2014). Using these results and others from the literature, we set a biophysical model that helped us to cope with the diversity of Kv2.1 subunit composition in cells by exploring a large number of combinations of conductance and voltage dependence. Interestingly, input/output curves suggest that, depending on Kv2 conductance and voltage dependence, neurons could fire in a different window of stimuli.

Overall, the overexpression of mutant subunits did not introduce substantial modifications of the excitability analyzed by patch clamp, and there was no difference in  $\text{Ca}^{2+}$  signals evoked by low-intensity glutamate uncaging. Indeed, the model hints to subtle changes on excitability that could change the window of optimal performance of the cell. Noteworthy, the C-ter mutants that we characterized are related to mild epileptic phenotypes and they are better described by their association with cognitive impairments.

Dendritic voltage-gated channels play a key role in the propagation of synaptic signals to the soma as well as the backpropagation of action potentials. Collectively,  $\text{K}^+$  channels are crucial determinants of dendritic active properties (Harnett et al., 2013; Hoffman, 2013; Hoffman et al., 1997) and our results comfort an important role for Kv2 channels, despite their slow kinetics, not only in determining neuronal excitability under repetitive AP firing but also in regulating backpropagated AP.

Our results are in agreement with a reduction of Kv2.1 conductance when it is clustered. They also hint that scaffolding interactions are labile, and several PRC are needed to efficiently cluster Kv2 channels. As soon as the number of PRC is reduced, channels would alternate more easily between stabilized and free diffusion states. Indeed Kv2.1 clustering is modulated by a number of stimuli, including excessive excitatory activity, hypoxia and ischemia (Misonou et al., 2004; Mulholland et al., 2008). The dephosphorylation of the channel disperses clusters and causes a hyperpolarized shift of  $V_{1/2}$  and this was proposed as a mechanism of neuroprotection (Misonou et al., 2005).

The relationship between the results obtained here and the pathology is much less clear. We show that mutations related with epileptic encephalopathies had the same effect than the “neuroprotective” declustering of Kv2.1. The discrepancy could raise from several reasons. On one hand, the neuroprotective effect could be observable only in extreme situations, such as the experimental procedures applied to reveal dephosphorylation and de-clustering of Kv2.1 (i.e., bath application of glutamate). Here we only analyzed pyramidal neurons; it would be important to investigate the role of Kv2.1 in inhibitory interneurons.

Finally, the model suggests that increasing Kv2.1 conductance by changing  $g_{\text{Kdr2}}$  and/or  $V_{1/2}$  could reduce the fidelity of the neuron. Interestingly, Combe et al., 2018 proposed that CA1 pyramidal neurons would be optimal to relay activity in the range of relatively low gamma frequencies, a property that was present in the model. They linked this property to  $\text{K}^+$  channels in dendrites,  $\text{Ca}^{2+}$  dependent (SK channels) or voltage dependent (Kv4), that would affect the amplitude of EPSPs.

Our results extend these observations showing that the modification of Kv2 slow DR conductance (i.e., by phosphorylation) could also modify cell reliability. This is also a prediction that could hold to C-ter mutated channels.

In summary, despite the difficulty to seize the effects of changing Kv2.1 currents and the consequences of mutations, our results predict that these channels are in a perfect position to modify the window of responsiveness of neurons, changing their reliability and/or their capacity to undergo plasticity mechanisms.



## **Acknowledgements**

We thank J. R. Martens (University of Florida, USA) for the original GFP-tagged Kv2.1 construction and the IFM imaging platform for their help with the imaging experiments. We thank Fumihiko Niwa (IBENS) for his kind help to set Ca<sup>2+</sup> imaging experiments, glutamate uncaging and optogenetical stimulation.

## **Competing interests**

The authors declare no competing interests in relation to the submitted work.

## **Author contribution**

M. Renner wrote the codes for analysis of immunolabelling and calcium imaging, adapted biophysical models, designed experiments and supervised the experimental work. A-L. Paupiah carried out imaging and electrophysiological experiments, run neuronal simulations and analyzed data. M. Ginisty performed electrophysiological experiments and analyzed data. M. Russeau and X. Yu prepared primary neuronal cultures. I. Mouktine was in charge of designing and preparing plasmids. A. Triller provided the materials and equipment needed for calcium imaging and optogenetics. S. Levi provided the equipment for single particle tracking. JC. Poncer provided materials and equipment for electrophysiology, designed and supervised electrophysiological experiments. A-L. Paupiah and M. Renner prepared the figures and wrote the paper.

## **Financial support**

This work was supported by Sorbonne University (IDEX SUPER), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, as well as by the Agence Nationale de la Recherche (ANR WATT ANR-19-CE16-0005 to SL), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (to SL) and Fondation Française pour la Recherche sur l'Épilepsie (to SL). ALP is recipient of a doctoral fellowship from the Sorbonne Université (Reseau Biologie des Systèmes).

## **Data availability**

All data reported in this paper will be shared upon request. Any additional information required to re-analyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

## References

- Antonucci, D. E., Lim, S. T., Vassanelli, S., & Trimmer, J. S. (2001). Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, *108*(1), 69–81.
- Baddeley, D., Cannell, M. B., & Soeller, C. (2010). Visualization of Localization Microscopy Data. *Microscopy and Microanalysis*, *16*(1), 64–72.
- Bar, C., Barcia, G., Jennesson, M., Le Guyader, G., Schneider, A., Mignot, C., Lesca, G., Breuil-lard, D., Montomoli, M., Keren, B., Doummar, D., Billette de Villemeur, T., Afenjar, A., Marey, I., Gerard, M., Isnard, H., Poisson, A., Dupont, S., Berquin, P., ... Nabbout, R. (2020). Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Human Mutation*, *41*(1).
- Bats, C., Groc, L., & Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*, *53*(5), 719–734.
- Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Eugène, E., Poncer, J. C., & Lévi, S. (2013). Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(39), 15488–15503.
- Combe, C. L., Canavier, C. C., & Gasparini, S. (2018). Intrinsic Mechanisms of Frequency Selectivity in the Proximal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *38*(38), 8110–8127.
- Du, J., Haak, L. L., Phillips-Tansey, E., Russell, J. T., & McBain, C. J. (2000). Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K<sup>+</sup> channel subunit Kv2.1. *The Journal of Physiology*, *522*(Pt 1), 19–31.
- Fox, P. D., Loftus, R. J., & Tamkun, M. M. (2013). Regulation of Kv2.1 K<sup>+</sup> Conductance by Cell Surface Channel Density. *The Journal of Neuroscience*, *33*(3), 1259–1270.
- Goutierre, M., Al Awabdh, S., Donneger, F., François, E., Gomez-Dominguez, D., Irinopoulou, T., Menendez de la Prida, L., & Poncer, J. C. (2019). KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels. *Cell Reports*, *28*(1), 91–103.e7.

- Guan, D., Armstrong, W. E., & Foehring, R. C. (2013). Kv2 channels regulate firing rate in pyramidal neurons from rat sensorimotor cortex. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 19), 4807–4825.
- Guan, D., Tkatch, T., Surmeier, D. J., Armstrong, W. E., & Foehring, R. C. (2007). Kv2 subunits underlie slowly inactivating potassium current in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 581(Pt 3), 941–960.
- Harnett, M. T., Xu, N.-L., Magee, J. C., & Williams, S. R. (2013). Potassium channels control the interaction between active dendritic integration compartments in layer 5 cortical pyramidal neurons. *Neuron*, 79(3), 10.1016/j.neuron.2013.06.005.
- Herrington, J., Zhou, Y.-P., Bugianesi, R. M., Dulski, P. M., Feng, Y., Warren, V. A., Smith, M. M., Kohler, M. G., Garsky, V. M., Sanchez, M., Wagner, M., Raphaelli, K., Banerjee, P., Ahaghotu, C., Wunderler, D., Priest, B. T., Mehl, J. T., Garcia, M. L., McManus, O. B., ... Slaughter, R. S. (2006). Blockers of the Delayed-Rectifier Potassium Current in Pancreatic  $\beta$ -Cells Enhance Glucose-Dependent Insulin Secretion. *Diabetes*, 55(4), 1034–1042.
- Hoffman, D. A. (2013).  $K^+$  Channel Regulation of Multicompartmental Signal Integration. *Neuron*, 79(3), 403–405.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M., & Johnston, D. (1997).  $K^+$  channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, 387(6636).
- Hönigsperger, C., Nigro, M. J., & Storm, J. F. (2017). Physiological roles of Kv2 channels in entorhinal cortex layer II stellate cells revealed by Guangxitoxin-1E. *The Journal of Physiology*, 595(3), 739–757.
- Johnson, B., Leek, A. N., & Tamkun, M. M. (2019). Kv2 channels create endoplasmic reticulum / plasma membrane junctions: A brief history of Kv2 channel subcellular localization. *Channels (Austin, Tex.)*, 13(1), 88–101.
- Kang, S. K., Vanoye, C. G., Misra, S. N., Echevarria, D. M., Calhoun, J. D., O'Connor, J. B., Fabre, K. L., McKnight, D., Demmer, L., Goldenberg, P., Grote, L. E., Thiffault, I., Saunders, C., Strauss, K. A., Torkamani, A., van der Smagt, J., van Gassen, K., Carson, R. P., Diaz, J., ... Kearney, J. A. (2019). Spectrum of Kv2.1 Dysfunction in KCNB1-Associated Neurodevelopmental Disorders. *Annals of Neurology*, 86(6).
- Kirmiz, M., Palacio, S., Thapa, P., King, A. N., Sack, J. T., & Trimmer, J. S. (2018). Remodeling neuronal ER–PM junctions is a conserved nonconducting function of Kv2 plasma membrane ion channels. *Molecular Biology of the Cell*, 29(20), 2410–2432.

- Lim, S. T., Antonucci, D. E., Scannevin, R. H., & Trimmer, J. S. (2000). A Novel Targeting Signal for Proximal Clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel in Hippocampal Neurons. *Neuron*, 25(2), 385–397.
- Liu, P. W., & Bean, B. P. (2014). Kv2 Channel Regulation of Action Potential Repolarization and Firing Patterns in Superior Cervical Ganglion Neurons and Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 34(14), 4991–5002.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 102(3), 527–540.
- Meier, J., Vannier, C., Sergé, A., Triller, A., & Choquet, D. (2001). Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nature Neuroscience*, 4(3).
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., Park, E. W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., Anderson, A. E., & Trimmer, J. S. (2004). Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nature Neuroscience*, 7(7).
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2005). Kv2.1: A Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Critical to Dynamic Control of Neuronal Excitability. *NeuroToxicology*, 26(5), 743–752.
- Möller, L., Regnier, G., Labro, A. J., Blunck, R., & Snyders, D. J. (2020). Determining the correct stoichiometry of Kv2.1/Kv6.4 heterotetramers, functional in multiple stoichiometrical configurations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9365–9376.
- Mulholland, P. J., Carpenter-Hyland, E. P., Hearing, M. C., Becker, H. C., Woodward, J. J., & Chandler, L. J. (2008). Glutamate transporters regulate extrasynaptic NMDA receptor modulation of Kv2.1 potassium channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(35), 8801–8809.
- Murakoshi, H., Shi, G., Scannevin, R. H., & Trimmer, J. S. (1997). Phosphorylation of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel Alters Voltage-Dependent Activation. *Molecular Pharmacology*, 52(5), 821–828.
- Murakoshi, H., & Trimmer, J. S. (1999). Identification of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel as a Major Component of the Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Rat Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19(5), 1728–1735.
- O'Connell, K. M. S., Loftus, R., & Tamkun, M. M. (2010). Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12351–12356.

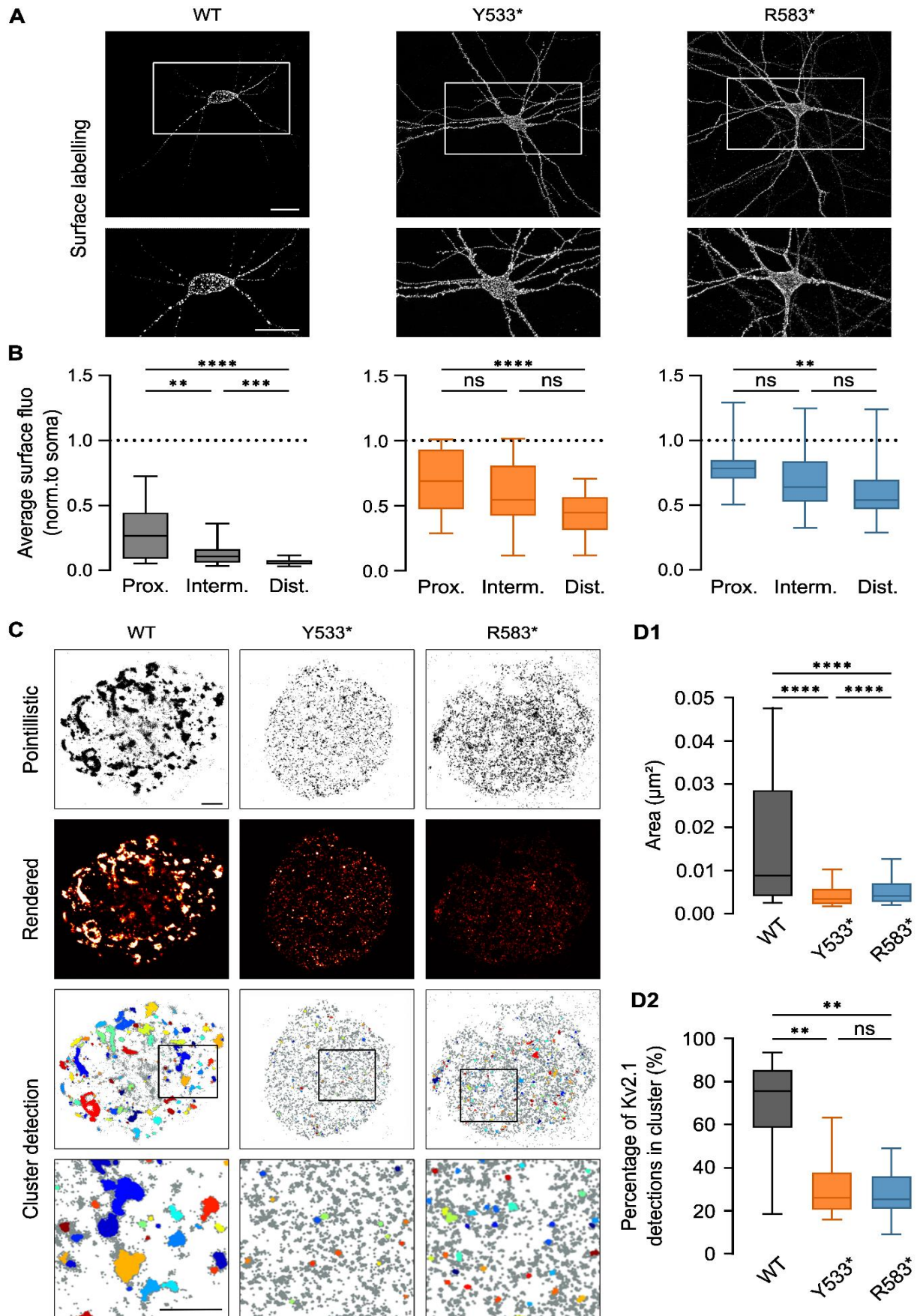
- Palacio, S., Chevaleyre, V., Brann, D. H., Murray, K. D., Piskorowski, R. A., & Trimmer, J. S. (2017). Heterogeneity in Kv2 Channel Expression Shapes Action Potential Characteristics and Firing Patterns in CA1 versus CA2 Hippocampal Pyramidal Neurons. *ENeuro*, *4*(4).
- Park, K.-S., Mohapatra, D. P., Misonou, H., & Trimmer, J. S. (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science*, *313*(5789), 976–979.
- Paupiah, A.-L., Marques, X., Merlaud, Z., Russeau, M., Levi, S., & Renner, M. (2023). Introducing Diinamic, a flexible and robust method for clustering analysis in single-molecule localisation microscopy. *Biological Imaging*, 1–31.
- Poirazi, P., Brannon, T., & Mel, B. W. (2003). Pyramidal Neuron as Two-Layer Neural Network. *Neuron*, *37*(6), 989–999.
- Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., Buchillier, V., & Markram, H. (2019). A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 358.
- Raus Balind, S., Magó, Á., Ahmadi, M., Kis, N., Varga-Németh, Z., Lőrincz, A., & Makara, J. K. (2019). Diverse synaptic and dendritic mechanisms of complex spike burst generation in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Nature Communications*, *10*, 1859.
- Renner, M., Wang, L., Levi, S., Hennekinne, L., & Antoine, T. (2017). A Simple and Powerful Analysis of Lateral Subdiffusion Using Single Particle Tracking. *Biophysical Journal*, *113*, 2452–2463.
- Ribrault, C., Reingruber, J., Petković, M., Galli, T., Ziv, N. E., Holcman, D., & Triller, A. (2011). Syntaxin1A Lateral Diffusion Reveals Transient and Local SNARE Interactions. *Journal of Neuroscience*, *31*(48), 17590–17602.
- Saitsu, H., Akita, T., Tohyama, J., Goldberg-Stern, H., Kobayashi, Y., Cohen, R., Kato, M., Ohba, C., Miyatake, S., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Miyake, N., Fukuda, A., & Matsumoto, N. (2015). De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Scientific Reports*, *5*(1).
- Specca, D. J., Ogata, G., Mandikian, D., Bishop, H. I., Wiler, S. W., Eum, K., Wenzel, H. J., Doisy, E. T., Matt, L., Campi, K. L., Golub, M. S., Nerbonne, J. M., Hell, J. W., Trainor, B. C., Sack, J. T., Schwartzkroin, P. A., & Trimmer, J. S. (2014). Deletion of the Kv2.1 delayed rectifier potassium channel leads to neuronal and behavioral hyperexcitability. *Genes, Brain, and Behavior*, *13*(4), 394–408.
- Specht, C. G., Izeddin, I., Rodriguez, P. C., El Beheiry, M., Rostaing, P., Darzacq, X., Dahan, M., & Triller, A. (2013). Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: Counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron*, *79*(2), 308–321.

- Steinert, J. R., Robinson, S. W., Tong, H., Haustein, M. D., Kopp-Scheinpflug, C., & Forsythe, I. D. (2011). Nitric oxide is an activity-dependent regulator of target neuron intrinsic excitability. *Neuron*, *71*(2), 291–305.
- Thiffault, I., Speca, D. J., Austin, D. C., Cobb, M. M., Eum, K. S., Safina, N. P., Grote, L., Farrow, E. G., Miller, N., Soden, S., Kingsmore, S. F., Trimmer, J. S., Saunders, C. J., & Sack, J. T. (2015). A novel epileptic encephalopathy mutation in KCNB1 disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *The Journal of General Physiology*, *146*(5).
- Trimmer, J. S. (2015). Subcellular Localization of K<sup>+</sup> Channels in Mammalian Brain Neurons: Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron*, *85*(2), 238–256.
- Vacher, H., Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2008). Localization and Targeting of Voltage-Gated Ion Channels in Mammalian Central Neurons. *Physiological Reviews*, *88*(4), 1407–1447.
- Vierra, N. C., Kirmiz, M., van der List, D., Santana, L. F., & Trimmer, J. S. (2019). Kv2.1 mediates spatial and functional coupling of L-type calcium channels and ryanodine receptors in mammalian neurons. *ELife*, *8*, e49953.
- Yuan, L.-L., & Chen, X. (2006). Diversity of potassium channels in neuronal dendrites. *Progress in Neurobiology*, *78*(6), 374–389.

## Figures and figure legends

**Figure 1: The expression of Y533\* and R583\* mutant Kv2.1 redistributed channels into dendritic compartments. (A)** Top panels: confocal images (maximum projections) of WT and mutant Kv2.1-GFP expressed in cultured hippocampal neurons, labeled with surface anti-GFP Alexa-647 nanobodies. Bottom panels: higher magnification of the regions indicated by the white squares. Scale bars: 30  $\mu\text{m}$ . **(B)** Average fluorescence intensity of Kv2.1-GFP staining as in A, in proximal (0-50  $\mu\text{m}$  from soma), intermediate (50-100  $\mu\text{m}$ ) and distal (100-150  $\mu\text{m}$ ) dendrites, normalized to the average intensity at the soma (horizontal discontinuous line). Median and 10%-90% IQR. ANOVA with Friedman tests. ns: not significant; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 10$  to 11 pyramidal neurons from 4 independent cultures. **(C)** Single-molecule localization microscopy analysis of clustering. Upper panels: Pointillistic and rendered images of STORM detections of surface Kv2.1 GFP labeled with anti-GFP Alexa-647 nanobodies. The focal plane corresponds to the top of the soma of cultured hippocampal neurons expressing WT and mutant Kv2.1-GFP. Lower panels: detection of clusters. The detected clusters appear in different colors. The area indicated by the black squares is shown at higher magnification at the bottom panels. Scale bars: 1  $\mu\text{m}$ . **(D)** Quantification of Kv2.1 cluster's area (D1) and percentage of detections in clusters (D2). Median and 10%-90% IQR. Kruskal-Wallis with Dunn tests. ns: not significant; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 7$  to 10 pyramidal neurons from 2 independent cultures.

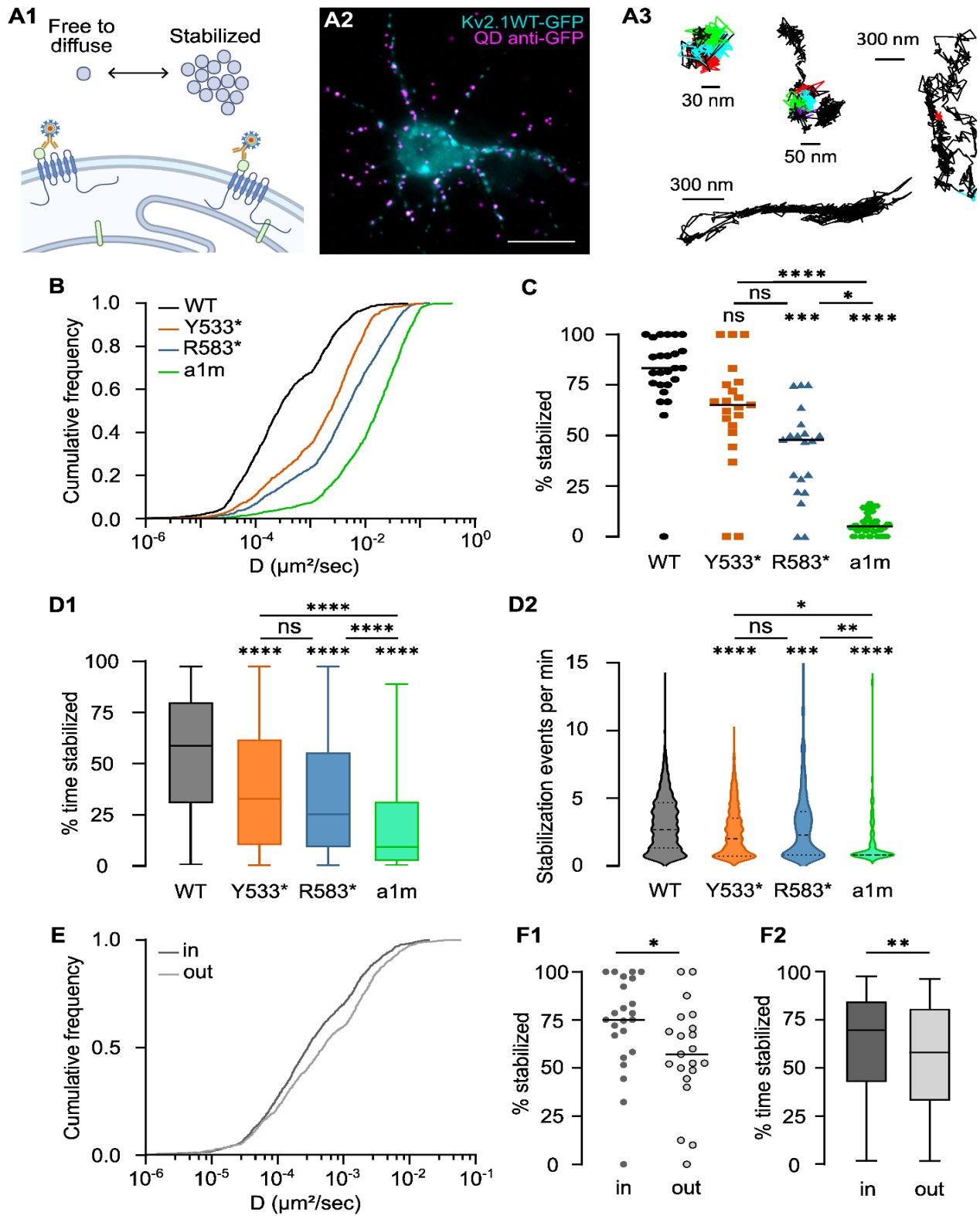
**Fig. 1**





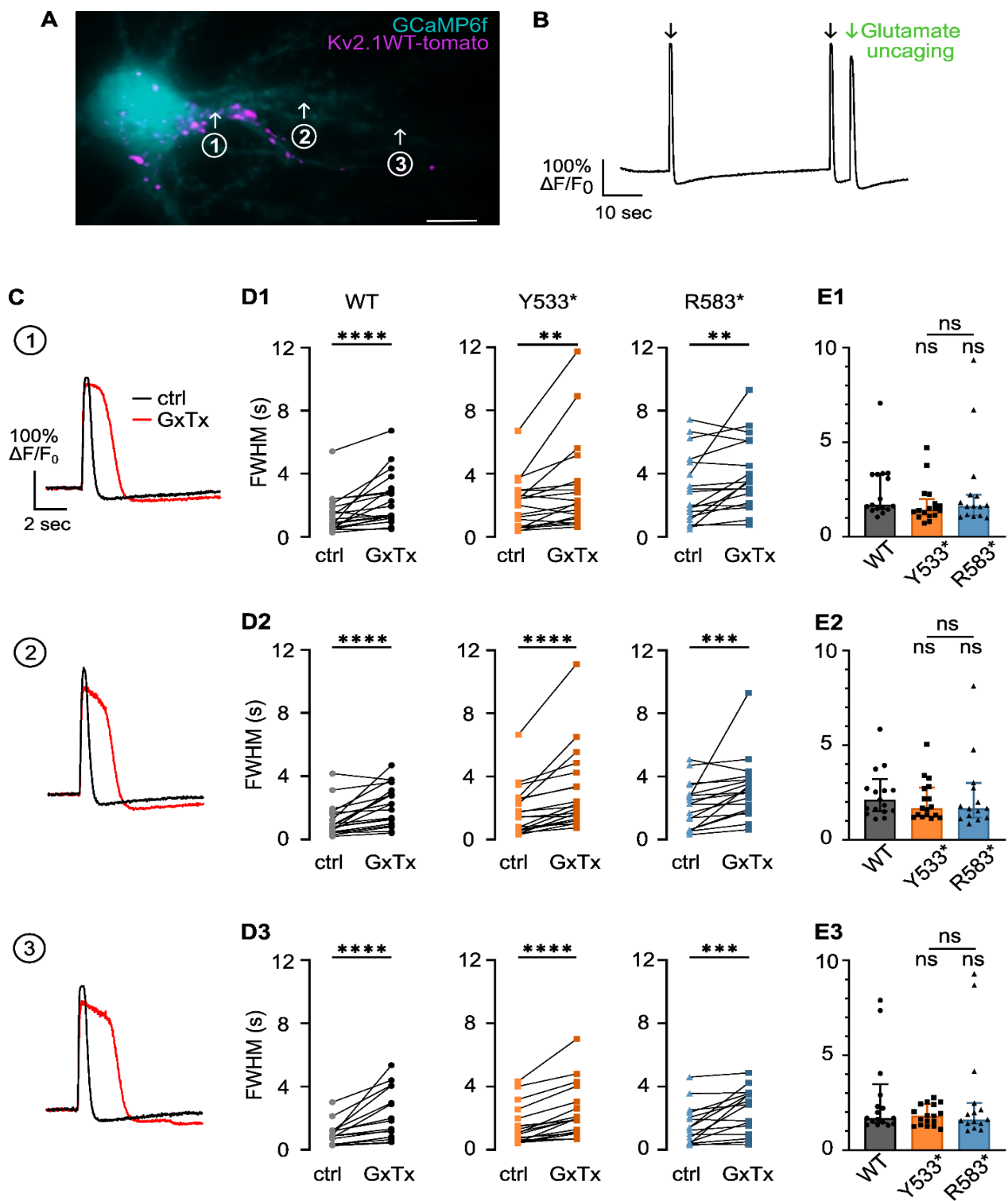
**Figure 2: Impaired immobilization of membrane channels carrying mutated subunits. (A)** Analysis of lateral diffusion using single particle tracking and *Pc* analysis (Renner et al., 2017). **(A1)** Schematic of a possible diffusion-capture mechanism behind the formation of clusters and single particle tracking of Kv2.1GFP. Kv2.1 might be captured and immobilized in clusters by interactions with VAPA/VAPB proteins at ER-PM junctions (Kirmiz et al., 2018). **(A2)** Epifluorescence image of Kv2.1WT-GFP expressing neuron (cyan) labelled with antiGFP-QD (magenta). Scale bar: 20  $\mu$ m. **(A3)** Examples of reconstruction of 75 s trajectories. In color: periods of stabilization (immobilization) detected with *Pc* analysis (see Supplemental Fig. S2). **(B)** Cumulative frequency distribution of the diffusion coefficient *D* of Kv2WT-GFP (black), Kv2Y533\*-GFP (red), Kv2R583\*-GFP (blue) and a1m (green) trajectories. Kruskal-Wallis with Dunn tests.  $p < 0.0001$ ,  $n = 974-1658$  trajectories. **(C)** Percentage of trajectories in B with at least one stabilization event (independently of the duration of the event). Each symbol represents one recording. Horizontal line: median value. Kruskal-Wallis with Dunn tests. ns: not significant; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n = 20-30$  recordings. **(D1-2)** Analysis of the stabilization events for the trajectories in B. Percentage of time spent in stabilization events (D1, median and 10%-90% IQR) and number of stabilization events per minute (D2, violin plots). Kruskal-Wallis with Dunn tests. ns: not significant; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **(E)** Cumulative frequency of *D* for Kv2.1WT colocalizing (in) or not (out) with Kv2.1WT-GFP fluorescent clusters. Mann-Whitney test.  $p < 0.0001$ ,  $n = 747-1095$  trajectories. **(F1)** Percentage of stabilized trajectories for the data in E. Each symbol represents one recording. Horizontal line: median. Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ ,  $n = 20-30$  recordings. **(F2)** Percentage of time spent in stabilization events for the trajectories in E (median and 10%-90% IQR). Mann-Whitney test. \*\* $p < 0.01$ . All data obtained from 3 independent neuronal cultures.

**Fig. 2**



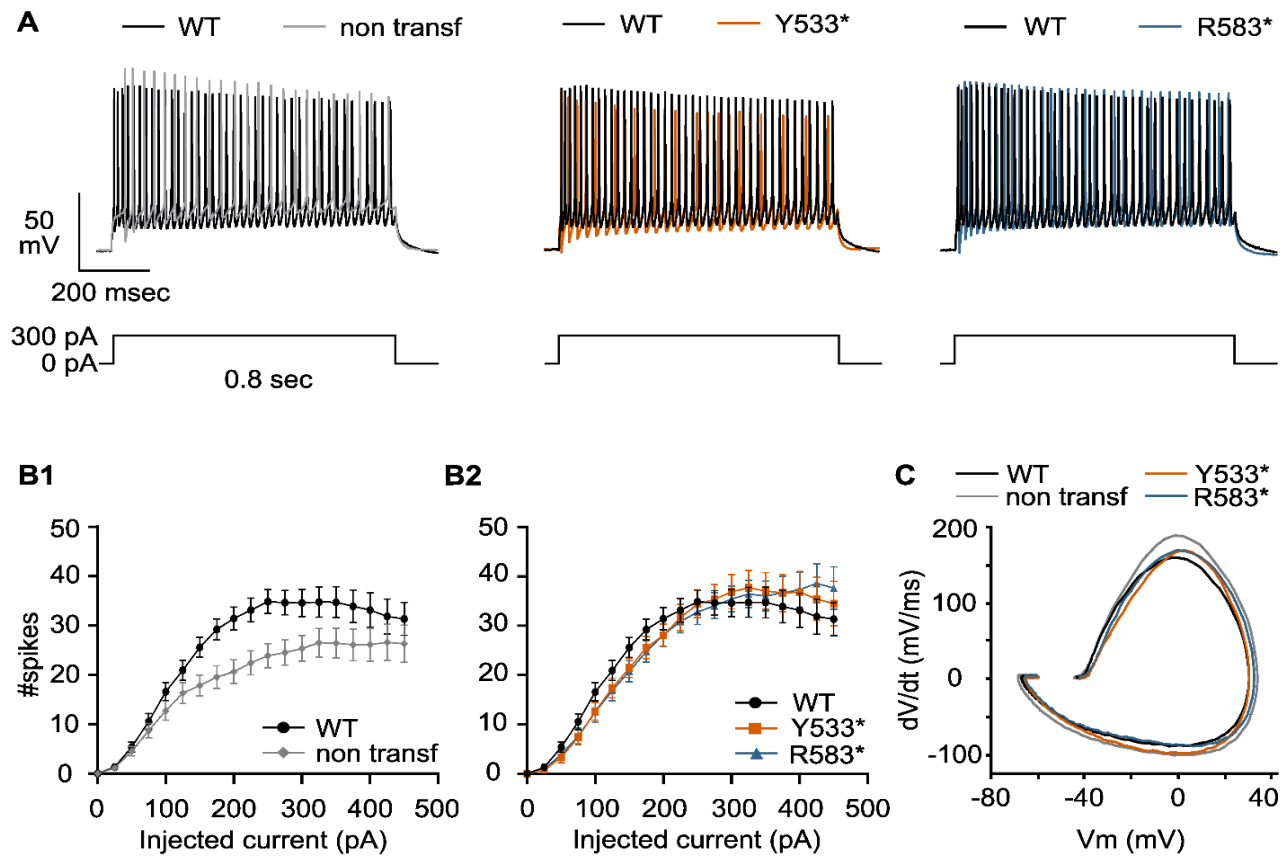
**Figure 3. Dendrite Ca<sup>2+</sup> transients are prolonged Kv2 blockade.** **(A)** Epifluorescence image of a cultured hippocampal neuron expressing GCaMP6f and Kv2.1WT-tomato. Fluorescence was recorded at proximal ① and more distal ②③ positions on the dendrites. Scale bar: 10  $\mu$ m. **(B)** Example of GCaMP6f fluorescence traces due to spontaneous activity (black arrows) or evoked by glutamate uncaging (green arrow). **(C)** Examples of GCaMP6f fluorescence traces evoked by glutamate uncaging before (ctrl, in black) and after application of Kv2 specific blocker Guanxitoxin-1E (GxTx, in red) at the 3 recorded positions. **(D)** Width (FHWM, in s) of evoked GCaMP6f fluorescence peaks before and after application of GxTx at proximal (D1) and distal (D2, D3) locations in a dendrite of a pyramidal neuron expressing WT or mutated Kv2.1. Wilcoxon tests. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 15-17$  pyramidal neurons from 4 independent cultures. **(E)** Ratio of change of the width (after/before) at proximal (E1) and distal (E2, E3) locations. Wilcoxon tests. Median and 10%-90% IQR. Kruskal-Wallis with Dunn tests. ns: not significant.  $n = 15-17$  neurons 4 independent cultures.

**Fig. 3**



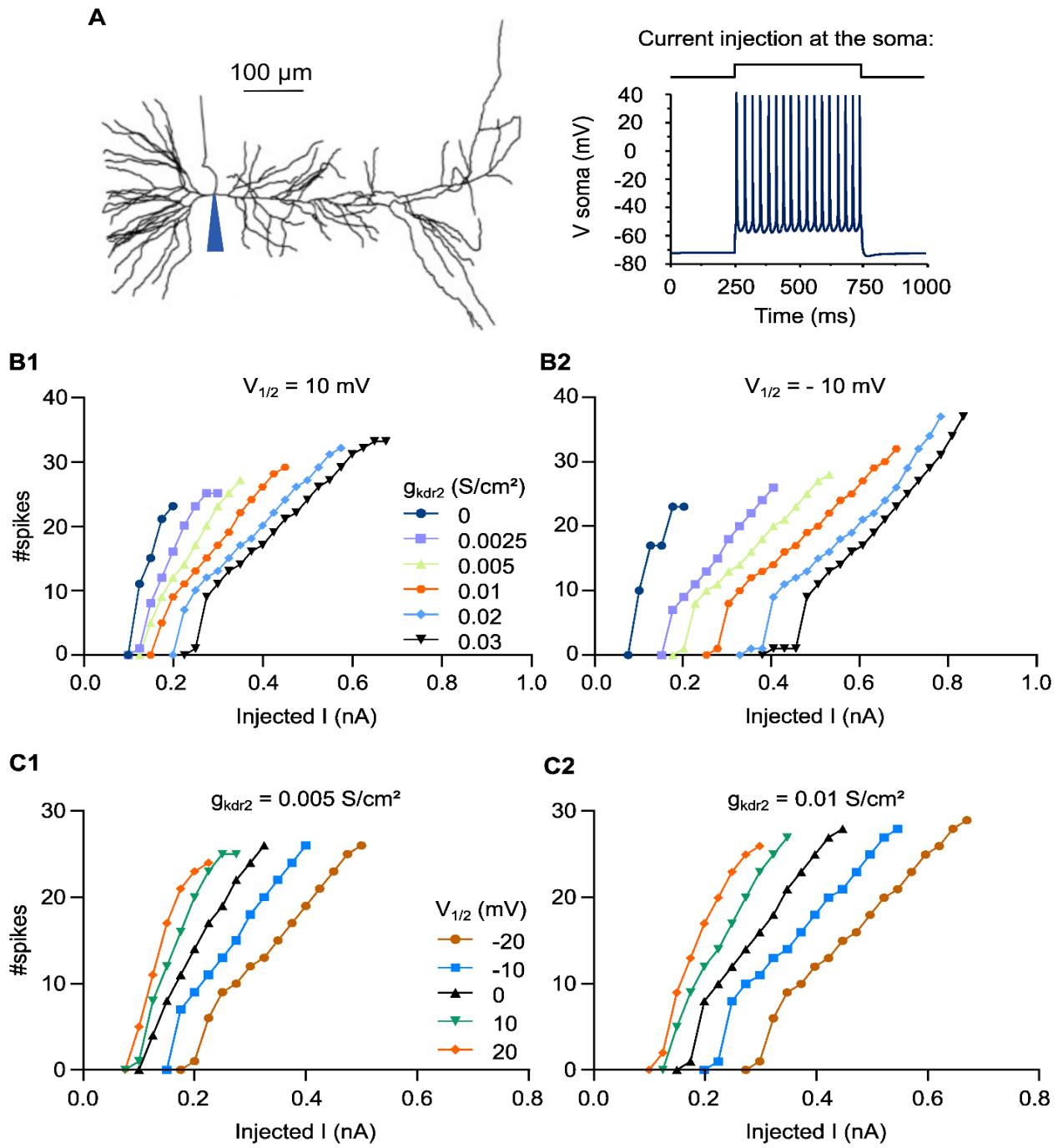
**Figure 4. The expression of WT and mutant Kv2.1 alters neuronal excitability. (A)** Representative membrane voltage traces in non-transfected or transfected pyramidal neurons as indicated, obtained applying a depolarizing current pulse of 300 pA. **(B)** F-I curves in non-transfected vs Kv2.1WT expressing pyramidal neurons (B1); and for WT vs mutated Kv2.1 expressing neurons (B2). n = 20-31 cells. **(C)** Mean phase plots of action potentials recorded on the indicated groups of neurons.

**Fig. 4**



**Figure 5. Simulations of varying Kv2 conductance on a biophysical model of CA1 pyramidal neuron and its consequences on excitability. (A)** Left panel: morphology of the cell used (pc2B, Megías et al., 2001) in NEURON simulation environment. The blue triangle represents the somatic position of the simulated patch clamp. Right panel: response of the model to a step of current injected into the soma ( $I_{inj}$ , 0.15 nA) during 500 ms. **(B)** Input/output curves obtained with the indicated Kv2 conductance ( $g_{Kdr2}$ ) with a  $V_{1/2}$  of 10 mV (B1) or -10 mV (B2). **(C)** Input/output curves obtained with the indicated  $V_{1/2}$  and a conductance of 0.005 S/cm<sup>2</sup> (C1) or 0.01 S/cm<sup>2</sup> (C2).

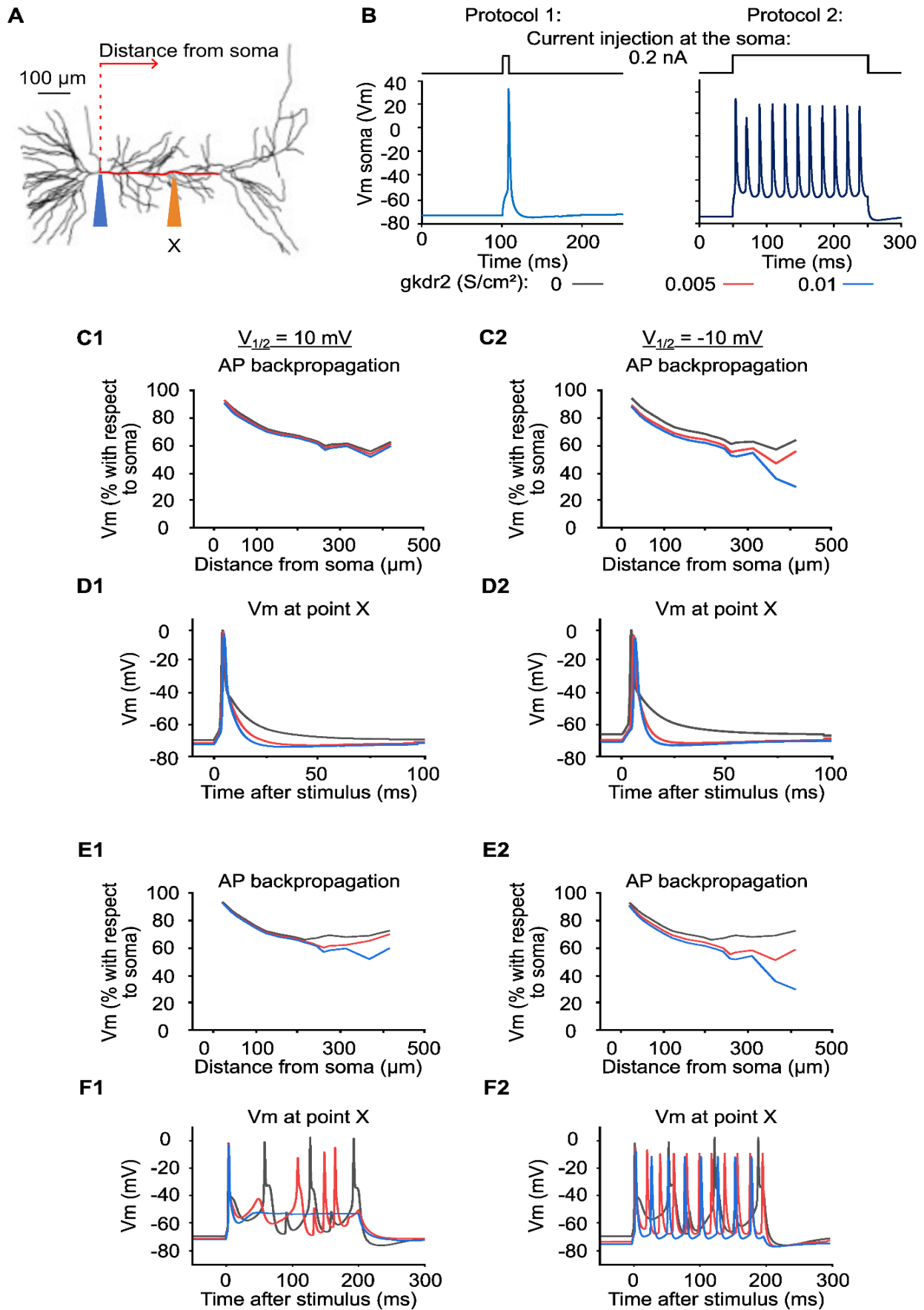
Fig. 5





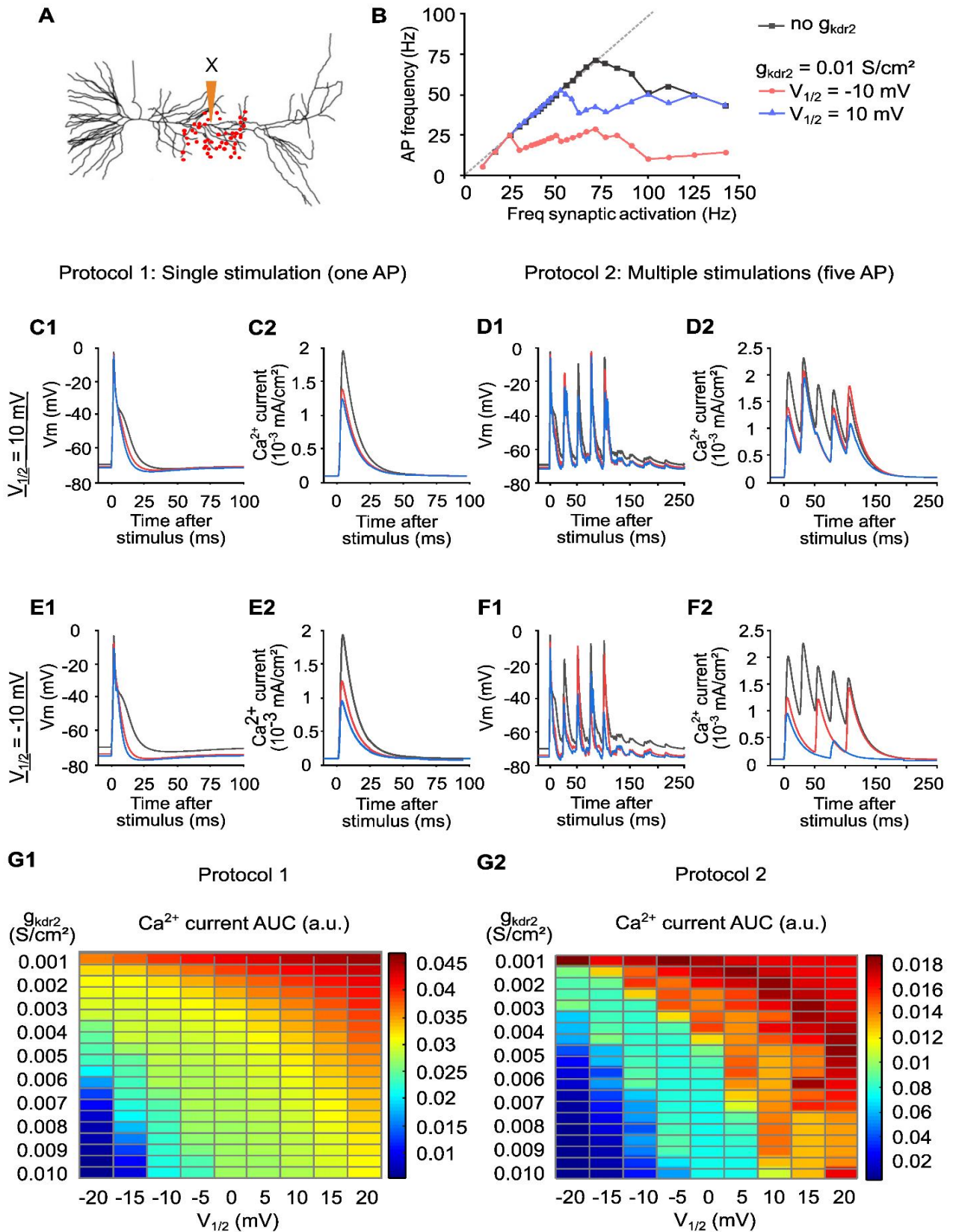
**Figure 6. Kv2 activity modulated backpropagated AP depending on the duration of AP trains and Kv2 voltage dependence. (A)** Schematic of the model highlighting the main apical dendrite (red line) and showing the positions of current injection (blue triangle) and recording (orange triangle, point X at 247  $\mu\text{m}$  from the soma). **(B)** Two protocols of stimulation were used: a short pulse (4 ms, 0.2 nA) that elicited one AP (protocol 1) or a step (200 ms, 0.2 nA) that induced several AP (protocol 2). **(C and D)** Results obtained with protocol 1 and  $V_{1/2}$  of 10 (C1, D1) or -10 (C2, D2) mV. **C1, C2:** Peak voltage along the main apical dendrite in case of absence of Kv2 conductance (black) or  $g_{\text{Kdr2}}$  of 0.005 (red) or 0.01 (blue) S/cm<sup>2</sup>. **D1, D2:** Membrane voltage vs time at point X for simulations with the conductance values described in C. **(E and F)** Results obtained with protocol 2 and  $V_{1/2}$  of 10 (E1, F1) or -10 (E2, F2) mV. **E1, E2:** Peak voltage along the main apical dendrite in case of absence of Kv2 conductance (black) or  $g_{\text{Kdr2}}$  of 0.005 (red) or 0.01 (blue) S/cm<sup>2</sup>. **F1, F2:** membrane voltage vs time at point X for the conductance values described in E.

**Fig. 6**



**Figure 7. The responses of the model were strongly affected by changes in Kv2 conductance during sustained synaptic stimulation. (A)** Schematic of the model with approximate positions of the simulated synaptic inputs (red dots, 45 locations on oblique branches of apical dendrites) and the recording point (orange triangle). **(B)** Model output in response to repetitive activation of synapses (10 times) at the indicated frequencies. The discontinuous line represents 1:1 correspondence between the stimulation and the obtained frequency of AP. Curves correspond to a simulation in absence (no  $g_{Kv2}$ , black), or presence of Kv2 channels simulated with a conductance of 0.01 S/cm<sup>2</sup> and  $V_{1/2}$  of -10 mV (red) or 10 mV (blue). **(C and E)** Responses to one AP fired after synaptic activation (protocol 1), in case of absence of Kv2 conductance (black) or  $g_{Kv2}$  of 0.005 (red) or 0.01 (blue) S/cm<sup>2</sup> and  $V_{1/2}$  of 10 (C1, C2) or -10 (E1, E2) mV. **C1, E1:** Membrane voltage vs time at point X. **C2, E2:** Ca<sup>2+</sup> transients at point X. **(D and F)** Responses to five AP fired after multiple synaptic activation (protocol 2), in case of absence of Kv2 conductance (black) or  $g_{Kv2}$  of 0.005 (red) or 0.01 (blue) S/cm<sup>2</sup> and  $V_{1/2}$  of 10 (D1, D2) or -10 (F1, F2) mV. **D1, F1:** Membrane voltage vs time at point X. **D2, F2:** Ca<sup>2+</sup> transients at point X. **G1-2:** Heat maps of the area under the curve (AUC) of Ca<sup>2+</sup> transients at point X, for protocol 1 (G1) and 2 (G2) for the indicated combinations of  $g_{Kv2}$  and  $V_{1/2}$ .

**Fig. 7**



## Supplemental Material and Figures

### NEURON mechanism to model Kv2 currents

Kv2 channel model was implemented using the NMODL extension of NEURON (Carnevale & Hines, 2006). The algorithm (called mechanism in NEURON) was modified from the mechanism created by M. Migliore (2002) based on data from Zhou and Hablitz (1996) and using the equations proposed by Borg-Graham (1989) (ICGenealogy id 1869, ModelDB id 3660, <https://icg.neurotheory.ox.ac.uk/channels/1/1869>, Podlaski et al. 2017). The algorithm was modified to include inactivation using scripts proposed by Poirazi et al. 2003. Kv2 current ( $I_{kv2}$ ) was then modeled following a Hodgkin-Huxley-like formalism as follows:

$$I_{kv2} = g_{kdr2} n^4 l (V_m - E_K)$$

where  $g_{kdr2}$  represents the maximal Kv2 conductance,  $n$  and  $l$  the gating variables for activation and inactivation, respectively, and  $E_K$  the reversal potential of  $K^+$ . The dynamics of the gating variables were simulated by the ODE:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{(n_{\infty} - n)}{\tau_n}$$

$$\frac{dl}{dt} = \frac{(l_{\infty} - l)}{\tau_l}$$

where the activation and inactivation steady-state functions  $n_{\infty}$  and  $l_{\infty}$ , and their time constants  $\tau_n$  and  $\tau_l$ , were given by

$$n_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V_m - V_{1/2n})/k_n}}$$

$$l_{\infty} = \frac{1 - b}{1 + e^{(V_m - V_{1/2l})/k_l}} + b$$

$$\tau_n = \frac{e^{\gamma(V_m - V_{1/2n})/kn}}{\alpha_0 Q_{10} \left( 1 + e^{\frac{A}{RT}(V_m - V_{1/2n})} \right)}$$

$$\tau_l = \frac{e^{\gamma(V_m - V_{1/2l})/kl}}{\beta_0 Q_{10} \left( 1 + e^{\frac{A}{RT}(V_m - V_{1/2l})} \right)}$$

All activation parameters except  $V_{1/2n}$  (modified between simulations) and the effect of temperature ( $Q_{10}$ ) were those of the original mechanism. Inactivation parameters were adjusted to obtain  $I_{kv2}$  curves comparable to experimental data available on <https://channelpedia.epfl.ch/wikipages/9> (supplemental Fig. S5).

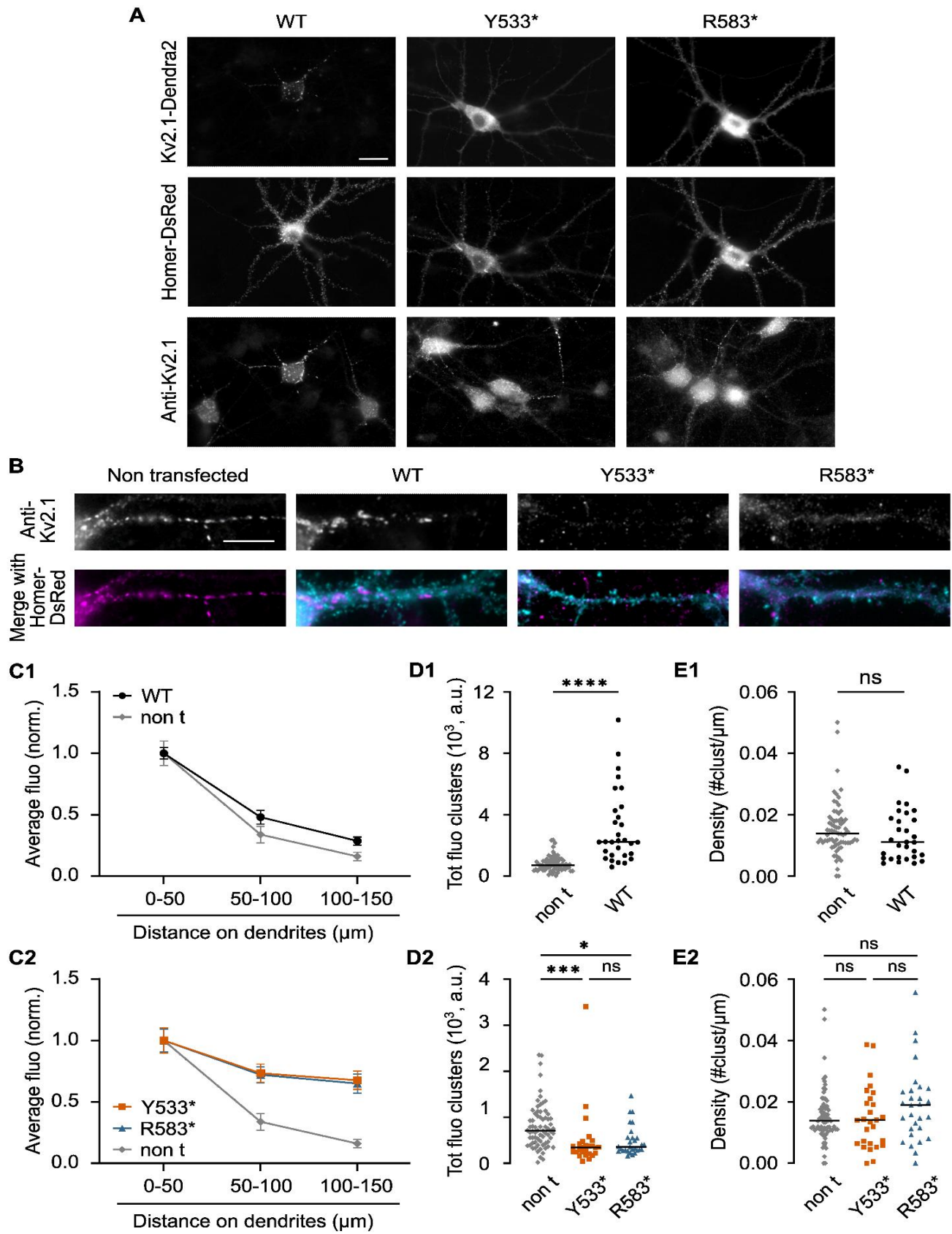
### Supplemental references

- Borg-Graham, L. J. (1989). Modelling The Somatic Electrical Response Of Hippocampal Pyramidal Neurons. *MIT Artificial Intelligence Laboratory, A.I. Technical Report No. 1161*.
- Carnevale, N. T. and Hines, M. L. (2006). *The NEURON Book*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2006.
- Podlaski, W. F., Seeholzer, A., Groschner, L. N., Miesenböck, G., Ranjan, R., Vogels, T.P. (2017). Mapping the function of neuronal ion channels in model and experiment. *eLife*. 6;6:e22152.
- Zhou, F. M., Hablitz, J.J (1996). Layer I neurons of the rat neocortex. II. Voltage-dependent outward currents. *Journal of Neurophysiology*, 76(2):668-82.

## Supplemental figures

**Figure S1. Endogenous Kv2.1 was redistributed in presence of mutated  $\alpha$  subunits Y533\* and 583\*.** **(A)** Epifluorescence images of hippocampal cultured neurons co-transfected with WT or mutant Kv2.1-Dendra2 (top panels) and Homer-DsRed (middle panels), immunolabeled with an anti-Kv2.1 antibody targeting the C-ter absent in mutant subunits (bottom panels). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Top panels: epifluorescence images of dendrites labelled with anti-Kv2.1 antibody (top panels) in non-transfected and transfected cells as in A. Bottom panels: merge images of anti-Kv2.1 immunolabelling (magenta) and Homer-DsRed (cyan). Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . **(C)** Quantification of anti-Kv2.1 staining along dendrites (average fluorescence, mean with SEM) in non-transfected and Kv2.1WT expressing neurons (C1) or neurons expressing WT or mutant Kv2.1-Dendra2 (C2).  $n = 27$  to 30 pyramidal neurons from 3 independent cultures. **(D)**. Total fluorescence in clusters for the cells in C1 (D1) and C2 (D2). Each symbol represents a cell (horizontal line: median value). Mann-Whitney (D1) or Kruskal-Wallis with Dunn tests (D2). ns: not significant; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 27$  to 30 pyramidal neurons from 3 independent cultures. **(E)** Density of clusters along the dendrite (number of clusters/ $\mu\text{m}$ ) for the cells in C1 (E1) or C2 (E2). Each symbol represents a cell, horizontal line: median value. Mann-Whitney (E1) or Kruskal-Wallis with Dunn tests (E2). ns: not significant.  $n = 27$  to 30 pyramidal neurons from 3 independent cultures.

**Fig. S1**

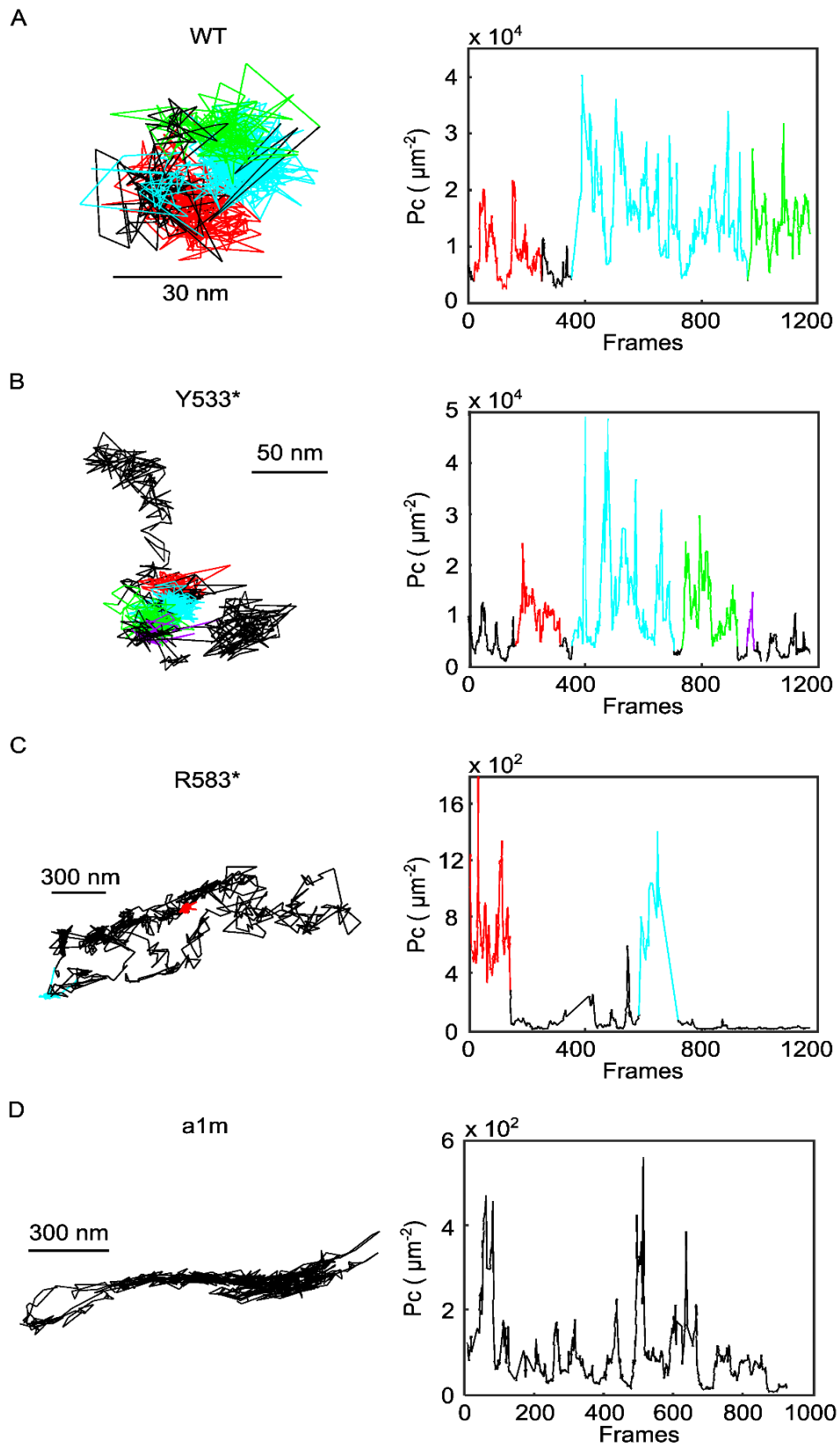




**Figure S2: Single particle tracking and detection of stabilization events by  $P_c$  analysis.**

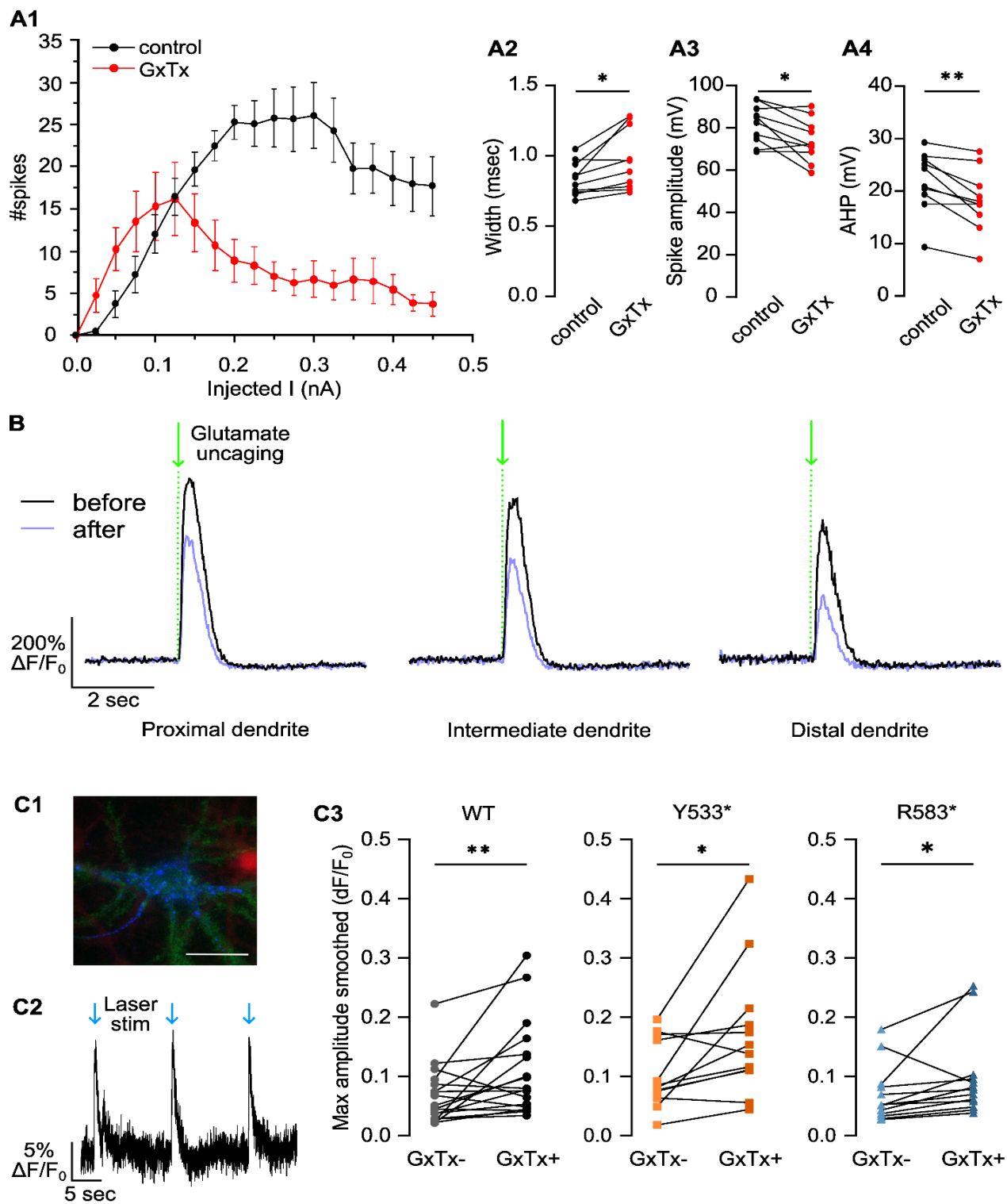
Left: examples of typical trajectories of QD-bound Kv2.1WT (A), Kv2.1Y533\* (B) Kv2.1R583\* (C) or a1m (D). In color: segments recognized as stabilization events (one color per event) following  $P_c$  analysis. Left: position of the stabilization events on the trajectories. Right:  $P_c$  metric in time (one frame = 75 ms) for the trajectories on the left, showing the detection of stabilization events based on the thresholding of  $P_c$ . In these experiments, given the localization precision, the threshold was set to  $4500 \mu\text{m}^{-2}$ .

**Fig. S2**



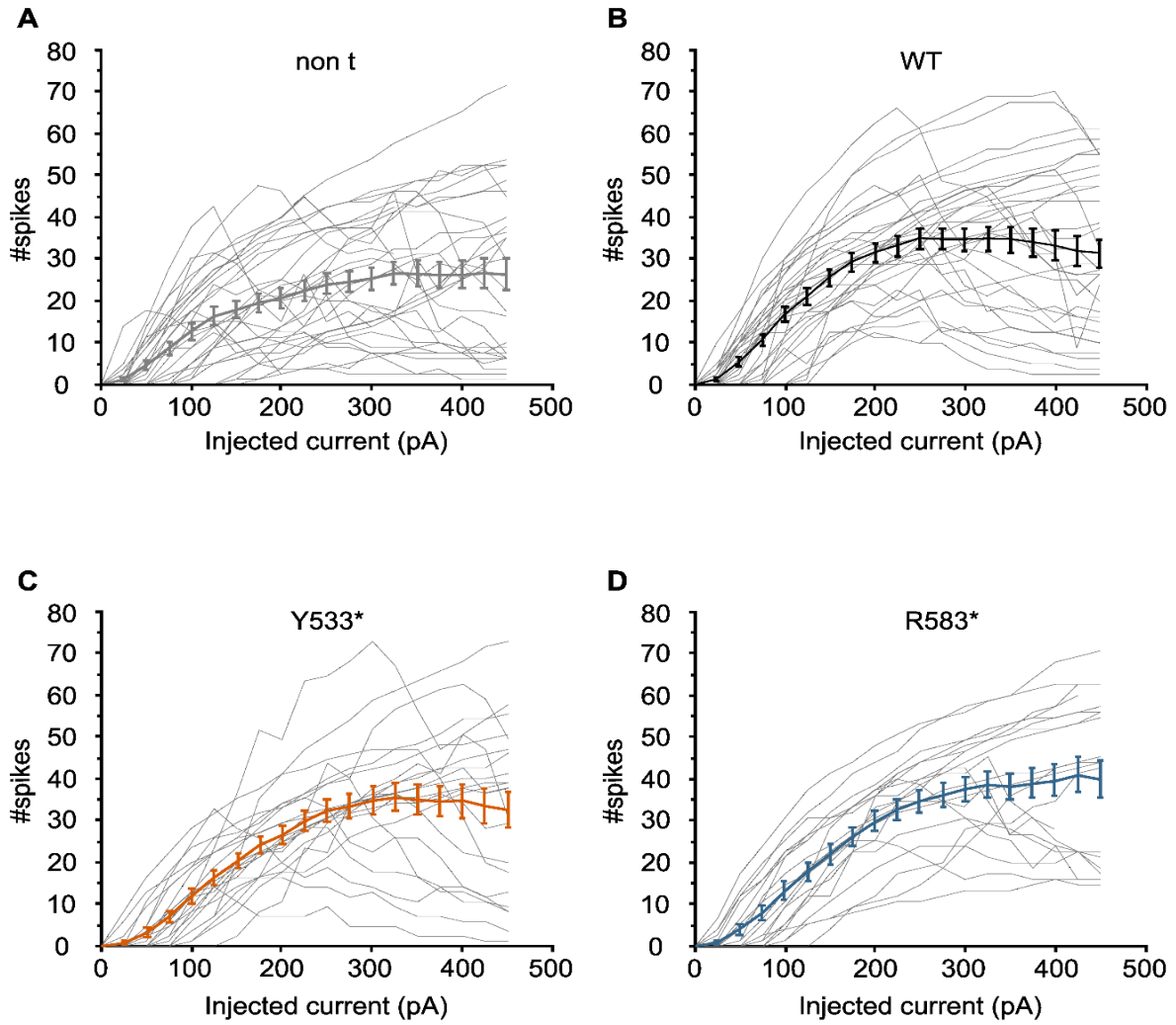
**Figure S3: Calcium imaging and Kv2 blockade. (A)** Effect of the specific Kv2 blocker Guanxitoxin-1E (GxTx) on the excitability of cultured hippocampal neurons. Responses of pyramidal neurons to somatic current injection in patch clamp experiments. (A1) Input/output curve in pyramidal neurons, treated (GxTx) or not (control) with GxTx. Mean with SEM. (A2-4) Characteristics of the first AP at rheobase: width (A2), amplitude (A3) and AHP (A4). Paired t-tests. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .  $n = 10$  pyramidal neurons from 2 independent cultures. **(B)** GCaMP6f fluorescence photobleaching by glutamate uncaging with a 405 nm laser pulse. Examples of calcium transients evoked by glutamate uncaging before or after the addition of control solution (ACSF) to the cell media on proximal, intermediate and distal dendrite. The reduction of amplitude of the second peak was considered as the effect of photobleaching due to the uncaging laser pulse. **(C)** Optogenetic activation of pyramidal neurons. Epifluorescence image of a pyramidal neuron transfected with CheRiff (in green), WT Kv2.1-GFP (in blue), loaded with CaTM3 dye (in red) to monitor intracellular calcium concentration. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$  (C1). Examples of CaTM3 calcium transients in the soma upon three activations of the CheRiff (C2). Quantification of the maximum amplitude of transients in pyramidal neurons transfected with WT or mutated Kv2.1. Wilcoxon tests. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .  $n = 12$  to 18 pyramidal neurons from 5 independent cultures.

**Fig. S3**



**Figure S4. Heterogeneity of responses of cultured hippocampal pyramidal neurons.** F-I curves of non-transfected cells (non t, A), Kv2.1WT-expressing cells (B) or cells expressing Kv2.1Y533\* (C) or Kv2.1R583\* (D). Grey thin lines: curves of individual neurons. Color lines: mean with SEM.

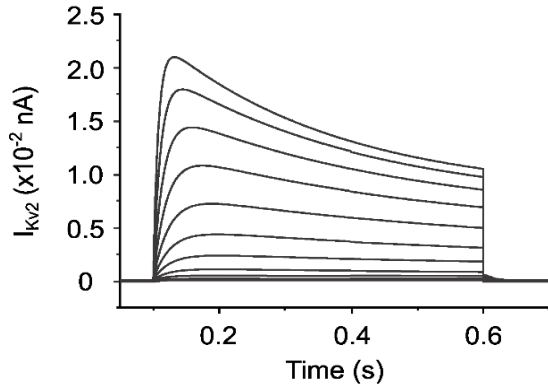
**Fig. S4**



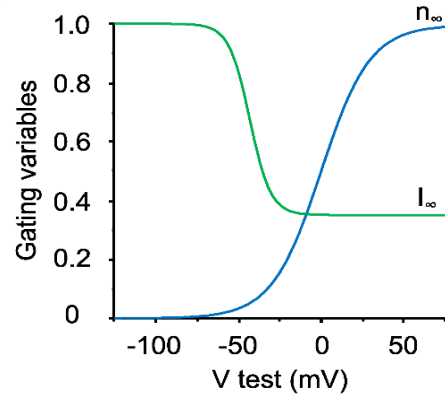
**Figure S5. Simulation of Kv2 currents  $I_{Kv2}$ .** The algorithm calculating Kv2 currents was tested by introducing Kv2 conductance into a cylindrical model cell constructed with NEURON (diameter = 30  $\mu\text{m}$ , length = 30  $\mu\text{m}$ ) with standard passive properties ( $g_{\text{pas}} = 10^{-4} \text{ S}/\mu\text{m}^2$ ,  $R_a = 150 \text{ ohm}/\text{cm}$ ,  $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) and  $E_K = -85 \text{ mV}$ . **(A)**  $I_{Kv2}$  evoked by 10 mV steps from -80 mV to 50 mV (500 ms long, from 100 ms after starting the simulation). **(B)** Plot of the voltage dependence of steady-state gating variables  $n_\infty$  and  $l_\infty$ , for  $V_{1/2 n} = 0 \text{ mV}$ . **(C)** Plots of the voltage dependence of the activation ( $\tau_n$ , C1) and inactivation ( $\tau_l$ , C2) time constants.

**Fig. S5**

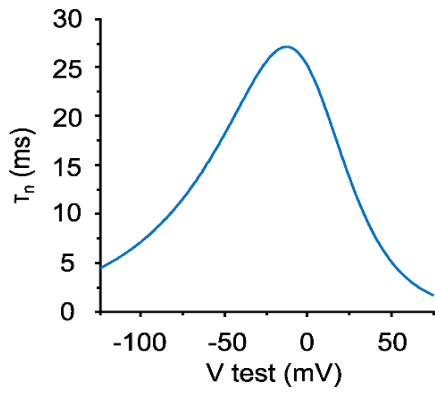
**A**  $V_{test}$ : -80 to 50 mV (jumps of 10 mV)



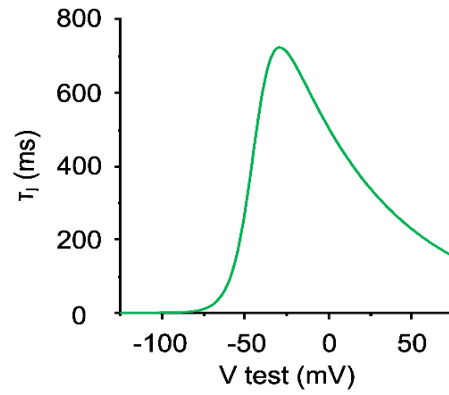
**B**



**C1**



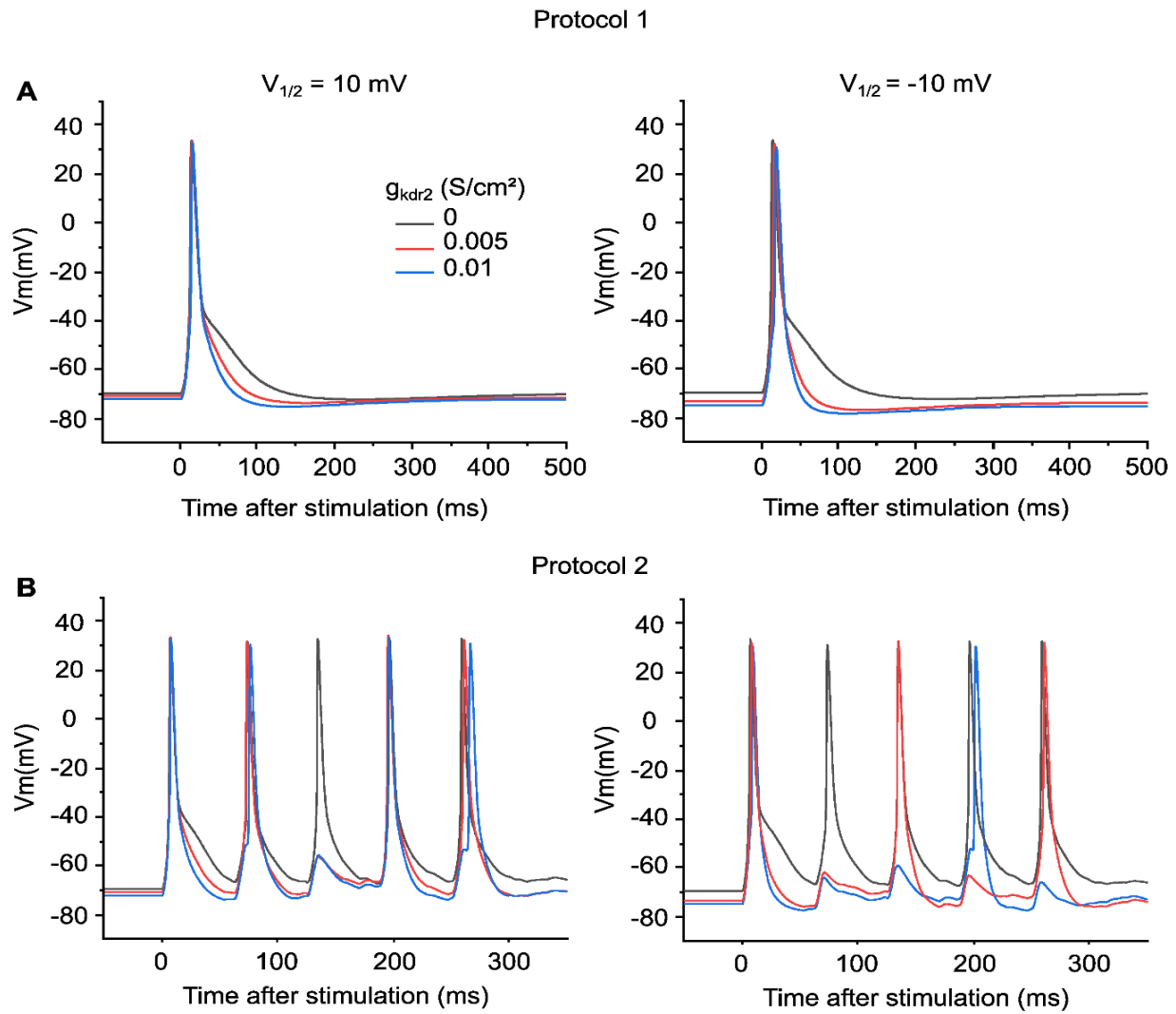
**C2**





**Figure S6. Model output in response to repetitive activation of synapses. (A)**  $V_m$  recorded at the soma in case of synaptic stimulation following protocol 1, in absence of Kv2 conductance (black) or  $g_{kdr2}$  of 0.005 (red) or 0.01 (blue) S/cm<sup>2</sup> and  $V_{1/2}$  of 10 (left) or -10 (right) mV. **(B)**  $V_m$  recorded at the soma in case of multiple synaptic stimulation at 40 Hz (protocol 2), in absence of Kv2 conductance (black) or  $g_{kdr2}$  of 0.005 (red) or 0.01 (blue) S/cm<sup>2</sup> and  $V_{1/2}$  of 10 (left) or -10 (right) mV.

Fig. S6



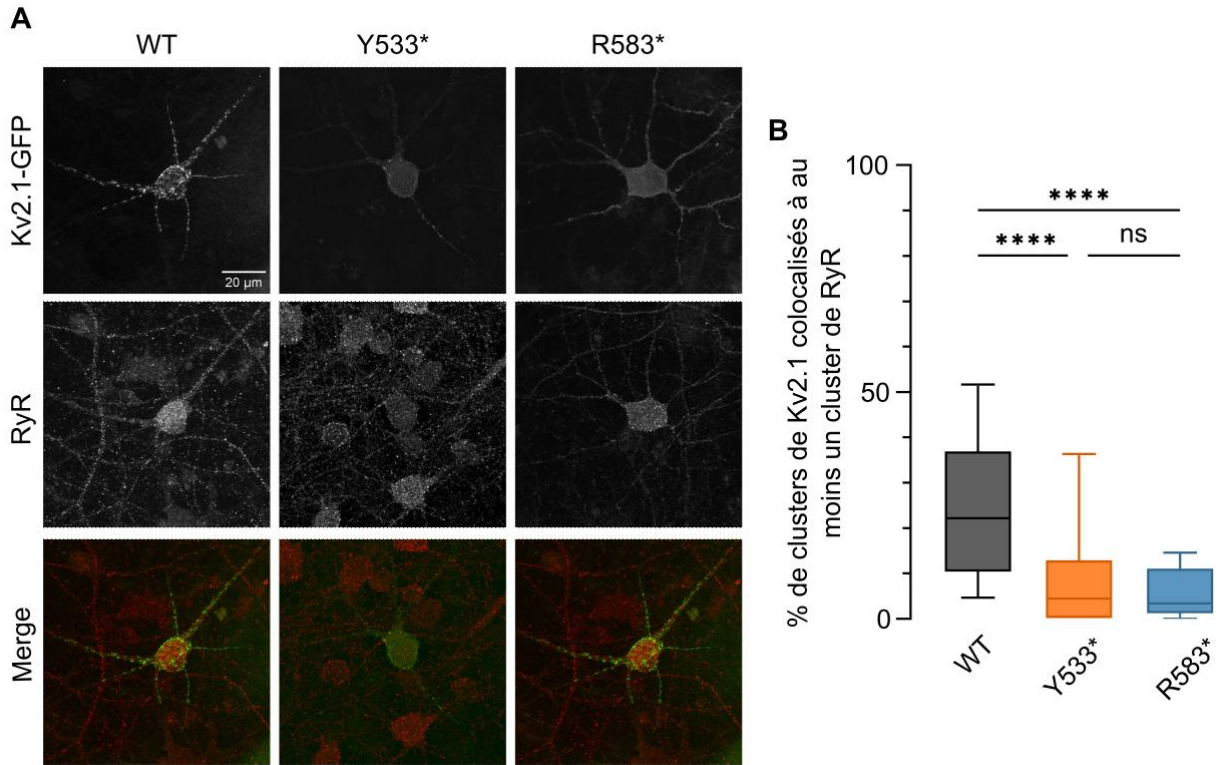
## II. Etude de la colocalisation entre les clusters de Kv2.1 et les RyR du RE

Comme mentionné dans l'introduction, l'un des rôles non canoniques proposés des canaux Kv2.1 est le rôle structurel que ceux-ci pourraient avoir dans les jonctions entre la membrane plasmique des neurones et le RE. Au niveau de ces points de jonction mis en évidence par microscopie électronique, les sous-unités de Kv2.1 interagiraient avec les protéines VAP du RE (B. Johnson et al., 2018; Kirmiz et al., 2018; E. W. Sun & De Camilli, 2018). Il a récemment été proposé que ces zones de contact soient impliquées dans la recapture du calcium et la signalisation calcique locale, notamment par la mise en évidence que les clusters de Kv2.1 et Cav1.2 colocalisent dans des neurones hippocampiques cultivés dissociés (Fox et al., 2015). Cette proximité induirait la formation de microdomaines de signalisation facilitant la génération de signaux calciques très localisés. La dispersion des clusters de Kv2.1 mène à une réduction de la taille des clusters de RyR et de la colocalisation de ces derniers avec les Cav1.2 et inversement (Vierra et al., 2019).

L'observation du clustering altéré dans le cas des sous-unités mutées, sous la forme de clusters de plus petites tailles, m'a poussé à me demander quel serait l'impact de la réduction de la taille des clusters de Kv2.1 sur les points de contacts avec le RE. J'ai donc émis l'hypothèse que la réduction de la taille des clusters de Kv2.1 réduirait la colocalisation avec les clusters de RyR au niveau du RE. Pour tester cette hypothèse j'ai donc transfecté des neurones pyramidaux avec des constructions Kv2.1WT, Y533\* et R583\* associés à une GFP et ai réalisé un double marquage contre la GFP et contre les RyR.

Dans une première série d'expériences, j'ai utilisé la microscopie confocale en prenant des stacks d'images des neurones transfectés (Figure 19A). En ne considérant que le soma, ces images ont été analysées à l'aide du plugin DiAna sur ImageJ (Gilles et al., 2017) qui permet à l'aide d'un seuil de délimiter les clusters dans chaque plan focal du stack et de les reconstruire dans le volume pour une meilleure quantification de la colocalisation en 3D. Pour déterminer la proportion de colocalisation, j'ai compté le nombre de clusters de Kv2.1 colocalisés à au moins un cluster de RyR par rapport au nombre total de clusters de Kv2.1. Sur DiAna, la colocalisation inclut les objets qui se touchent, se chevauchent ou se superposent. Le pourcentage de clusters de Kv2.1 colocalisés diminue pour les mutations Y533\* (4.51%,  $p < 0.0001$ ) et R583\* (3.45%,  $p < 0.0001$ ) (Figure 19B). Cependant plusieurs points peuvent être soulevés lors de l'analyse de

ces images. De prime abord, il apparait une diminution significative de la colocalisation des mutants par rapport au WT, mais il est intéressant de noter que le pourcentage de colocalisation de la condition WT n'est que de 22.19% ce qui ne semble pas retranscrire la forte colocalisation décrite dans la littérature.



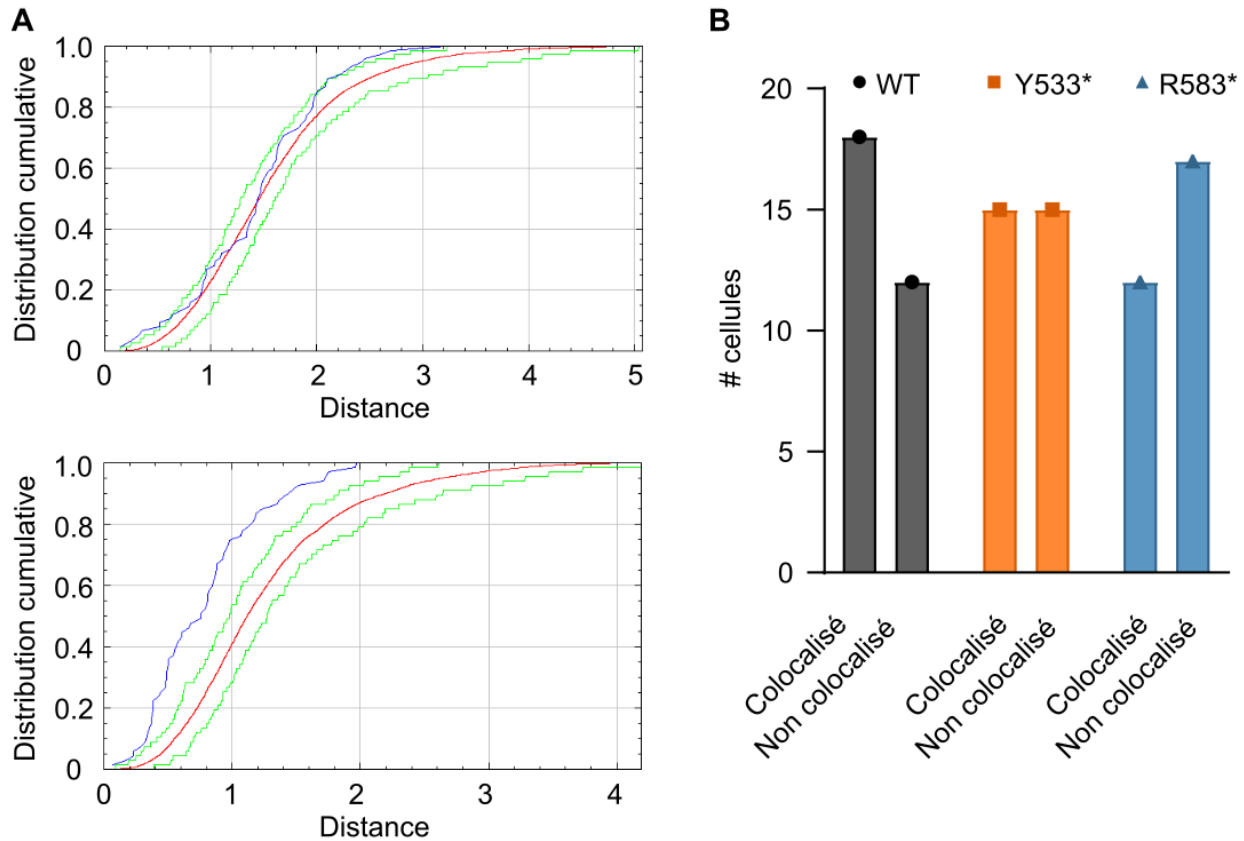
**Figure 19.** Etude de la colocalisation des clusters de Kv2.1 avec les clusters de RyR en imagerie confocale.

**(A)** Projections maximales des stacks de microscopie confocale du marquage de Kv2.1-GFP, du RyR et merge (Kv2.1-GFP en vert et RyR en rouge) dans des neurones hippocampiques en culture transfectés avec des constructions Kv2.1-GFP WT, Y533\* et R583\*. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

**(B)** Quantification du pourcentage de clusters de Kv2.1 colocalisé à au moins un cluster de RyR. n = 29 à 30 cellules sur 3 cultures indépendantes. Médiane et IQR 10% – 90%. Test KW et post-hoc de Dunn ; ns : non significatif ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Le plugin DiAna permet de comparer la colocalisation obtenue à la suite des analyses réalisées à une colocalisation obtenue suite à 100 brassages aléatoires des clusters de l'image. De cette façon, l'analyse indique si la colocalisation est due au nombre élevé de clusters, comme cela est le cas pour les clusters de RyR. Le plugin indique alors de façon graphique si la colocalisation des clusters de Kv2.1 et RyR est significativement différente d'une colocalisation aléatoire (Figure 20A1) ou non (Figure 20A2). Le résultat obtenu est hétérogène, avec une colocalisation

significative dans certaines cellules et pas dans d'autres. Dans la figure, cela correspond aux cellules classifiées en « colocalisé » et « non colocalisé » respectivement (Figure 20B). La quantification du nombre de cellules montre une proportion de cellules dont la colocalisation est significative, légèrement plus importante pour les cellules exprimant le Kv2.1WT avec 60% de colocalisation significative mais de façon inattendue cette proportion est également élevée dans le cas des Kv2.1 mutés, respectivement 50% et 40% pour le Kv2.1Y533\* et Kv2.1R583\* (Figure 20B).



**Figure 20.** Signification statistique de la colocalisation entre les clusters de Kv2.1 et RyR en imagerie confocale.

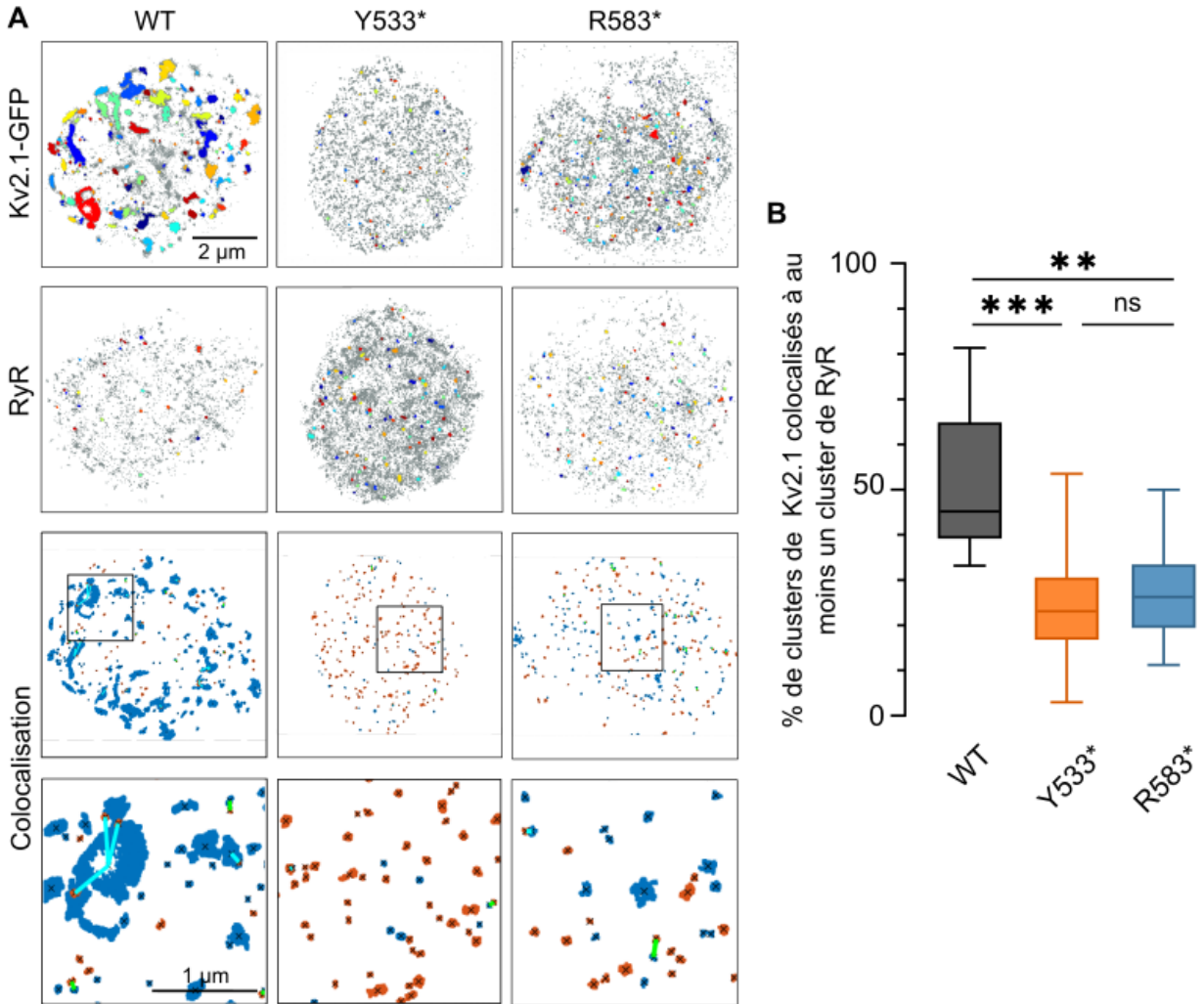
**(A)** Graphes de la distribution cumulative des distances minimales des centroïdes entre les clusters de deux images. La courbe expérimentale en bleu montre la distribution pour les images expérimentales. La courbe rouge montre la distribution aléatoire moyenne des distances entre les clusters de RyR et de 100 images de Kv2.1 obtenues après brassage. La courbe verte représente les intervalles de confiance à 2,5 et 97,5% autour de la moyenne. Si la courbe expérimentale est localisée en dehors de l'intervalle de confiance à 95% de l'analyse de distance effectuée après randomisation, la colocalisation est considérée comme statistiquement significative.

**(B)** Quantification du nombre de cellules dont la colocalisation est considérée comme significative (« colocalisé ») ou non significative (« non colocalisé ») pour les neurones Kv2.1-GFP WT ou mutés.

Une critique qui peut être émise ici est la segmentation des clusters de Kv2.1 mutés qui est particulièrement difficile sur ces images. Comme le montre les résultats de clustering des mutants (Figure 1 de l'article), ceux-ci sont capables de former des clusters de petites tailles qui ne sont que très peu résolus en épifluorescence classique. Avec un simple seuil d'intensité pour définir les clusters, il est alors difficile de différencier ces derniers du marquage diffus.

Dans une deuxième série d'expériences, j'ai donc décidé d'utiliser la microscopie de super-résolution pour accéder à la position la plus précise des clusters de Kv2.1 mutés. Pour accéder uniquement à la fraction des sous-unités de Kv2.1 exprimées à la surface, j'ai marqué la GFP dans des neurones transfectés avec les constructions Kv2.1-GFP avant fixation avec un nanocorps anti-GFP puis le RyR après fixation. De cette façon, la proportion de détections du Kv2.1 provenant du volume de la cellule est limitée, réduisant le bruit propre à ce type de microscopie et rendant l'analyse des clusters plus claire (Figure 21A). Le pourcentage de clusters de Kv2.1 colocalisé en condition WT, 45,20% est supérieur à celui estimé en microscopie confocale. Ce pourcentage diminue pour les mutations Y533\* (23,12%,  $p < 0.0008$ ) et R583\* (26,29%,  $p < 0.0062$ ) (Figure 21B).

L'utilisation des deux techniques de microscopie aboutit aux mêmes conclusions bien que les fourchettes de valeurs soient différentes. La proportion de clusters de Kv2.1 colocalisés à au moins un cluster de RyR est réduite dans les neurones exprimant les Kv2.1Y533\* et Kv2.1R583\* comparé au Kv2.1WT. En se basant sur l'étude de Vierra et al., 2019, un questionnement peut alors être posé sur le rôle proposé du Kv2.1 sur la signalisation calcique. Les auteurs ont montré qu'une dispersion des clusters de Kv2.1, entraîne la dissociation des Cav1.2 et des RyR ce qui limiterait la recapture du  $Ca^{2+}$  dans les réserves calciques de la cellule et ne pourrait pas empêcher les augmentations excessives du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique après de longues périodes d'activité neuronale (Vierra et al., 2019). Les mutations pourraient alors être causales aux troubles identifiés par l'altération de cette fonction non canonique.



**Figure 21.** Etude de la colocalisation des clusters de Kv2.1 avec les clusters de RyR en microscopie de super-résolution.

**(A)** Images pointillistes de la détection de clusters en différentes couleurs de Kv2.1 (panels du haut) et RyR (panel du centre) dans des neurones hippocampiques en culture transfectés avec des constructions Kv2.1 WT, Y533\* et R583\* et images combinées des clusters de Kv2.1 en bleu et RyR en rouge (panel du bas). Les clusters colocalisés sont mis en évidence par des traits cyan s'ils sont superposés, ou verts s'ils sont sous le seuil de distance. Barre d'échelle : 2 µm.

**(B)** Quantification du pourcentage de clusters de Kv2.1 colocalisé à au moins un cluster de RyR. n = 10 à 12 cellules sur 2 cultures indépendantes. Médiane et IQR 10% – 90%. Test KW et post-hoc de Dunn ; ns : non significatif ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

La principale et majeure remarque qui laisse penser que ces résultats peuvent être biaisés est la qualité et la difficulté d'obtenir un marquage de RyR convenable pour une analyse correcte des clusters. En regardant les images de microscopie confocale, il est aisé de se rendre compte que le marquage peut sembler non spécifique (Figure 19A). Malheureusement, l'utilisation

d'autres marqueurs du RE tels que la transfection d'une construction VAPA-GFP ou l'utilisation d'un anticorps ciblé contre VAPA n'a pas permis d'améliorer le marquage. Ici, il pourrait être intéressant d'utiliser la microscopie électronique (Rosenbluth, 1962) pour visualiser les points de contact à la membrane plasmique dans le cas des neurones exprimant un Kv2.1WT ou muté afin d'évaluer si la perte des clusters de Kv2.1 entraîne la rétractation du RE.

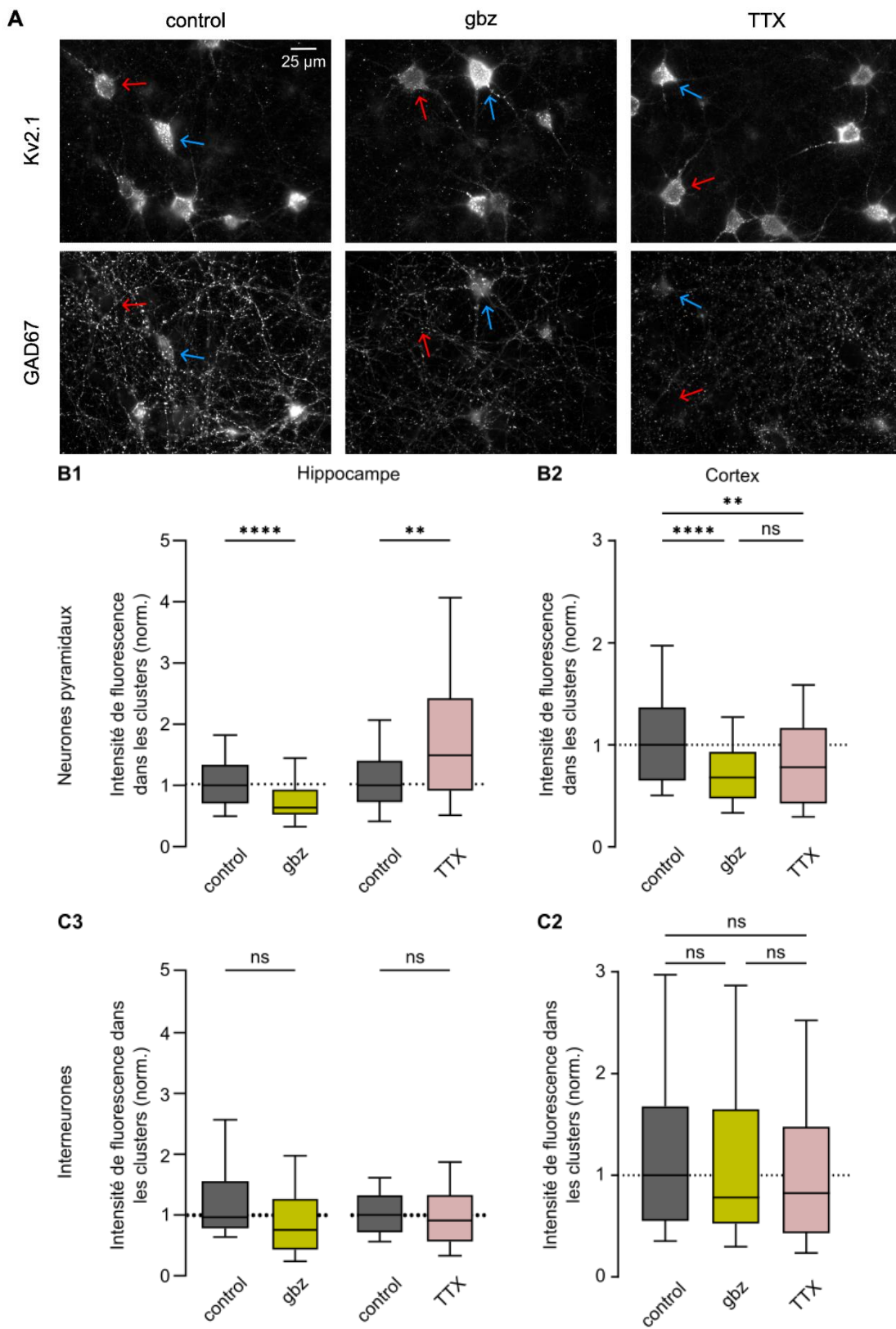


### III. Impact de l'activité neuronale sur l'état de phosphorylation du Kv2.1

La littérature propose que suivant l'état de phosphorylation de la queue C-ter des sous-unités Kv2.1, leur capacité à former des clusters est modifiée. Or, il est également proposé que cette capacité soit liée à l'activité neuronale via des acteurs de phosphorylation ou de déphosphorylation de la queue C-ter (Misonou et al., 2004; Surmeier & Foehring, 2004).

Sur la base de données préliminaires obtenues sur des neurones hippocampiques, j'ai donc poursuivi l'étude de l'impact de la modification de l'activité neuronale sur le clustering des canaux Kv2.1 dans les neurones hippocampiques et ai approfondi aux neurones corticaux. J'ai pour cela réalisé un marquage sur des neurones du cortex contre le Kv2.1 et contre l'enzyme GAD67 afin de pouvoir séparer les neurones pyramidaux et les interneurones (Figure 22A). Il est intéressant d'étudier les deux types cellulaires pour deux raisons. Premièrement comme expliqué dans l'introduction, les interneurones forment des clusters à taille finale à un stade de développement plus avancé que les neurones pyramidaux. Et deuxièmement, mes images d'épifluorescence semblent indiquer des clusters de plus forte intensité dans les interneurones (Figure 22A). Je me suis donc demandé si la modification de l'activité neuronale serait la même pour les neurones pyramidaux et les interneurones. Pour modifier l'activité neuronale j'ai utilisé (1) la gabazine, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> dont l'application aiguë in vitro sur tranches hippocampiques constitue un modèle d'épilepsie aiguë (G. A. Johnston, 2013; Müller et al., 2018) et (2) la TTX qui se lie aux canaux sodiques et inhibe l'efflux d'ions Na<sup>+</sup> à travers ces canaux immobilise, empêchant alors la génération des PA (Lago et al., 2015).

L'application de gabazine sur des neurones pyramidaux hippocampiques ou corticaux montre une diminution du clustering des canaux Kv2.1 avec une intensité de fluorescence inférieure à la condition contrôle (hippocampe  $p < 0.0001$  ; cortex  $p < 0.0219$  ; Figure 22B). Un effet contraire est observé à l'application de TTX avec une augmentation de la fluorescence des clusters par rapport à la condition contrôle (hippocampe  $p < 0.0070$  ; cortex  $p < 0.0001$ ). Dans les interneurones, l'application de gabazine ou de TTX n'a pas d'effet significatif sur le clustering du Kv2.1 dans les deux populations neuronales observées (Figure 22C).



**Figure 22.** Changement de clustering du Kv2.1 lors de la modification de l'activité neuronale.

**(A)** Images d'épifluorescence de culture primaires d'hippocampe et de cortex, traités pendant 30 mins avec de la gabazine (10  $\mu$ M) ou de la TTX (1  $\mu$ M). Les neurones sont marqués contre Kv2.1 et GAD67. Sur la base du marquage GAD67, les neurones pyramidaux sont indiqués par une flèche rouge et les interneurons par une flèche bleue. Barre d'échelle : 25  $\mu$ m.

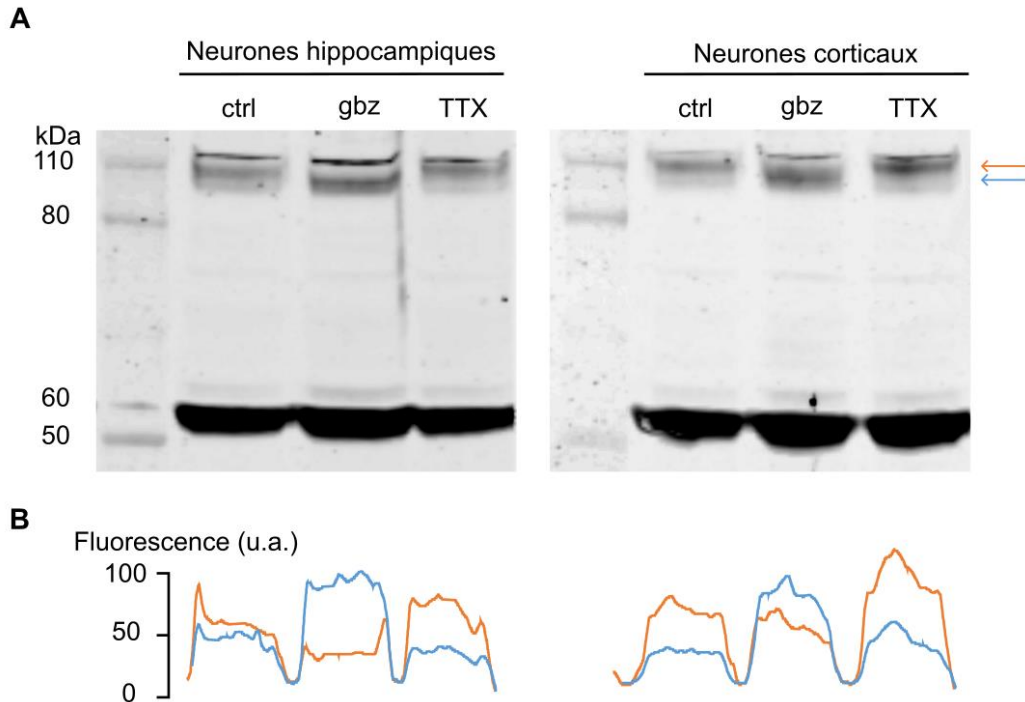
**(B)** Quantifications de l'intensité de fluorescence dans les clusters des neurones pyramidaux de l'hippocampe (B1) et du cortex (B2). n = 40 à 76 cellules sur 3 cultures indépendantes. Médiane et IQR 10% – 90%. Test MW ou KW et post-hoc de Dunn ; ns : non significatif ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

**(C)** Quantifications de l'intensité de fluorescence dans les clusters des interneurons de l'hippocampe (C1) et du cortex (C2). n = 27 à 38 cellules sur 3 cultures indépendantes. Médiane et IQR 10% – 90%. Test MW ou KW et post-hoc de Dunn ; ns : non significatif.

Ces résultats confirment que l'activité neuronale joue un rôle sur la capacité du Kv2.1 à former des clusters de façon similaire dans l'hippocampe et dans le cortex, sur les neurones pyramidaux : une augmentation de l'activité diminue la formation de clusters et inversement. Cette régulation du clustering n'est pas effective sur les interneurons des deux populations.

Pour déterminer l'état de phosphorylation des canaux Kv2.1 après modification de l'activité, j'ai procédé à des western blots sur des cultures cellulaires d'hippocampe et de cortex de rat soumises à l'application de gbz ou de TTX (Figure 23A). Dans les deux populations neuronales, l'application de gbz déphosphoryle les Kv2.1 avec un poids moléculaire de ~100 kDa. A l'inverse la TTX induit une phosphorylation des canaux Kv2.1 dont le poids moléculaire est de ~120 kDa. Il est également important de noter que les conditions contrôles n'apparaissent pas comme des bandes « nettes » traduisant une variabilité de l'état de phosphorylation caractéristique au Kv2.1, au sein des populations neuronales (Figure 23B).

Ces résultats confirment la modification de l'état de phosphorylation du Kv2.1 en fonction de l'activité et établissent un lien de corrélation entre l'état de phosphorylation, la capacité à former des clusters et la dépendance au voltage des canaux Kv2.1.



**Figure 23.** Changement de phosphorylation des sous-unités Kv2.1 suite à une modification de l'activité.

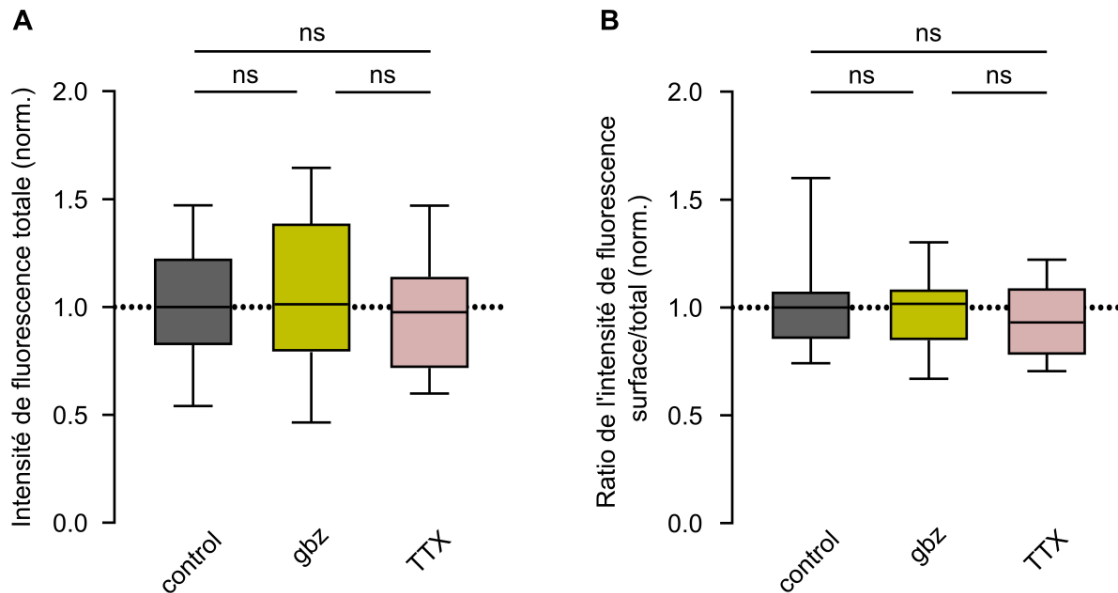
**(A)** Immunoblots préparés à partir de lysats de culture primaires d'hippocampe et de cortex, traités pendant 30 mins avec de la gabazine (10  $\mu$ M) ou de la TTX (1  $\mu$ M). La première colonne correspond aux poids moléculaires. La tubuline a été marquée comme témoin de charge à 55 kDa.

**(B)** Graphique linéaire de l'intensité de fluorescence sur deux lignes indiquées par les flèches colorées en orange (~120 kDa, le poids moléculaire approximatif de Kv2.1 phosphorylé) et bleu (~100 kDa, le poids moléculaire approximatif de Kv2.1 non phosphorylé).

Pour vérifier que les résultats de la modification de la formation de clusters ne soient pas liés à une internalisation des canaux Kv2.1, j'ai utilisé des neurones transfectés avec des constructions Kv2.1-GFP WT ou mutés puis ai marqué la fraction de surface par des nanocorps dirigé contre la GFP. La fraction totale été évaluée par la fluorescence de la GFP. Le ratio entre les deux me permet alors de mettre en évidence une modification de la fraction de surface, telle que de l'internalisation, en regard du contrôle.

La quantification de la fraction totale (Figure 24A) et le ratio entre l'intensité de fluorescence de surface sur le total (Figure 24B) en prenant compte des clusters mais également du marquage

diffus ne montre pas de différence significative entre les conditions d'activité neuronale. Les modifications du clustering expliquées précédemment (Figure 22) ne sont donc pas dû à une internalisation des sous-unités de Kv2.1.



**Figure 24.** Etude de l'internalisation des sous-unités Kv2.1 suite aux modifications de l'activité neuronale.

**(A)** Quantification de l'intensité de fluorescence totale dans et hors clusters dans les neurones transfectés de cortex. n = 26 à 30 cellules sur 3 cultures indépendantes. Médiane et IQR 10% – 90%. Test KW et post-hoc de Dunn ; ns : non significatif.

**(B)** Quantification du ratio de l'intensité de fluorescence de surface sur totale dans et hors des clusters dans les neurones transfectés de cortex. n = 26 à 30 cellules sur 3 cultures indépendantes. Médiane et IQR 10% – 90%. Test KW et post-hoc de Dunn ; ns : non significatif.

Suivant les données de la littérature, il est possible de spéculer que les sous-unités de Kv2.1, en réponse à l'activation, l'entrée de calcium dans la cellule et à l'activation de phosphatase, sont déphosphorylées au niveau de leur queue C-ter. Cette action aurait alors pour effet de réduire leur interaction avec les protéines VAPA du RE et conduirait à la declusterisation des canaux (Figure 7B) (Surmeier & Foehring, 2004). Mes résultats montrent alors que les sous-unités ne sont pas internalisées mais restent à la surface de la membrane plasmique participant alors à la fraction qui diffuse librement hors des clusters. Cette fraction, est proposée comme étant celle qui conduit le courant  $K^+$  à l'inverse des canaux dans les clusters qui sont supposés comme dans un état de faible conduction (Fox, Haberkorn, et al., 2013). Puisque le courant  $I_{kdr}$  est alors renforcé par la participation de cette nouvelle fraction de canaux libres, il peut être

avancé l'hypothèse que cette déclusterisation agit comme un mécanisme de neuroprotection contre l'excitotoxicité des stimulations prolongées.



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces dernières années, l'identification de plusieurs mutations causales aux encéphalopathies épileptiques, ont accru l'engouement sur le canal Kv2.1 et les publications sur sa fonction se sont multipliées (Bar, Barcia, et al., 2020; de Kovel et al., 2017). La principale caractéristique du canal est son expression de surface sous forme de clusters restreints au compartiment somato-dendritique proximal et le segment initial de l'axone (Trimmer, 1991). Les propositions de rôles non canoniques qui en découlent comme organisateur structurel subcellulaire avec le RE (Kirmiz et al., 2018) ou d'interaction avec les microglies (Cserép et al., 2020) rendent compliquées les hypothèses sur l'impact que les mutations identifiées peuvent engendrer.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé deux mutations Y533\* et R583\* du Kv2.1. Ces mutants aboutissent à des protéines tronquées de la partie C-ter qui ne possèdent plus le domaine PRC responsable de la localisation de surface. Les patients présentant ces mutations exhibent des symptômes cliniques avec de rares troubles épileptiques mais un retard développemental important associé à des troubles autistiques (Bar, Barcia, et al., 2020). Le lien causal entre ces mutations et les troubles observés demeurent inconnus car les fonctions du canal sont encore à l'étude. Mes résultats indiquent que les sous-unités mutées s'expriment à la surface de la membrane plasmique de neurones et ne sont plus restreintes comme le WT. Les sous-unités mutées ont une diffusion latérale accrue et sont capables de former des hétérotétramères avec des sous-unités non mutées. Cette population de canaux mixtes forme des clusters de petites tailles et j'ai observé une diminution relative de la colocalisation de ces derniers avec les clusters de RyR. L'imagerie calcique confirme le rôle du Kv2.1 dans la modulation des transients calciques et ce de façon similaire entre le WT et les mutations. De façon intéressante, la surexpression du Kv2.1WT dans les expériences d'électrophysiologie, augmente l'excitabilité des neurones. Ceci peut être expliqué par l'introduction forcée des sous-unités transfectées dans les clusters qui ont été suggérés comme non conducteurs. Dans le cas des mutations, leurs expressions rendent les neurones moins excitables, bien qu'aucun changement significatif dans les caractéristiques du PA ou de sa dynamique ne soit noté. Comme présenté dans la littérature (Murakoshi et al., 1997; Park et al., 2006), mes résultats indiquent un changement de phosphorylation de la queue C-ter des sous-unités Kv2.1 avec l'activité neuronale qui est proposé comme impactant la dépendance au voltage des canaux. J'ai donc établi un modèle computationnel de neurone hippocampique de CA1, de façon à pouvoir étudier séparément l'interaction entre la conductance et la dépendance



au voltage. Le modèle montre des modifications subtiles de l'excitabilité qui pourraient changer la fenêtre de performance optimale de la cellule.

Mes conclusions suggèrent que les mutations pourraient altérer l'excitabilité via la modification de la proportion de sous-unités de Kv2.1 présentes dans les clusters et que les canaux Kv2.1 ont un rôle clé dans le contrôle de l'excitabilité neuronale en contribuant aux propriétés actives des dendrites, rôle qui peut être modifié par des mutations ou la phosphorylation.

## I. Majeures contraintes et limitations expérimentales

### I. A. Niveau d'expression et transfection

Pour cette étude, le modèle biologique choisi correspond aux cultures primaires de neurones de rat. Pour pouvoir exprimer les constructions chimériques Kv2.1WT ainsi que les mutations, Kv2.1Y533\* et Kv2.1R583\* (Figure 18) il m'a fallu procéder à des transfections. Ce système présente l'avantage d'être similaire à la population de canaux présent chez les patients qui expriment ces mutations *de novo*. En effet, la transfection induit l'expression de canaux Kv2.1 supplémentaires aux canaux endogènes, déjà présents dans les neurones *in vitro*.

Une remarque qui peut alors être soulevée correspond à la fluctuation du niveau d'expression des constructions dépendant de la transfection. Cette variabilité se devine sur les images de d'immunocytochimie de surface lors de la comparaison entre le marquage des sous-unités mutantes et du WT (Figure 1 de l'article). Le niveau d'expression des constructions est variable entre cultures indépendantes et également entre les neurones d'une même culture. De plus, il faut prendre en compte que la transfection n'est pas une manipulation anodine puisque les transfectants lipidiques interagissent avec l'intégrité de la membrane plasmique, ce qui peut entraîner une mort neuronale importante.

Aux vues de ces différences d'expression membranaire il serait intéressant d'étudier la stabilité des protéines lors de l'acheminement à la membrane. Ce questionnement engendrerait un résultat quantitatif de la proportion entre la fraction de protéines à la surface et la fraction de protéines dans la cellule. Pour ce faire, des expériences de biotinylation de surface peuvent être réalisées mais ne sont pas compatibles avec le modèle d'étude utilisé. En effet, ce type de manipulation nécessite un volume important d'échantillons biologiques ce qui n'est pas permis par le taux de transfection des neurones dans des cultures primaires.

Des alternatives comme l'expression des constructions dans des systèmes hétérologues comme les cellules HEK ou l'utilisation de virus pour améliorer le taux d'expression des constructions sont envisageables mais présentent également des limitations. Par exemple les systèmes hétérologues ne comportent pas forcément les mêmes régulations ou cascades de signalisation que les neurones.

## *I. B. Activation dans l'imagerie calcique*

Pour réaliser mes expériences d'imagerie calcique et comparer les transients calciques avant et après l'application de GxTx, les neurones ont été activés par une stimulation extérieure. J'ai utilisé deux paradigmes expérimentaux : (1) la libération de glutamate et la sonde GCaMP6f ainsi que (2) l'ouverture de la chanel rhodopsine Cherriff et la sonde CaTM3.

Cependant, dans ces deux expériences le contrôle de l'activation des neurones n'a pas pu être mis en place. Il ne m'a pas été possible de connaître le nombre de PA généré par les stimulations. Lors de la mise en place et de l'optimisation des protocoles expérimentaux, le réglage des paramètres s'est fait de façon à s'approcher au maximum des mesures de transients calciques spontanés (Figure 3 de l'article). L'interprétation et la mise en relation avec les résultats d'électrophysiologie ou de modélisation est alors difficile, car les réponses sont très différentes si le neurone génère un PA, un burst ou si le neurone est entré en depolarization block.

Une expérience combinant l'enregistrement des transients calciques et du Vm permettrait alors d'avoir accès à ces informations manquantes. Il est envisageable de réaliser des enregistrements de patch clamp en même temps que l'enregistrement de la fluorescence des sondes calciques mais la modification du milieu intracellulaire reste à prendre en compte.

Une autre expérience possible mais qui n'a malheureusement pas pu être mise en place, consiste à réaliser l'enregistrement de la sonde calcique en parallèle avec une sonde sensible au voltage et d'acquérir simultanément les images. L'atout majeur des sondes sensibles au voltage est que sur des systèmes de microscope équipés de caméra adaptée, les cinétiques des sondes sont suffisamment rapides pour être utilisées avec un temps d'exposition de 1 à 2 ms. Or, ces temps d'acquisitions sont généralement atteints lorsque les zones de capture sont restreintes et la résolution faible. Il n'est alors pas possible d'imager des régions telles que les dendrites. Il faudrait également utiliser des sondes calciques dont les cinétiques seraient proches de celles des sondes sensibles au voltage pour pouvoir tirer un maximum d'informations.

## II. L'utilisation d'un modèle *in silico*

Les modèles computationnels présentent des avantages indéniables. Les modèles biophysiques détaillés permettent l'étude fine des mécanismes contrôlant la décharge des PA et donc l'excitabilité neuronale (Herz et al., 2006).

Dans le cadre de mon travail, l'utilisation d'un modèle biophysique m'a permis de contourner la grande variabilité biologique dont fait preuve le Kv2.1 par ses variables états de phosphorylation et donc sa pluralité dépendance au voltage. Mais également les différences de conductance proposées lorsque le canal est dans un cluster ou en hétérotétramères. En effet la littérature présente un grand éventail de valeurs pour ses deux paramètres (Guan et al., 2013; Kang et al., 2019; Park et al., 2006), rendant difficile de trouver un modèle adéquat lors de l'étude des conséquences des mutations. De plus, il est impossible d'avoir accès à la mesure du  $V_{1/2}$  pour un échantillon biologique donné et de fixer une valeur de conductance et de dépendance au voltage pour Kv2.1 qui ne reflèterait aucunement la réalité biologique de l'échantillon.

Il est important de se rappeler que les modèles computationnels, bien qu'optimisés pour se rapprocher au maximum de la réalité biologique, n'offrent que des prédictions sur les mécanismes étudiés (Almog & Korngreen, 2016). Le modèle utilisé dans ce travail a lui aussi été mis au point pour prendre en compte la conductance et les cinétiques spécifiques du canal Kv2.1. Les résultats avancés par le modèle montrent une régulation fine de l'excitabilité neuronale par le Kv2.1 en réponse à des modifications de la dépendance au voltage et de la conductance. Les mutations étudiées, Y533\* et R583\*, résultent en l'expression de sous-unités tronquées où les nombreux sites de phosphorylation de la queue C-ter ne sont plus présents. Cet état peut être équivalent à l'état déphosphorylé du Kv2.1 dont il a été montré que le  $V_{1/2}$  est décalé vers des potentiels hyperpolarisés (Park et al., 2006). L'imagerie calcique qui n'annonce pas de différence significative entre le Kv2.1WT et les Kv2.1 mutés n'est pas en concordance avec les prédictions issues du modèle computationnel. Plusieurs explications peuvent éclaircir cette différence.

En effet, la résolution temporelle des sondes calciques n'est pas suffisamment fine pour isoler les PA par conséquent les transients calciques sont issus d'un moyennage de l'activité. Dans ce cas, un changement du  $V_{1/2}$  ou de la conductance qui entrainerait un changement minime mais observable dans le modèle serait alors invisible pour les sondes calciques. De plus, comme mentionné précédemment la stimulation des neurones n'a pas pu être quantifiée, ce qui rend les comparaisons difficiles.

Par ailleurs, chaque neurone possède sa signature d'expression de canaux ioniques propre et différente des autres. De façon intéressante, certains canaux ioniques ont des propriétés similaires voire se chevauchant, favorisant la résistance de la fonction neuronale. L'expression des canaux dans un modèle computationnel est limitée et ne permet pas de représenter cette pluralité de canaux. En effet, lors de la phase d'optimisation des paramètres d'un modèle et dans un effort de réduire les coûts computationnels, les canaux modélisés sont réduits à ceux qui sont nécessaires au contrôle de l'excitabilité neuronale. De plus, au sein d'une même population de neurones générant le même comportement, les différents neurones peuvent présenter une variabilité dans les densités de conductances des canaux ioniques (Goaillard & Marder, 2021). Or, cette variabilité est inexistante dans l'utilisation de modèles biophysiques détaillés, qui répondent toujours de la même manière une fois les paramètres fixés.

Des outils existent pour adapter les modèles biophysiques préexistants aux données expérimentales pour un réglage des paramètres plus pertinent. De la même façon une approche de modélisation basée sur les algorithmes évolutifs, permet à présent de générer des populations de modèles qui représente la variabilité biologique. Dans ce travail, une perspective intéressante serait l'utilisation d'un modèle de neurone hippocampique en culture (car l'arborisation est différente du tissu) optimisé à l'aide de mes données d'électrophysiologie. De même, la pluralité des valeurs de conductances ou de  $V_{1/2}$  du canal Kv2.1 pourrait poser comme un bon substrat à l'élaboration d'une population de modèle.

### III. Le Kv2.1 et l'excitabilité neuronale

Dans les neurones, le Kv2.1 est impliqué dans la repolarisation des PA et spécifiquement lors de la décharge à haute fréquence (P. W. Liu & Bean, 2014). L'hypothèse générale formulée dans la littérature est qu'en l'absence des canaux Kv2.1, le Vm reste dépolarisé entre les PA, empêchant la réactivation des canaux voltage dépendants Na<sup>+</sup> qui se sont inactivés à ce moment du cycle du PA (Guan et al., 2013; J. Johnston et al., 2008). Son implication dans la modulation des bursts, notamment l'augmentation du nombre d'activité en burst lors du blocage du Kv2.1 a également été avancée (Newkirk et al., 2021; Raus Balind et al., 2019). Dans les cellules de CA3, les bursts sont le résultat d'une interaction entre les entrées synaptiques et les conductances voltages dépendantes dans deux zones d'initiation des pointes séparées dans l'espace. Dans les cellules de CA3, il semblerait que le gradient d'activité du Kv2.1 dû à sa localisation somato-dendritique proximale contribue à la modulation de la génération de bursts, notamment pour réguler l'initiation et/ou le couplage de la génération de spikes dendritiques et somatiques (Raus Balind et al., 2019).

Le canal Kv2.1 est décrit dans la bibliographie comme un déterminant clé de l'excitabilité des neurones. Proposé comme un régulateur homéostatique, son comportement de clusterisation ou declusterisation en fonction du changement dans l'activité neuronale est corrélée à un changement de  $V_{1/2}$  et de la conductance de ces canaux.

Une étude intéressante avance que les canaux Kv2.1 au sein des clusters seraient non conducteurs (Fox, Haberkorn, et al., 2013). A des densités spatiales élevées comme celles retrouvées *in situ*, les auteurs mesurent que 20% des canaux Kv2.1 de la cellule sont conducteurs. Comme mentionné dans l'introduction, la transfection entraîne la surexpression des protéines. Les sous-unités de Kv2.1WT sont alors forcées dans les clusters ce qui augmente le nombre de canaux Kv2.1 dans un état non conducteur. Cette hypothèse explique les résultats obtenus en électrophysiologie où les neurones transfectés avec la construction Kv2.1 se retrouvent plus excitable que les neurones non transfectés.

Cette proposition est la raison pour laquelle j'ai quantifié le pourcentage de détections clustérisées en utilisant la microscopie de super-résolution. Les quantifications montrent 80% de détections clustérisées en condition WT et à peu près 25% pour les deux mutations. En considérant, la valeur notable de ce pourcentage en condition WT, il est intéressant de se demander quel est le rôle de ces canaux non conducteurs. Dans la littérature, deux hypothèses ont été formulées quant au rôle des canaux non conducteurs : (1) ils peuvent représenter un réservoir à la surface de la cellule où les canaux sont stockés permettant d'augmenter rapidement le nombre de canaux

fonctionnels à la surface sans avoir à synthétiser des canaux *de novo* et à les transporter à la surface (O'Connell et al., 2010) et/ou (2) ils possèdent un rôle structurel comme plateforme d'interaction dans l'établissement de points de jonction entre la membrane plasmique et le RE (Fox et al., 2015), lors de l'exocytose (Deutsch et al., 2012) ou en lien avec les jonctions microgliales ou niveau du corps cellulaire (Cserép et al., 2020).

## IV. Hypothèses sur la causalité des encéphalopathies épileptiques

### A. Par son rôle canonique de conduction des ions $K^+$

La pluralité des fonctions de Kv2.1 rend difficile la proposition d'hypothèses sur le lien causal entre les mutations et les encéphalopathies épileptiques. Les symptômes cliniques des EE liés à des mutations de *Kcnb1* sont variés et ce même par des porteurs de la même mutation. Les mutations C-ter étudiées, Y533\* et R583\*, présentent des symptômes cliniques avec de rares troubles épileptiques, un retard développemental important et des troubles autistiques.

Mes résultats sur la fonctionnalité des canaux WT ou mutés, ne montrent pas de résultats flagrants sur une modification de l'excitabilité qui pourrait expliquer un phénotype épileptique. Au contraire l'expression des sous-unités mutées montrent une excitabilité légèrement réduite par rapport à la surexpression des sous-unités WT. De plus le modèle ne suggère que des changements subtils de l'excitabilité qui pourraient modifier la fenêtre de performance optimale de la cellule. De façon générale, mes résultats montrent même que les mutations pourraient être équivalentes et avoir le même effet que les sous-unités non phosphorylées du Kv2.1. Or, ces dernières pourraient porter un rôle de neuroprotection, car déphosphorylées en réponse à l'activation, l'entrée de calcium dans la cellule et à l'activation de phosphatase, leur interaction avec les protéines VAPA du RE est réduite et conduirait à la declusterisation des canaux (Figure 7B) (Surmeier & Foehring, 2004). Puisque les sous-unités ne sont pas internalisées la fraction declustérée diffuse librement et est proposée comme étant celle qui conduit le courant  $K^+$  à l'inverse des canaux dans les clusters qui sont supposés comme dans un état de faible conduction (Fox, Haberkorn, et al., 2013). Puisque le courant  $I_{kdr}$  est alors renforcé par la participation de cette nouvelle fraction de canaux libres, l'hypothèse que cette declusterisation agit comme un mécanisme de neuroprotection contre l'excitotoxicité des stimulations prolongées peut être avancées. Or, dans ce cas, comment expliquer la pathologie ?

Bien que les mutations Y533\* et R583\* n'engendrent que de rares troubles épileptiques, il reste une zone d'ombre à éclaircir. La plupart de mes expériences comme l'électrophysiologie ou la modélisation ne s'intéressent qu'aux neurones pyramidaux. Il serait important d'étudier le rôle du Kv2.1 et de ses mutations dans les interneurons inhibiteurs. En effet, peu de littérature présente des résultats de l'impact du Kv2.1 dans les interneurons, pourtant mes résultats mon-



trent une différence dans le comportement de clustering suite à la modification de l'activité neuronale par rapport aux neurones pyramidaux. Si en condition d'augmentation d'activité, mimée dans ce travail par l'application de gabazine, il n'y a pas de perte de clustering des canaux Kv2.1 dans les interneurones comme cela est le cas dans les neurones pyramidaux, la modulation entre la fraction de canaux dans et hors clusters n'est plus la même entre les deux types neuronaux. Les clusters denses (forts en fluorescence) observées dans les interneurones laissent présager que les canaux Kv2.1 sont généralement sous forme non conducteurs. Dans ce cas, l'expression de sous-unités mutantes dont la distribution est non restreinte, la diffusion latérale est accrue et réorganise les sous-unités endogènes plus loin dans l'arbre dendritique, augmenterait la fraction de canaux hors cluster donc proposés comme conducteur et augmenterait le courant  $I_{kdr}$ . Dans les interneurones, cette baisse d'excitabilité subséquente diminuerait l'inhibition dans le réseau et pourrait poser le substrat des activités épileptiques.

### *B. Par son rôle non canonique structurel*

Le rôle non canonique structurel du Kv2.1 ne peut être négligé. En effet, si les troubles épileptiques sont rares, alors d'autres mécanismes qui ne porteraient pas sur le rôle de conduction ionique du Kv2.1 peuvent être impliqués.

Une de ces fonctions, concerne l'établissement entre les points de jonctions de la membrane plasmique et le RE. Mes résultats indiquent une baisse de la colocalisation des clusters de Kv2.1 mutés et les RyR. Dans ce cas, le couplage fonctionnel proposé entre les RyR et les Cav1.2 qui se trouvent à proximité grâce aux clusters de Kv2.1 n'est plus opérationnel. La recapture du  $Ca^{2+}$  dans les réserves calciques de la cellule serait réduite et ne pourrait pas empêcher les augmentations excessives du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique après de longues périodes d'activité neuronale (Vierra et al., 2019). Les mutations pourraient alors être causales aux troubles identifiés par l'altération de cette fonction non canonique.

De plus, en prenant en compte le rôle de plateforme d'interaction pour les contacts microgliaux avec le corps cellulaire des neurones, la dispersion des clusters de Kv2.1 via l'expression des sous-unités mutées impacterait ces interactions. Ces jonctions neurone-microglie semblent fonctionner comme des sites de communication qui sont rapidement modifiés en réponse à une lésion cérébrale (Cserép et al., 2020; K. Sharma et al., 2020).

### *C. Ou alors par les deux ?*

Ces résultats sont à remettre dans le contexte des EE. Ces pathologies sont complexes et impliquent de nombreuses fonctions physiologiques en parallèle. La dimension des troubles développementaux n'est pas à négliger et semble difficilement explicable par soit une altération de l'excitabilité neuronale ou un défaut de la signalisation calcique localisée. Bien qu'il soit compliqué d'expliquer les pathologies en essayant d'incorporer tous les rôles proposés du Kv2.1, surtout que certains d'entre eux ne sont pas encore bien documentés, séparer les rôles canoniques et non canoniques semble être une simplification qui ne refléterais peut-être pas la réalité biologique. Il serait prudent d'interpréter les résultats avec le recul nécessaire que ce type de caractérisation requiert.



## ANNEXE

Au cours de ma thèse, j'ai poursuivi un projet que commencé lors de mon M2 sur une méthode d'analyse de clustering conçue pour des images issues de la microscopie de super-résolution de molécule unique (SMLM, « Single Molecule Localisation Microscopy »). Nommée « Diinamic » pour « Density and Image INtensity Based Analysis Method for Identification of Clusters », cette méthode d'analyse peut s'appliquer aux images de PALM et de STORM pour analyser de façon robuste des échantillons divers. En super-résolution, le marquage non spécifique constitue un véritable problème lors des analyses de clustering car crée un bruit de fond important qui ne permet pas de délimiter facilement les clusters. Dans des échantillons tels que le soma, ce bruit de fond est d'autant plus important qu'un nombre important vient de l'intérieur du volume de la cellule, notamment en PALM. L'utilisation de Diinamic sur mes images de PALM comme de STORM m'a permis de facilement d'éliminer ce bruit de fond et d'identifier de façon fiable mais aussi versatile, les clusters des protéines d'intérêts.

De nombreuses méthodes de clustering existent mais sont le plus souvent adaptées à un type d'échantillon donné. Cette spécificité, couplée aux artefacts qui surviennent dans le cas de la microscopie SMLM, rend difficile pour un utilisateur de faire un choix qui convient à son paradigme expérimental. Diinamic est une méthode versatile qui se déroule en deux étapes : (1) une sélection de clusters candidats basée sur une segmentation de l'image, puis (2) l'identification des clusters selon un critère de densité. Pour évaluer l'efficacité de cette méthode, je l'ai comparé à la méthode DBSCAN (Pageon et al., 2016) sur des images de simulations stéréotypées issues d'un référentiel déjà utilisé pour comparer d'autres méthodes (Nieves et al., 2023) ou générées spécifiquement pour cette étude. Mes résultats montrent que Diinamic est performant et robuste dans la grande majorité des cas étudiés (dont la variété reflète la diversité biologique). De plus, l'alliance successive entre Diinamic et DBSCAN permet l'identification de structures particulières de petites tailles au sein même des clusters, les nanodomains.

Ce travail fait l'objet d'un article : « Introducing Diinamic, a flexible and robust method for clustering analysis in single-molecule localisation microscopy » et a été publié en ligne dans le journal *Biological Imaging* issu de Cambridge University Press, paru en juillet 2023. Cette étude se conclut par une proposition de guide pour aider les lecteurs dans l'analyse de leurs données de SMLM.

This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is unaltered and is properly cited. The written permission of Cambridge University Press must be obtained for commercial re-use or in order to create a derivative work.

This peer-reviewed article has been accepted for publication but not yet copyedited or typeset, and so may be subject to change during the production process. The article is considered published and may be cited using its DOI.

10.1017/S2633903X23000156

## **Introducing Diinamic, a flexible and robust method for clustering analysis in single-molecule localisation microscopy**

Anne-Lise Paupiah<sup>1,2,3</sup>, Xavier Marques<sup>1,2,3,4</sup>, Zaha Merlaud<sup>1,2,3</sup>, Marion Russeau<sup>1,2,3</sup>, Sabine Levi<sup>1,2,3</sup>, Marianne Renner<sup>1,2,3</sup> \*

<sup>1</sup> Inserm UMR-S 1270, Paris, France

<sup>2</sup> Sorbonne Université, Paris, France

<sup>3</sup> Institut du Fer à Moulin, Paris, France

<sup>4</sup> Present address:

CNRS UMR 7196-INSERM U1154, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

### **\* Correspondence to:**

Marianne Renner

Institut du Fer à Moulin

INSERM-Sorbonne Université UMR-S 1270

17 rue du Fer à Moulin

75005 Paris, France

Tel. +33145876119

E-mail: [marianne.renner@sorbonne-universite.fr](mailto:marianne.renner@sorbonne-universite.fr)

## **Abstract**

Super-resolution microscopy allowed major improvements in our capacity to describe and explain biological organisation at the nanoscale. Single-molecule localisation microscopy (SMLM) uses the positions of molecules to create super-resolved images, but it can also provide new insights into the organisation of molecules through appropriate pointillistic analyses that fully exploit the sparse nature of SMLM data. However, the main drawback of SMLM is the lack of analytical tools easily applicable to the diverse types of data that can arise from biological samples. Typically, a cloud of detections may be a cluster of molecules or not depending on the local density of detections, but also on the size of molecules themselves, the labelling technique, the photo-physics of the fluorophore and the imaging conditions. We aimed to set an easy-to-use clustering analysis protocol adaptable to different types of data. Here, we introduce Diinamic, which combines different density-based analyses and optional thresholding to facilitate the detection of clusters. On simulated or real SMLM data, Diinamic correctly identified clusters of different sizes and densities, being performant even in noisy datasets with multiple detections per fluorophore. It also detected subdomains (“nanodomains”) in clusters with non-homogeneous distribution of detections.

## **Keywords**

Super-resolution microscopy; clustering analysis; PALM; STORM; DBSCAN; nanodomains

## Introduction

An indisputable breakthrough in microscopy, the advent of super-resolution microscopy is also a major improvement in our capacity to describe and explain biological organisation at the nanoscale. A particularly relevant question in cellular biology is to know whether molecules are randomly distributed or if they form complexes or aggregates (clusters) which may be intimately related to their function. Super-resolution imaging is being employed to analyse molecular complexes of tens to hundreds of nanometres and prompted this kind of study in living cells<sup>(1,2)</sup>.

Several methods have been proposed (reviewed in Khater *et al.* (2020)<sup>(3)</sup>). Among them, single-molecule localisation microscopy (SMLM) is based on the observation of signals produced by individual fluorophores. This approach exploits the intrinsic properties of some fluorophores that allow controlling their stochastic 'on/off' switching or blinking. The most common SMLM methods are photoactivated localisation microscopy (PALM)<sup>(4)</sup>, stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)<sup>(5-7)</sup> and point accumulation for imaging in nanoscale topology (PAINT)<sup>(8)</sup>. These approaches enable the reconstruction of an image by pointillism, with a resolution that depends basically on the signal-to-noise ratio<sup>(2)</sup>. Typically, the achieved resolution is of tens of nanometres, that is, a ~10-fold improvement with respect to the spatial resolution imposed by the diffraction limit in a conventional microscope. A visual reconstruction (called rendered image<sup>(9)</sup>) can be generated by convolving a Gaussian distribution of intensity (whose size is the localisation precision) to each localisation coordinates obtained.

SMLM offers excellent means to analyse the distribution of molecules in cells, which have been applied to many different biological systems<sup>(1,2)</sup>. In contrast to the images obtained with optical microscopy, SMLM techniques generate datasets of molecular coordinates in 2D or 3D. Several approaches have been proposed to analyse the spatial organisation and morphology of molecular clusters from this kind of data.

Clustering analyses typically employ two different strategies, based on spatial statistics or based on density analysis. Concerning the methods based on spatial statistics, the most popular ones are the adaptation to SMLM of pair-correlation analysis<sup>(10)</sup> and Ripley's L-function<sup>(11,12)</sup>. As they do not provide information about the number, spatial position, and morphology of clusters, they serve to detect the presence of clustered distributions but not to describe them from a mechanistic point of view. An improvement is the analysis of topological prominence<sup>(13)</sup> that informs about the shape of the cloud of points. However, these statistical approaches perform well only in the case of small clusters of relatively homogeneous size.

Density-based data mining algorithms perform better in detecting clusters in variable biological data due to their capacity to describe the spatial characteristics of individual clusters. The most extensively used is DBSCAN<sup>(14)</sup>, which calculates the neighbouring density around each detection



by counting the number of surrounding detections in a given radius. Those that are mutually reachable are considered as belonging to a cluster, and those that do not belong to clusters are considered background. Several software packages adapted this algorithm to SMLM data such as LAMA<sup>(15)</sup>, Clus-DoC<sup>(16)</sup> and FOCAL<sup>(17)</sup> (a grid-based version of DBSCAN). Unfortunately, DBSCAN performs weakly when the detections' density in the clusters is variable among clusters, a limitation that restricts its use to datasets with homogeneous clustering. The alternatives that have been proposed introduce mesh representations to perform the density analysis. The most common strategy to create the mesh is Voronoi tessellation (SR-Tesseler<sup>(18)</sup>; ClusterVisu<sup>(19)</sup>), in which each point is on the face of a Voronoi polygon and edges are the equidistant bisectors between points. In a SMLM data set, regions with high density of points have small polygons, so that dense structures can be segmented by setting a threshold for the area of these polygons. Another improvement that was recently proposed is the application of persistence-based clustering analysis, which improves the individualization of clusters when they are close to each other<sup>(20)</sup>.

This variety of analytical approaches can be overwhelming for users that usually struggle to find an algorithm well adapted to their data. Moreover, SMLM techniques are affected by several technical issues that may induce various artefacts in clustering analysis; namely background noise, multiple detections of one single fluorophore over time, stage drift, or dependency on the quality of the manipulation used to prepare the sample. Some analysis strategies may be more appropriate than others depending on how the experiment was conducted and the characteristics of the targeted molecule. Our aim was to set an easy-to-use analytical protocol able to detect clusters of different characteristics, in noisy datasets with multiple detections per fluorophore. Hence, we have developed Diinamic (*Density and Image INTensity based Analysis Method for Identification of Clusters*), a modular sequence of cluster analysis that combines different density-based analyses to simplify the adaptation to different datasets. We analysed its performance on simulated datasets and real PALM and STORM data to provide cues of which strategy to use depending on the characteristics of the dataset.



## Materials and methods

### Simulations of SMLM data

Monte-Carlo simulations of SMLM data consisted of generating x and y coordinates for a given number of detections and were produced by a program written in MATLAB (MathWorks). Non-overlapping clusters were created by selecting the position of the first detection randomly within the simulation area (100  $\mu\text{m}^2$ ). Subsequently, the other detections belonging to the cluster were positioned arbitrarily into a circular or ovoid area of the desired size. Non-clustered detections (“noise”) were introduced at random positions in the simulation area. Multiple detections of the same molecule were simulated by adding 1-50 detections around the position of the molecule. The position of these extra detections was randomly chosen following a Gaussian distribution with a mean zero and variance similar to the localisation precision of our set-up (20 to 50 nm).

### Neuronal culture and transfection

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as described in Battaglia *et al.* (2017)<sup>(21)</sup>. Procedures were carried out in compliance with the rules of French and European regulations for the care and protection of the Laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, 6 February 2013). In brief, hippocampal neurons were isolated from embryonic days 18 to 20 from Sprague Dawley rat embryos of both sexes. Following attachment, cells were incubated in the described culture medium<sup>(21)</sup> for up to 3 weeks at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. Each week, one-third of the culture medium volume was renewed.

Transfections were carried out at 10 days in vitro (DIV) using TransFectin Lipid Reagent (Bio-Rad), according to the manufacturer’s instructions. The constructs Kv2.1WT-Dendra2 or Kv2.1WT-GFP derived from rKv2.1WT-GFPHis, a kind gift of J. R. Martens (University of Florida, USA). Experiments were conducted 12 days following transfection (22 DIV).

### Immunocytochemistry for STORM

For detection of Kv2.1WT-GFP, live neurons were incubated 10 min at 37°C with alpaca nanobodies against GFP coupled to Alexa Fluor 647 (GFP-Booster, 1/200; Proteintech) diluted in the culture medium, followed by two washes in PBS 1X. Neurons were then fixed for 10 min at -20°C in 100% methanol and washed in PBS 1X.

For detection of Kv2.1WT-Dendra2, neurons were fixed for 15 min at room temperature (RT) in paraformaldehyde (4% w/v; Thermo Scientific Chemicals) enriched in sucrose (4% w/v; Sigma-Aldrich) and washed in PBS 1X. Neurons were then incubated for 1 hour at RT with rabbit primary antibodies against Dendra2 (1/200; Antibodies Online). After 1 hour incubation at RT in PBS 1X supplemented with goat serum (PBS-GS; 10% v/v; Invitrogen), neurons were incubated for 30

min at RT with purified donkey anti-rabbit antibodies coupled to Alexa Fluor 647 (1/250; Jackson ImmunoResearch). For both incubations, antibodies were diluted in PBS-GS 10%.

For detection of GABA<sub>A</sub> receptors, live neurons were incubated for 20 min at 4°C with rabbit primary antibodies against the  $\alpha$ 1 subunit (1/500; Synaptic System) diluted in MEM-R (Minimum Essential Medium supplemented with HEPES 20 mM, Na<sup>+</sup> pyruvate 1 mM, glucose 20% w/v, glutamine 2 mM and B27 1X; Invitrogen), followed by several washes in MEM-R. Subsequently, neurons were fixed for 10 min at RT in paraformaldehyde enriched in sucrose and washed in PBS 1X. Neurons were then incubated for 45 min at RT with secondary purified donkey anti-rabbit antibodies coupled to Alexa Fluor 647 (1/300; Jackson ImmunoResearch) diluted in PBS-GS (3% v/v; Invitrogen) and washed in PBS 1X.

Coverslips were kept in PBS 1X until imaging.

### **Super-resolution imaging**

Super-resolution imaging on fixed samples was conducted on an inverted N-STORM Nikon Eclipse Ti microscope with a 100X oil-immersion objective (NA 1.49) and an Andor iXon Ultra 897 EMCCD camera (image pixel size, 105 nm), using specific lasers for PALM imaging of Dendra2 (405 and 561 nm) and STORM imaging of Alexa 647 (405 and 640 nm). In the case of PALM and STORM imaging on the same sample, first was taken the acquisition of Alexa 647 images without reactivation of the fluorophores with the 405 nm laser and then was acquired the Dendra2 images as usual. For STORM, samples were imaged in a PBS-based oxygen-scavenging buffer containing imaging buffer (Tris 100 mM, NaCl 20 mM, pH 8), glucose 40% (w/v; Sigma-Aldrich), PBS 1X, cysteamine hydrochloride (MEA; Sigma-Aldrich), catalase 5 mg/mL (Sigma-Aldrich) and pyranose oxidase 200 U/mL (Sigma-Aldrich). Catalase was diluted in MgCl 4 mM, 2 mM EGTA and PIPES 24 mM (Sigma-Aldrich, pH 6.8). Pyranose oxidase was diluted in the same buffer supplemented with glycerol (50% v/v). Videos of 30 000 frames were acquired at a frame rate of 20 msec. The z position was retained during the acquisition by a Nikon Perfect Focus System.

### **Single-molecule localisation**

Single-molecule localisation and 2D image reconstruction was performed as described in Specht *et al.* (2013)<sup>(22)</sup> by fitting the PSF of spatially separated fluorophores to a 2D Gaussian distribution. Poorly localised peaks (fitting  $R^2 < 0.7$ ) were not included for further analysis. To correct multiple detections coming from the same Dendra2 molecule, we identified detections occurring in the vicinity of space ( $2\sigma$ ) and time (15 s) as belonging to the same molecule<sup>(21)</sup>. The drift of the stage was corrected using 100 nm multicolour fluorescent beads (TetraSpeck, 1/300; Invitrogen) to follow the movement through the frames; and was nullified by superimposing the molecular localisations of each frame. Rendered images were obtained by superimposing the coordinates



of single-molecule detections, which were represented with 2D Gaussian curves of unitary intensity and SDs representing the localisation precision<sup>(9)</sup>.

### **Clustering analysis**

All data analyses were performed using custom routines in MATLAB (MathWorks) and executed typically in a PC equipped with an IntelCore i7 processor (1.69 GHz) and 16 Gb of RAM. The DBSCAN program was sourced from Pagoon *et al.* (2016)<sup>(16)</sup> and adapted to be run on MATLAB. The calculation of ARI and IoU scores were implemented in MATLAB following the algorithms described in Nieves *et al.* (2023)<sup>(23)</sup>. Clustering detection was carried out on regions of interest (ROIs) drawn on top of pointillistic images constructed from the coordinates of detections. A package with all the tools (ROI selection and clustering analysis) for executing Diinamic-R and Diinamic-V is freely available on <https://github.com/mlrennerfr/Diinamic>. This package includes Graphic User Interfaces (GUIs), a user manual and a tool helping the optimization of parameters.

#### *DBSCAN*

Starting at a random detection of the dataset, this detection is considered as a “core” point of a cluster if a minimum number of points were found around it, within the distance of the search radius (*epsilon*). The detections within the search radius then belonged to the cluster. By iteration, the algorithm proceeds similarly for all detections of the dataset. Ultimately, detections that do not belong to any cluster are considered as non-clustered detections.

#### *Diinamic-R and Diinamic-V*

Detections were initially sorted into belonging to candidate clusters or not depending on their localisation with respect to a segmentation mask. This mask was created by either thresholding the pixel intensity of the corresponding rendered image (Diinamic-R) or by evaluating the size of polygons resulting from a Voronoi tessellation (Diinamic-V) calculated using the “voronoi” function of MATLAB. The clusters’ borders were defined by the “boundary” function of MATLAB.

Candidate clusters were retained if: 1) their density, calculated in a pixel-wise manner, exceeded a threshold; 2) their sizes were between given thresholds (minimum and maximum). Thresholds were chosen considering the expected number of detections per molecule, the size of the molecule and the expected size of clusters given other microscopy data already published.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 (Dotmatics). Statistical significance was determined using Kruskal-Wallis tests followed by Dunn’s multiple comparison tests. Differences were considered not significant for *p-values* > 0.05, while significant values were indicated as follows: \*: *p* < 0.05, \*\*: *p* < 0.01, \*\*\*: *p* < 0.001 and \*\*\*\*: *p* < 0.0001.

## Results

We propose a new cluster identification algorithm, which performs a modular density-based analysis. The analysis was performed in two (cluster detection) or three phases (cluster and intra-cluster subdomain detection). The first phase preselected pixels or detections that were likely to belong to clusters, using density-based criteria (Fig. 1A). They were then used to create candidate clusters by coalescence. Phase two retained the candidate clusters that fulfilled user-defined parameters (minimum density, minimum and maximum size). The density threshold was calculated considering the size of the molecule of interest and the labelling method (number of expected fluorophores per molecule). The third phase, optional, sought for subdomains with different densities in the selected clusters.

The purpose of the first phase was to eliminate low density and low intensity detections, reducing spurious cluster detection and computational burden by eliminating irrelevant detections. These detections were considered as noise originating from non-clustered molecules, from autofluorescence or out-of-focus fluorophores.

There were two options for the first phase: Diinamic-R or Diinamic-V (Fig. 1A). The Diinamic-R algorithm selected candidate pixels by intensity-based segmentation of the rendered image. The pixel size of this image determined the grid used to calculate density. In addition to the intensity threshold, we applied a density threshold to each pixel if needed. These two thresholds were chosen to eliminate pixels with a value of intensity and/or a number of detections too low to be considered being part of a cluster. Those retained were used to create candidate clusters (Fig. 1B). Alternatively, Diinamic-V selected candidate clusters by Voronoi tessellation, using the area of the generated polygons for the selection (Fig. 1A). Voronoi polygons below a size threshold were retained to create candidate clusters.

The second phase verified whether the candidate clusters fulfilled the criteria regarding their minimum size and internal density (i.e. to remove false clusters due to multiple detections of one single-molecule) or maximum size (i.e. to remove coalescent clusters that could not be correctly defined). Density was calculated in a pixel-wise manner, using the pixel size of the rendered image (Fig. 1A).

### Performance analysis on point classification and geometric overlap

We first compared the performance of Diinamic-R and Diinamic-V on various sets of simulations of SMLM data. In a recent article, Nieves *et al.* (2023)<sup>(23)</sup> proposed a framework to evaluate SMLM cluster analysis algorithms, with simulated scenarios representing diverse situations of density of detections and size of clusters in a squared area of 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$ . They also proposed two metrics, the adjusted rand index (ARI), which analyses the classification of detections into the same

clusters than the ground truth; and the intersection over union (IoU) that analyses the overlap between the cluster areas in the output and the ground truth (here, the correct result). Perfect match provides values equal to one. We therefore analysed their scenarios with Diinamic-R and Diinamic-V.

Scenarios comprised different combinations of clustered and randomly distributed detections<sup>(23)</sup>. They included simulations of sparse data with very small clusters (Scenario 4); clusters of regular size, well separated, with different densities of homogeneously distributed detections inside and outside clusters (Scenarios 2, 3 and 8) or clusters surrounded by non-homogeneous distribution of non-clustered detections (Scenario 10); non-round clusters (Scenario 6) and clusters of different sizes (Scenarios 7, 8 and 9). Conditions were particularly difficult for clustering analysis in Scenarios 5, 6, 7 and 9, where clusters could overlap, and sometimes non-clustered detections appeared inside the perimeter of the cluster (Scenario 7). The nine scenarios were simulated in absence (Ground truth scenarios) or presence (Multiple blinking scenarios) of multiple detections per each original molecule simulated. In the latter case, each single molecule was replaced by a cloud of ~4–5 detections on average<sup>(23)</sup>.

As the real clusters were known, we optimized parameters to obtain results the closest possible to them. The execution times for the Ground truth scenario with the lowest number of detection (400 detections, Scenario 4) was 0.26 s for Diinamic-R and 0.98 s for Diinamic-V, whereas for the one with the largest number of molecules (3000 detections, Scenario 9), the analysis took 0.35 s for Diinamic-R and 6.02 s for Diinamic-V.

Both Diinamic-R and Diinamic-V performed well in most scenarios (Tables 1-2, Supplementary Fig. S1-2). Not surprisingly, the worse ARI scores were obtained in Scenarios 5, 6, 7 and 9, where there is an important overlap of clusters; then the attribution of detections to the correct cluster was less performant. In case of IoU scores, the worst was Scenario 4. This indicated, as already reported<sup>(23)</sup>, that the mapping of the borders of the cluster was difficult in sparse data where clusters were composed by few detections (5 in this case). Multiple blinking increased ARI and reduced IoU scores, as expected (Table 1 and 2, Supplementary Fig. S1-2).

To compare the versatility of Diinamic algorithms with respect to those already tested on the same scenarios (DBSCAN, ToMATo, KDE, FOCAL, ClusterViSu, CAML and SR-Tesseler)<sup>(23)</sup>, we considered the number of scenarios in which each algorithm obtained a score of at least ~0.8 (good), between ~0.6 and ~0.8 (acceptable) or below ~0.6 (bad) (Supplementary Tables S1). As distributions of ARI and IoU scores could be large, we chose the category in which most of the distribution of the score was situated, and we counted the number of scenarios with acceptable or good scores (Table 3)<sup>(23)</sup>. Diinamic algorithms were overall the most versatile, as they obtained acceptable or good results in more scenarios than the other algorithms.



To extend testing to situations with high density of detections and larger clusters, as the ones that we observe in some of our experiments, we created additional simulated scenarios.

### **Diinamic-R and Diinamic-V better defined the contour of clusters even under high noise conditions**

We tested systematically the capacity of Diinamic algorithms to define the borders of clusters if they were surrounded by randomly distributed detections (noise) at different densities. We thus simulated different combinations of detection densities in and out clusters. The density of detections within clusters was homogeneous. (Fig. 2A).

A first series of simulations was created containing 10 clusters of identical shape with a diameter of 50 nm (Fig. 2A1) or 250 nm (Fig. 2A2). In each simulation, all clusters had a given density, ranging from 8000 to 70000 detections/ $\mu\text{m}^2$ . The density of random detections ranged from 0 to 40000 detections/ $\mu\text{m}^2$  (Fig. 2A1 and A2). All the parameters of density and size used as thresholds for clustering analysis corresponded to the ground truth (here, the correct result).

For comparison purposes, we calculated the ratio of detection densities in and out of clusters for each set of simulations and we assessed the quality of cluster detection in relation to this ratio by counting the number of detections assigned to each cluster.

Given the results obtained above, we compared the results of Diinamic-R and Diinamic-V to those of DBSCAN, that showed a good level of adaptability to different scenarios (Table 3). DBSCAN and both Diinamic algorithms were able to detect the correct number of clusters across all ratios (not shown). No cluster was detected among the randomly distributed detections, even at high density (not shown).

As the number of detections changed from one simulation to the other, we divided the number of detections in each cluster by the real value to obtain a normalized number of detections (the ground truth is then equal to 1). Fig. 2B1 and Fig. 2B2 show the normalised number of detections for small and large clusters, respectively. As expected, all methods performed correctly when defining the borders of the clusters in case of low noise (high ratio), thus they correctly determined the number of detections belonging to the cluster in these conditions (ratio  $> 10^3$ ; Fig. 2B1 and Fig. 2B2). In presence of noise, however, their performance was affected by the size of clusters, providing results that roughly underestimated the number of detections by up to  $\sim 10\%$  in the case of small clusters (Fig. 2B1).

The result provided by Diinamic-R was overall closer to the ground truth for all ratios, in particular for the larger clusters (Fig. 2B2). DBSCAN performed well for small clusters but over-evaluated the number of detections in the case of large clusters and low ratios ( $\sim 5\%$ ). As a rule of thumb,

we found that DBSCAN did not perform as well as Diinamic when the difference in density inside and outside clusters was less than  $10^2$ .

### **Diinamic-V was less affected by multiple detections of the same molecule**

An important drawback in SMLM is the presence of multiple detections of the same fluorophore. Each fluorophore may be randomly detected several times (i.e. in multiple images of the acquisition, consecutive or not), generating a cloud of detections that could be easily considered as a cluster of molecules. This artefact is maximal when the labelling strategy results in a high number of fluorophores attached to the same molecule. We considered as the worst situation the STORM imaging of a large molecule containing several subunits, that is, potentially having several primary and secondary antibodies bound to it, together with the use of a secondary antibody bearing several fluorophores.

To assess the robustness of cluster detection in these conditions regarding the parameters used in the analysis, we simulated randomly distributed detections, and we added a cloud of extra detections around the original detection (Fig. 3A). The position of these extra detections was randomly chosen following a Gaussian distribution with mean zero and a variance equivalent to a typical localisation precision (20-50 nm). We varied the number of extra detections (0 to 50) to reach densities that can be observable in real experiments. We empirically optimised each user-given parameter for the three analyses to sift out as many false clusters as possible. Results are expressed as % of the maximum number of possible false clusters (the number of simulated molecules).

In sets with only randomly distributed detections, none of the algorithms detected any cluster (not shown). However, as soon as simulations included multiple detections, DBSCAN performed poorly, always detecting 5-10% of false clusters (Fig. 3B). Diinamic-R display a tendency to collect some false clusters at low densities of detections (non-significant), but performed better than DBSCAN for higher densities (Fig. 3A-B). Diinamic-V always showed more reliable results being able to reject all false clusters in the range of 0 to 50 detections/ $\mu\text{m}^2$  (Fig. 3A-B).

Therefore Diinamic-V was overall the best choice to overcome false cluster detection, although Diinamic-R performed notably well at high density of detections.

### **Diinamic-R and Diinamic-V performed better than DBSCAN on simulations of mixed populations of clusters.**

Data obtained on biological samples show clusters of molecules that often have nonhomogeneous spatial characteristics and densities, which complicates the choice of

thresholds for their detection. We therefore simulated images containing clusters of different sizes and densities. Simulations contained 20 round or ovoid clusters of sizes ranging from 100 to 1000 nm in diameter, with densities of 4000 to 60000 detections/ $\mu\text{m}^2$ . A moderate quantity of noise (110 detections/ $\mu\text{m}^2$ ) was added to reproduce a typical background noise. In the same line, 0 to 10 extra detections were added to each detection to simulate multiple detections (Fig. 4A). We used empiric parameters for each analysis, chosen to obtain results that were the closest to the ground truth.

As before, we evaluated the number of clusters that were detected, their number of detections and their area. In the case of DBSCAN, it was impossible to find a set of parameters that correctly picked up all the true clusters: either the analysis missed small and low-density clusters, or it detected false clusters arising from multiple detections. It often included detections out of high-density clusters (Fig. 4A, inset). Fig. 4B show the results obtained with the parameters needed to detect at least all the real clusters. DBSCAN systematically identified more clusters than what was expected (Fig. 4B1). Diinamic-R and Diinamic-V were both able to detect the right number of clusters (Fig. 4B1). Regarding the area of clusters and the number of detections per cluster, DBSCAN results were again significantly different from the ground truth, whereas Diinamic-R and Diinamic-V provided distributions that were not significantly different from the ground truth (Fig. 4B2 and Fig. 4B3).

Overall, we observed that DBSCAN had the tendency to fragment large and less dense clusters or identify false clusters distribution arising from multiple detections. In that regard Diinamic-R and Diinamic-V efficiently bypassed background noise, size and shape differences to identify a reliable number of clusters with area and number of detections not significantly different from the ground truth.

### **Example of application on PALM and STORM data**

We wondered how the different labelling strategies of SMLM might affect cluster detection. PALM may under-sample structures such as clusters if not all the molecules present in the structure bear a mature fluorescent protein. On the other hand, STORM may over-sample because antibodies can carry more than one fluorophore, and there could be more than one antibody per molecule.

To compare properly the clustering detection on PALM and STORM acquisitions, we transfected neurons with a Dendra2-tagged Kv2.1 chimera (Kv2.1WT-Dendra2). Kv2.1 is a tetrameric potassium channel known to form large clusters in neurons<sup>(24)</sup>. Before the imaging session, we immunolabeled Dendra2 with Alexa647 fluorophores so we could perform PALM and STORM to



obtain two sets of SMLM data of the same molecule on the same sample (see Materials and methods section).

Fig. 5A-C shows an example of the data obtained. Some clusters of PALM detections overlap as expected with those of STORM detections, while some others were present only in one set of data, due to the different labelling strategies (Fig. 5A-C). STORM data showed a multitude of small clusters that were not observable in PALM data. Thus, we considered them as being multiple detections of the same molecule (i.e. multiple fluorophores/antibodies on the same molecule). Some of the clusters observed with STORM seemed to be larger than in PALM data: this could be a consequence of placing the fluorophore on the secondary antibody, thus at a longer distance from the molecule of Kv2.1.

Both Diinamic-R and Diinamic-V (not shown) succeeded in identifying the same clusters in these datasets. However, as the execution time could be 20 times longer for Diinamic-V in the case of large datasets, we privileged Diinamic-R to run this test.

To set the minimum thresholds for Diinamic-R, we considered the structure of Kv2.1, the labelling method, and the expected size of clusters. As we could not know how many chimeric subunits were present per cluster (tetramers could contain both endogenous and chimeric subunits), we chose to use a low threshold for the number of detections (150). We calculated this number using the strategy described in Patrizio *et al.* (2017)<sup>(25)</sup> to assess the number of detections expected for one molecule.

Given the worst localization precision in this experiment (~30 nm for Dendra2 detection), and the possible enlargement of clusters due to the use of antibodies, the minimum size of the cluster was 50 grid units (5000 nm<sup>2</sup>, a square of ~70 nm in side) for PALM data and 70 grid units for STORM data. Given all the above considerations, the minimum density inside clusters was set to 2 detections/grid unit.

The most important difference between the parameters for PALM and STORM data was the intensity threshold to segment the rendered image (PALM: 0.5% of the maximum intensity; STORM: 15%) and the use of a minimum density per pixel (2) in case of STORM data. These differences were due to the different detection density ratios in and out clusters (Fig. 5 A,B).

The number of clusters detected were different (PALM: 17; STORM: 15), in agreement with the fact that some clusters were not observable in both datasets. However, we obtained distribution of number of detections per cluster and cluster surfaces that were not significantly different (Fig. 5D). Therefore, even if the labelling method had a strong influence on the characteristics of the dataset, it is possible to set parameters that provide concordant results for the same molecule.

## Improving cluster detection by combining Diinamic with DBSCAN

In case of dense datasets with variable density of detections, applying the same thresholds to different regions of the cell may provide results that are not satisfactory. Fig 6A shows an example of dense labelling of Kv2.1WT-Dendra2. Clusters recognizable by eye were merged by the analysis (dark blue in Fig. 6A2). To improve the analysis in these conditions, we performed two rounds of selection. In the first round, we selected clusters as described before (Fig. 6A2) and in the second round, we looked inside these clusters to identify areas with higher density (subdomains). We obtained the best results using DBSCAN for the second round. To cope with variable density from one cluster to the other, we calculated the search distance *epsilon* from the mean distance between detections in the cluster. As shown in Fig. 6A3, this strategy identified well the regions with higher densities that were observable by the eye in the pointillistic image (Fig. 6A1).

Indeed, this double-detection strategy was also able to detect subsynaptic domains (nanodomains) of GABA<sub>A</sub> receptors in synapses. Super-resolution microscopy revealed that neurotransmitter receptors, including the GABA<sub>A</sub>R<sup>(26–28)</sup>, can form subsynaptic domains in synapses whose existence can tune the efficacy of synaptic transmission (reviewed in Yang and Specht (2019)<sup>(29)</sup>, Maynard *et al.* (2023)<sup>(30)</sup>). We analysed a STORM dataset of the  $\alpha$ 1-subunit of GABA<sub>A</sub> receptor, which displayed a non-homogeneous clustered distribution in synapses<sup>(26)</sup>, and a mixed clustered and non-clustered distribution outside synapses. Fig. 6B1 and Fig. 6B2 show respectively the pointillistic and rendered images of a ROI on a dendrite of a hippocampal neuron. Fig. 6C shows the detail of one of the detected clusters using Diinamic-R (Diinamic-V provided the same results, not shown) before (Fig. 6C1) and after (Fig. 6C2) the detection of subdomains with DBSCAN.

## Discussion

Over the last decades, super-resolution microscopy has remarkably evolved, enabling the study of the organisation of molecules with a resolution of a few tens of nm. SMLM revealed sub-diffractive protein structures in diverse situations, such as T-cell signalling, the molecular architecture of the nuclear pore complex, sub-synaptic domains (“nanodomains”) of receptors, actin structures in axons and the arrangement of nucleosomes on chromatin fibres<sup>(14,31,32)</sup>. Besides the possibility to generate rendered images that are better resolved than regular optical fluorescent images, the pointillistic character of SMLM data opens a new field of biological image analysis. Indeed, rendered images hinder important information about the quality of labelling and the real density of detections, which may mislead comparisons between different experimental conditions<sup>(14)</sup>. The analysis of detection coordinates is preferable as it provides information not only about the distribution of molecules but also about the quality of the data, helping to choose the right clustering algorithm and providing a quantitative imaging tool at the nanoscale applicable to living cells.

Despite the power of SMLM, which theoretically provides the position of every single molecule, its application to biological samples is not straightforward. Typically, the difficulty to decide whether a cloud of detections is a cluster of molecules resides in the fact that the characteristics of these clusters depend not only on the molecules themselves (their size and their local concentration) but also on the labelling technique (number of fluorophores attached to the molecule, distance between the fluorophore and the molecule of interest, the proportion of molecules that bear a fluorophore), the photo-physics of the fluorophore (blinking) and the imaging conditions (laser power and acquisition protocol). In addition to this, spurious detections are coming from autofluorescence and out-of-focus signals.

### **Diinamic, a modular method for cluster analysis on SMLM data**

Diinamic is a modular sequence of cluster detection steps that couples a space fragmentation method using an intensity-thresholded rendered image or Voronoi tessellation, with a local density calculation. The space fragmentation phase helped to reduce the relative importance of low intensity signals arising from out-of-focus fluorophores or autofluorescence. Consequently, it also reduced the amount of irrelevant data. The use of a grid-based selection, with a grid size based on the pixel size of rendered images, introduces a density criterion that also considers the localisation precision. The use of the smallest possible grid size also made the choice of the size unambiguous, and the analysis independent of the shape and size of clusters.

In the variety of situations that we tested here, Diinamic-R and Diinamic-V managed to detect the proper number of clusters and to provide trustable distributions of area and number of detections per cluster showing a remarkably versatility.

The strategy of space fragmentation using a grid has been already implemented by FOCAL<sup>(17)</sup>. However, the use that Diinamic-R and FOCAL make of this grid is different. Whereas FOCAL enhances the density difference in and out clusters by convolving the number of detections of each element of the grid (SMLM pixel) with a 3x3 sum filter, Diinamic-R does not modify the number of detections per pixel, as the enhancement is performed by the intensity threshold applied to the rendered image. Thus, FOCAL blurs the borders whereas Diinamic-R sharpens them.

Indeed, Diinamic algorithms mapped the borders better than DBSCAN even in difficult situations with clusters whose internal density was only 10 to 100 times higher than the density of detections in the surroundings. Therefore, Diinamic-R and Diinamic-V proved to be more robust to artefacts arising from the uneven distribution of non-clustered detections or the uneven distribution of background noise within a sample or between samples. They also performed very well for clusters of different sizes and densities, as it is commonly the case for biological SMLM data. However, in SMLM data, DBSCAN improved the analysis when applied to data from previously defined clusters. In this case, the use of a second round of analysis amended a poor cluster detection, or detected intra-cluster inhomogeneities that arise from subdomains in the distribution of clustered molecules.

As already reported<sup>(19)</sup>, Voronoi tessellation (Diinamic-V) was robust to multiple detections and different background densities, but for this the polygon size threshold has to be correctly determined. The existing software relies on the calculation of the mean density outside clusters (SR-Tesseler<sup>(18)</sup>) or on the simulation of random distributions (ClusterViSu<sup>(19)</sup>) to set this value. We preferred to introduce a user-defined threshold that considers the labelling method, which heavily affects the expected density of detections. This threshold was then calculated considering the size of the labelled molecule, the expected number of fluorophores and detections per molecule and the maximum possible distance between the fluorophore and the labelled molecule. An important difference with respect to previously proposed algorithms, Diinamic-V introduced a second density-based selection, using a grid defined by the expected resolution of the data. Our analysis thus pondered the result of Voronoi tessellation with the localisation precision. A drawback could be the increase in computational time, therefore a piece of advice could be to systematically compare both on a small subset of data. Nevertheless, Diinamic-V is a good choice when there is an important risk of detection of false clusters due to multiple blinking, and also when the intensity threshold for Diinamic-R is difficult to find, i.e. when the density of non-clustered detections is not homogeneous.



One criticism that can be made is the use of multiple user-defined thresholds. Most of the analytical algorithms proposed in the literature need the setting of user-defined thresholds and parameters that can be annoyingly variable from one laboratory to the other or even from one user to the other. Therefore, some strategies were developed, such as the use of Bayesian analysis, to avoid user-defined values<sup>(33)</sup>. However, biological data is by nature noisy, heterogeneous, and variable, making this blind strategy not easy to apply to all kinds of datasets. Moreover, as reported by Nieves *et al.* (2023)<sup>(23)</sup>, algorithms that rely on more thresholds were more performant. Consequently, we decided to keep the possibility to use thresholds that must be determined for each type of sample that is imaged to assure biological plausibility.

### **Proposed pipeline to analyse clustering on SMLM data**

Even if SMLM techniques may induce various artefacts in clustering analysis, it is possible to minimize these artefacts by carefully preparing the experiment and by managing data correctly. An important point is to decide whether to use parameters to exclude candidate clusters and which parameters to use. The first issue to consider is whether the molecule under study is already known to form clusters. If clusters were already described (i.e. receptors in synapses) then the parameters could be set considering the size of these clusters. Otherwise, the advice would be to keep all the candidate clusters in a first approximation and to compare the results obtained with different labelling strategies to evaluate the artefacts due to the technique itself. The points to consider would be:

- Which labelling method can be used? Which is the expected proportion of molecules that could be detected? Which is the probability of observing multiple detections of the same fluorophore? How do you define a cluster?
- Can the distribution of the molecule be predicted?
  - o If no: choose parameters that do not exclude any cluster (setting minimum thresholds to zero and maximum to the largest possible).
  - o If yes: calculate the expected density of detections in and out of clusters, given the size of the molecule, whether it is composed or not of labelled subunits, and the expected number of observable fluorophores. Set exclusion parameters given the expected size of clusters.
- Whenever possible, use different labelling strategies and fluorophores to image the same molecule. Compare the results to evaluate artefacts and improve the choice of parameters.

Regarding the choice of the analysis strategy, we found that:

- If the density of detections was low, the best results were obtained relying mainly on the pre-selection by intensity segmentation (Diinamic-R).
- If the density of non-clustered detections was variable (i.e multiple blinking or non-homogeneous distribution of non-clustered molecules), Diinamic-V was a better choice.
- If the ratio of detections densities in and out clusters was low, the detection of subdomains within clusters could improve the results.

In conclusion, by combining multiple and progressive analysis steps, Diinamic algorithms offer the flexibility needed to adapt the analysis protocol to a large variety of molecular distributions and SMLM data. In addition, they provide the possibility to introduce biology-based criteria (the expected characteristics of clusters) to describe the clustering behaviour of molecules.

## **Acknowledgements**

We thank J. R. Martens (University of Florida, USA) for the original GFP-tagged Kv2.1 construction and the IFM imaging platform for their help with the imaging experiments.

## **Competing interests**

The authors declare no competing interests in relation to the submitted work.

## **Author contribution**

M. Renner wrote the code for SMLM simulations and clustering analysis, designed the super-resolution experiments on Kv2.1 channel and supervised the experimental work. A-L. Paupiah wrote the code for clustering analysis, run SMLM simulations, performed STORM and PALM experiments on Kv2.1 and analyzed all the data. X. Marques set the protocols for SMLM experiments. S. Levi supervised the experiments on GABA<sub>A</sub>R and Z. Merlaud performed the experiments on GABA<sub>A</sub>R. M. Rousseau prepared the hippocampal cultures. A-L. Paupiah and M. Renner prepared the figures and wrote the paper.

## **Financial support**

This work was supported by Sorbonne University (IDEX SUPER), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, as well as by the Agence Nationale de la Recherche (ANR WATT ANR-19-CE16-0005 to SL), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (to SL) and Fondation Française pour la Recherche sur l'Épilepsie (to SL). ALP and ZM are the recipients of a doctoral fellowship from the Sorbonne Université (Réseau Biologie des Systèmes to ALP). The acquisition of the STORM/PALM microscope was supported by DIM NeRF from Région Ile-de-France and by the FRC/Rotary 'Espoir en tête'.

## **Data and software availability**

All data reported in this paper will be shared upon request. Any additional information required to re-analyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request. A package containing all the tools implemented with Graphic User Interfaces (GUIs), a detailed user manual and a tool helping the optimization of parameters for executing Diinamic-R and Diinamic-V is freely available at <https://github.com/mlrennerfr/Diinamic>.

## References

1. Sydor AM, Czymmek KJ, Puchner EM, Mennella V. Super-Resolution Microscopy: From Single Molecules to Supramolecular Assemblies. *Trends Cell Biol.* 2015 Dec;25(12):730–48.
2. Baddeley D, Bewersdorf J. Biological Insight from Super-Resolution Microscopy: What We Can Learn from Localization-Based Images. *Annu Rev Biochem.* 2018 Jun;87:965–89.
3. Khater IM, Nabi IR, Hamarneh G. A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods. *Patterns.* 2020 Jun;1(3):100038.
4. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* 2006 Sep 15;313(5793):1642–5.
5. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nat Methods.* 2006 Oct;3(10):793–5.
6. Heilemann M, van de Linde S, Schuttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, et al. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem-Int Ed.* 2008 Jul;47(33):6172–6.
7. Van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, et al. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc.* 2011 Jul;6(7):991–1009.
8. Schnitzbauer J, Strauss MT, Schlichthaerle T, Schueder F, Jungmann R. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nat Protoc.* 2017 Jun;12(6):1198–228.
9. Baddeley D, Cannell MB, Soeller C. Visualization of Localization Microscopy Data. *Microsc Microanal.* 2010 Feb;16(1):64–72.
10. Sengupta P, Jovanovic-Taliman T, Lippincott-Schwartz J. Quantifying Spatial Organization in Point Localization Superresolution Images Using Pair Correlation Analysis. *Nat Protoc.* 2013 Feb;8(2):345–54.
11. Lagache T, Lang G, Sauvonnnet N, Olivo-Marin JC. Analysis of the Spatial Organization of Molecules with Robust Statistics. *PLOS ONE.* 2013 Dec;8(12):e80914.
12. Endesfelder U, Malkusch S, Fricke F, Heilemann M. A simple method to estimate the average localization precision of a single-molecule localization microscopy experiment. *Histochem Cell Biol.* 2014 Jun;141(6):629–38.
13. Griffié J, Boelen L, Burn G, Cope AP, Owen DM. Topographic prominence as a method for cluster identification in single-molecule localisation data. *J Biophotonics.* 2015 Nov;8(11–12):925–34.
14. Nicovich PR, Owen DM, Gaus K. Turning single-molecule localization microscopy into a quantitative bioanalytical tool. *Nat Protoc.* 2017 Mar;12(3):453–60.
15. Malkusch S, Heilemann M. Extracting quantitative information from single-molecule super-resolution imaging data with LAMA – LocAlization Microscopy Analyzer. *Sci Rep.* 2016 Oct 5;6:34486.



16. Pigeon SV, Nicovich PR, Mollazade M, Tabarin T, Gaus K. Clus-DoC: a combined cluster detection and colocalization analysis for single-molecule localization microscopy data. *Mol Biol Cell*. 2016 Nov;27(22):3627–36.
17. Mazouchi A, Milstein JN. Fast Optimized Cluster Algorithm for Localizations (FOCAL): a spatial cluster analysis for super-resolved microscopy. *Bioinforma Oxf Engl*. 2016 Mar;32(5):747–54.
18. Levet F, Hosy E, Kechkar A, Butler C, Beghin A, Choquet D, et al. SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat Methods*. 2015 Nov;12(11):1065–71.
19. Andronov L, Orlov I, Lutz Y, Vonesch JL, Klaholz BP. ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy. *Sci Rep*. 2016 Apr;6:24084.
20. Pike JA, Khan AO, Pallini C, Thomas SG, Mund M, Ries J, et al. Topological data analysis quantifies biological nano-structure from single molecule localization microscopy. *Bioinformatics*. 2020 Mar;36(5):1614–21.
21. Battaglia S, Renner M, Russeau M, Côme E, Tyagarajan SK, Lévi S. Activity-Dependent Inhibitory Synapse Scaling Is Determined by Gephyrin Phosphorylation and Subsequent Regulation of GABAA Receptor Diffusion. *eNeuro*. 2018 Jan;5(1):03-17.2017.
22. Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, El Beheiry M, Rostaing P, Darzacq X, et al. Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron*. 2013 Jul;79(2):308–21.
23. Nieves DJ, Pike JA, Levet F, Williamson DJ, Baragilly M, Oloketuyi S, et al. A framework for evaluating the performance of SMLM cluster analysis algorithms. *Nat Methods*. 2023 Feb;20(2):259–67.
24. Misonou H, Mohapatra DP, Trimmer JS. Kv2.1: A Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Critical to Dynamic Control of Neuronal Excitability. *NeuroToxicology*. 2005 Oct;26(5):743–52.
25. Patrizio A, Renner M, Pizzarelli R, Triller A, Specht CG. Alpha subunit-dependent glycine receptor clustering and regulation of synaptic receptor numbers. *Sci Rep*. 2017 Sep;7(1):10899.
26. Merlaud Z, Marques X, Russeau M, Saade U, Tostain M, Moutkine I, et al. Conformational state-dependent regulation of GABAA receptor diffusion and subsynaptic domains. *iScience*. 2022 Oct;25(11):105467.
27. Crosby KC, Gookin SE, Garcia JD, Hahm KM, Dell'Acqua ML, Smith KR. Nanoscale Subs synaptic Domains Underlie the Organization of the Inhibitory Synapse. *Cell Rep*. 2019 Mar;26(12):3284-3297.e3.
28. Dzyubenko E, Rozenberg A, Hermann DM, Faissner A. Colocalization of synapse marker proteins evaluated by STED-microscopy reveals patterns of neuronal synapse distribution in vitro. *J Neurosci Methods*. 2016 Nov;273:149–59.
29. Yang X, Specht CG. Subs synaptic Domains in Super-Resolution Microscopy: The Treachery of Images. *Front Mol Neurosci*. 2019 Jul;12:161.
30. Maynard SA, Ranft J, Triller A. Quantifying postsynaptic receptor dynamics: insights into synaptic function. *Nat Rev Neurosci*. 2023 Jan;24(1):4–22.

31. Maglione M, Sigrist SJ. Seeing the forest tree by tree: super-resolution light microscopy meets the neurosciences. *Nat Neurosci*. 2013 Jul;16(7):790–7.
32. Mendes A, Heil HS, Coelho S, Leterrier C, Henriques R. Mapping molecular complexes with super-resolution microscopy and single-particle analysis. *Open Biol*. 2022 Feb;12(7):220079.
33. Griffié J, Shlomovich L, Williamson DJ, Shannon M, Aaron J, Khuon S, et al. 3D Bayesian cluster analysis of super-resolution data reveals LAT recruitment to the T cell synapse. *Sci Rep*. 2017 Jun;7(1):4077.

## Tables

**Table 1. Performance analysis of Diinamic-R and Diinamic-V against Ground truth Scenarios 2-10 from Nieves *et al.* (2023)<sup>(23)</sup>. Results were scored using ARI and IoU scores using the same optimized parameters for all the simulations (n = 50) from each scenario.**

Ground truth Scenario #	ARI (mean ± SD)		IoU (mean ± SD)	
	Diinamic-R	Diinamic-V	Diinamic-R	Diinamic-V
2	0.88 ± 0.06	0.82 ± 0.10	0.87 ± 0.02	0.72 ± 0.02
3	0.93 ± 0.05	0.93 ± 0.05	0.84 ± 0.04	0.69 ± 0.02
4	0.87 ± 0.08	0.70 ± 0.12	0.58 ± 0.08	0.46 ± 0.06
5	0.51 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.67 ± 0.01
6	0.74 ± 0.10	0.65 ± 0.10	0.83 ± 0.03	0.81 ± 0.02
7	0.68 ± 0.10	0.50 ± 0.13	0.71 ± 0.03	0.68 ± 0.03
8	0.87 ± 0.89	0.81 ± 0.10	0.79 ± 0.04	0.64 ± 0.04
9	0.58 ± 0.13	0.59 ± 0.14	0.80 ± 0.02	0.78 ± 0.02
10	0.89 ± 0.06	0.83 ± 0.09	0.82 ± 0.05	0.67 ± 0.03

**Table 2. Performance analysis of Diinamic-R and Diinamic-V** against Scenarios 2-10 from Nieves *et al.* (2023)<sup>(23)</sup>, simulating multiple blinking of fluorophores. Results were scored using ARI and IoU scores using the same optimized parameters for all the simulations (n = 50) from each scenario.

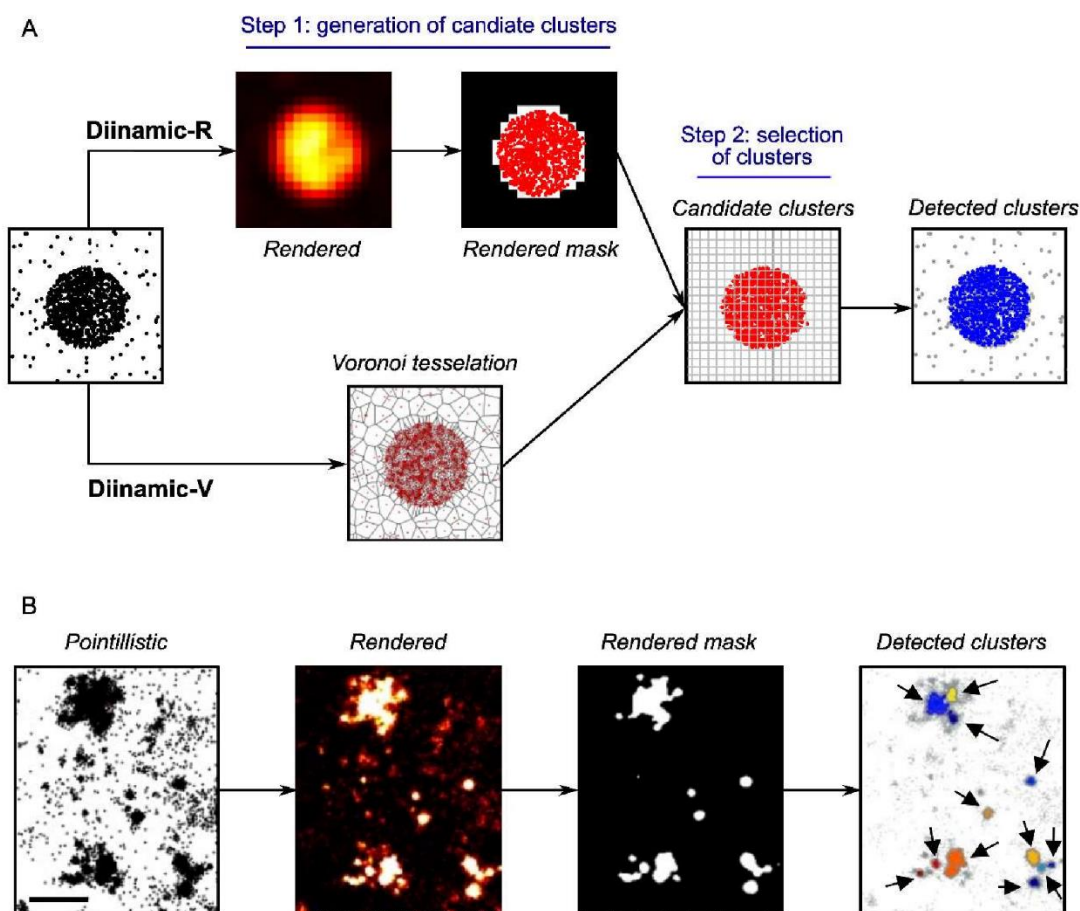
Multiple blinking Scenario #	ARI (mean $\pm$ SD)		IoU (mean $\pm$ SD)	
	Diinamic-R	Diinamic-V	Diinamic-R	Diinamic-V
2	0.91 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.09
3	0.92 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.05
4	0.91 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.07	0.39 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.06
5	0.65 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.02
6	0.71 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.11	0.85 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.02
7	0.74 $\pm$ 0.12	0.67 $\pm$ 0.13	0.65 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.04
8	0.92 $\pm$ 0.07	0.88 $\pm$ 0.09	0.65 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.04
9	0.60 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.15	0.84 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.03
10	0.91 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.04

**Table 3. Versatility of Diinamic-R and Diinamic-V**, evaluated by counting the number of scenarios with acceptable or good scores (scores above ~0.6). Column “Sum” is the sum for both scores in Ground truth and Multiple blinking scenarios.

Algorithm	Number of scenarios with scores > ~0.6				Sum
	ARI		IoU		
	Ground truth scenarios	Multiple blinking scenarios	Ground truth scenarios	Multiple blinking scenarios	
Diinamic-R	7	8	8	8	31
Diinamic-V	7	8	8	8	31
DBSCAN	7	5	6	7	25
ToMATo	6	5	6	5	22
KDE	5	4	4	3	17
CAML	5	5	6	0	16
FOCAL	4	1	4	1	10
SRTesseler	4	3	1	2	10
ClusterVISU	4	4	0	0	8

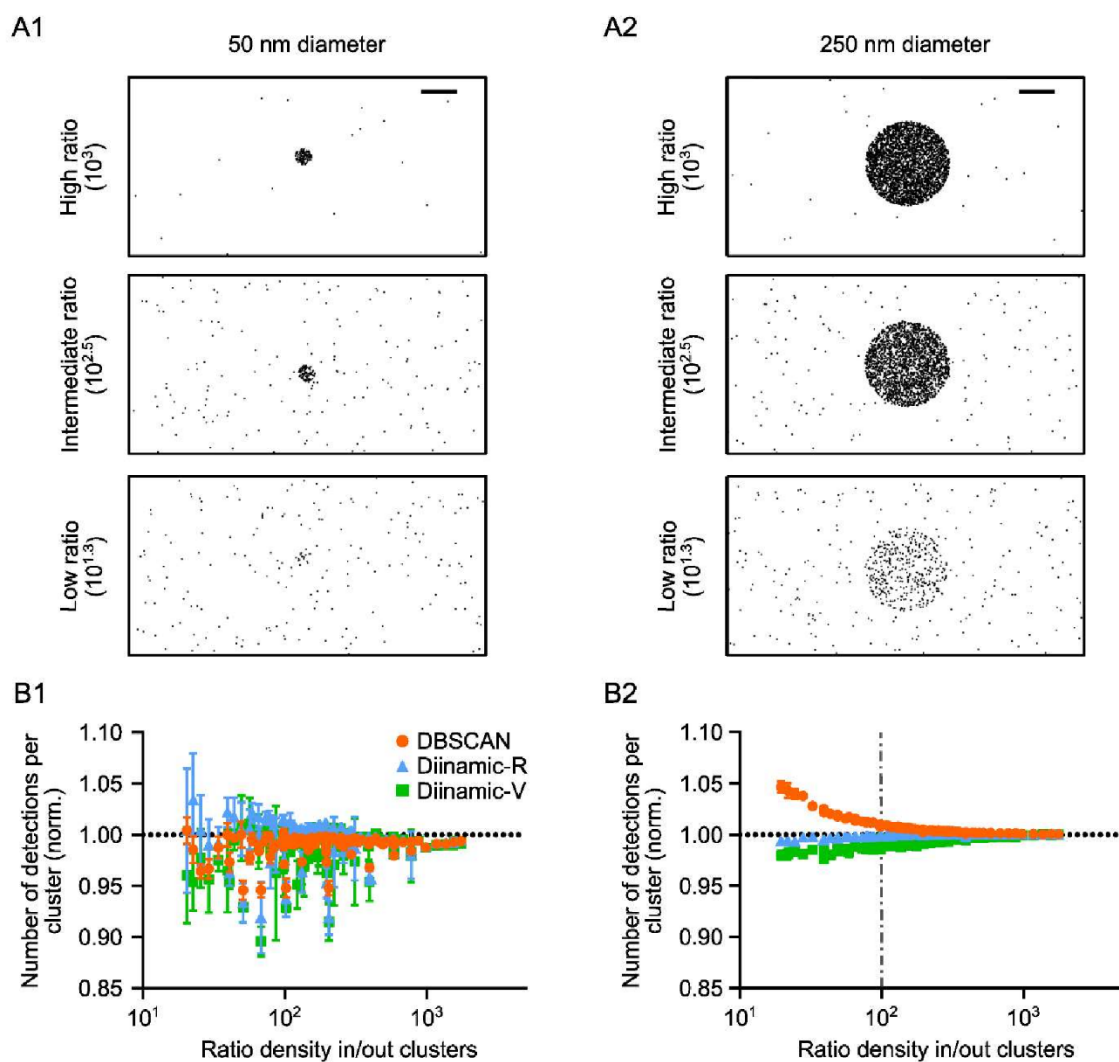
## Figure legends

**Fig 1. Protocol for clustering analysis on SMLM data using Diinamic-R or Diinamic-V. (A)** Schematic representation of the analysis phases on a simulated cluster. Diinamic-R relies on the segmented rendered image to select candidate clusters whereas Diinamic-V uses a Voronoi tessellation. Pixels that bear enough density of detections (Diinamic-R) or Voronoi tesserae (polygons) that are small enough (Diinamic-V) are used to create candidate clusters by coalescence. Candidate clusters are analysed on a grid created from the pixel size of rendered images, and they are retained if they fulfil density and size criteria. **(B)** Application of the Diinamic-R protocol on PALM data of Dendra2-tagged Kv2.1 channels in hippocampal neuron cultures. The pointillistic image (left) represents the coordinates of detections, which are used to create a rendered image of detections (“Rendered”, see Materials and methods). After segmenting the rendered image with an intensity threshold, the rendered mask is used to preselect pixels and candidate clusters. The final result (right panel, “Detected clusters”) shows each retained cluster in a different colour (arrows). Note the variable size of clusters that can be adjacent to other clusters. Scale bar: 300 nm.

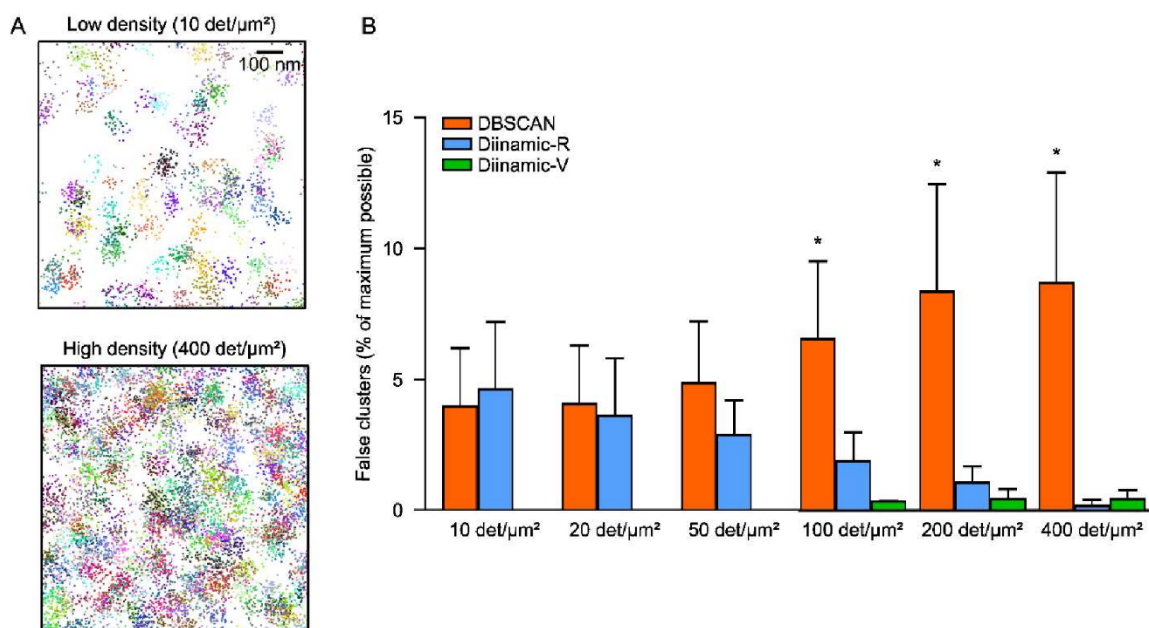




**Fig 2. Performance of DBSCAN, Diinamic-R and Diinamic-V in finding the borders of clusters depending on the density of background noise. (A)** Examples of a simulated cluster of small (50 nm; A1) or large (250 nm; A2) diameter, surrounded by non-clustered detections (“noise”). The simulations contained 10 clusters with the same characteristics. The density of detections in and out of clusters was variable to vary the ratio cluster density/noise density. Scale bar: 100 nm. **(B)** Quantifications of the number of detections per detected cluster for small (B1) and large-sized (B2) simulated clusters with respect to the ratio between the density in and out of clusters (Ratio density in/out clusters) for DBSCAN (orange circles), Diinamic-R (blue triangles), and Diinamic-V (green squares). The horizontal discontinuous line represents the ground truth. Mean  $\pm$  SD, n = 3 independent simulations.



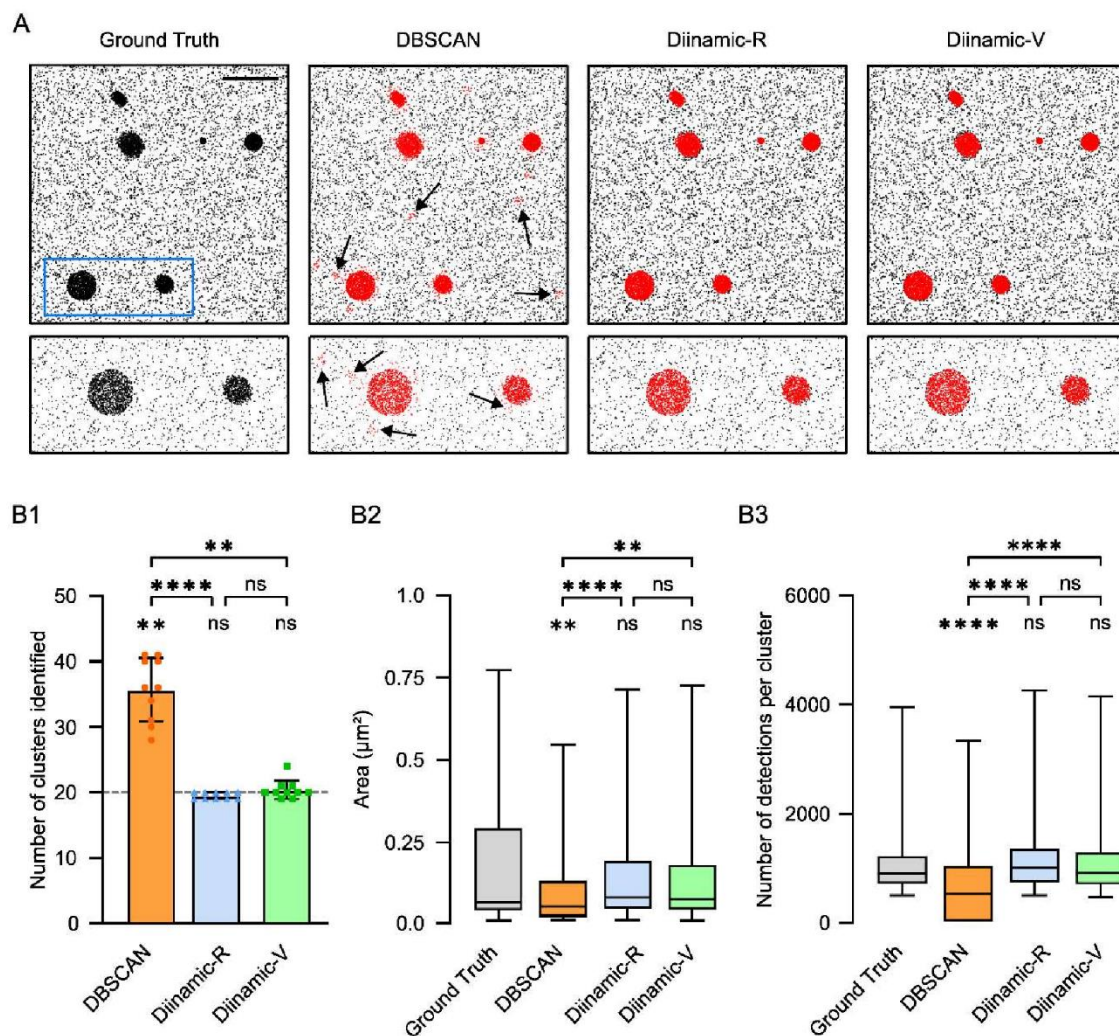
**Fig 3. Performance of DBSCAN, Diinamic-R and Diinamic-V in avoiding the detection of false clusters arising from multiple detections of randomly distributed molecules. (A)** The positions of randomly distributed molecules at low (top panel) or high (bottom panel) density were overlaid by a cloud of detections to simulate multiple detections of each molecule. Each group (initial detection plus the cloud of multiple detections) are depicted in a different colour. Scale bar: 100 nm. **(B)** Proportion of false clusters detected (as % of the maximum possible, which is the number of molecules) by the three analysis methods, for simulations with the indicated density of molecules. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$  independent simulations, KW test and Dunn post-hoc with respect to the ground truth, \*:  $p < 0.05$ .



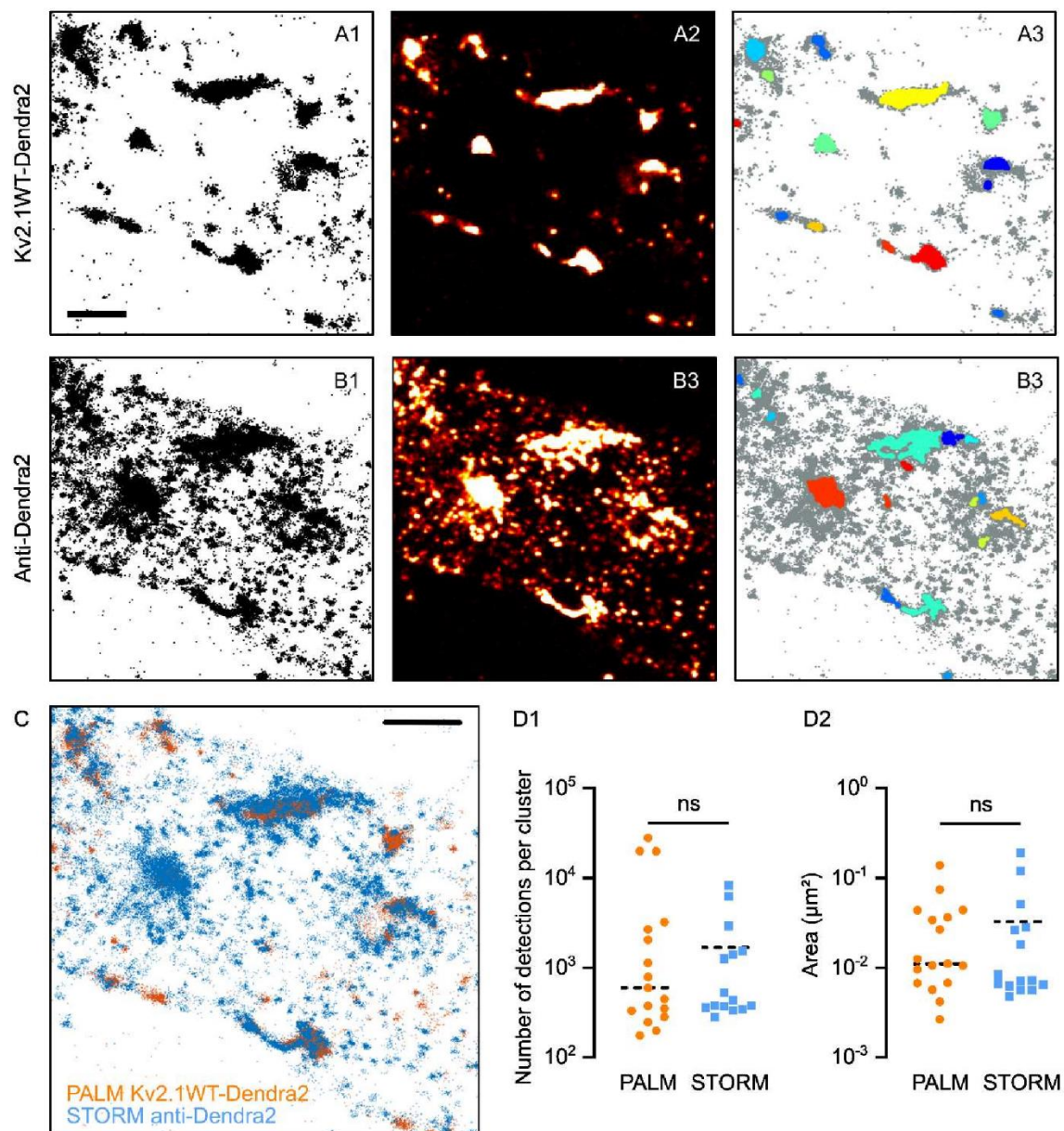


**Fig 4. Performance of DBSCAN, Diinamic-R and Diinamic-V in detecting clusters in a mixed population of clusters of different sizes and densities, in presence of multiple detections.**

Simulated data contained 20 clusters of different sizes and densities, surrounded by randomly distributed detections. **(A)** Pointillistic images of an example of simulation and the clusters detected by the three analyses (in red). Blue rectangle: area shown with higher magnification in the lower panels. Note the detection of small and false clusters by DBSCAN (black arrows). Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . **(B)** Quantifications of the detected clusters. (B1) Number of clusters (the horizontal line shows the ground truth). Mean  $\pm$  SD. (B2) Area. Median and 5%-95% IQR. (B3) Number of detections. Median and 5%-95% IQR.  $n = 10$  independent simulations. KW test and Dunn post-hoc, ns: not significant, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

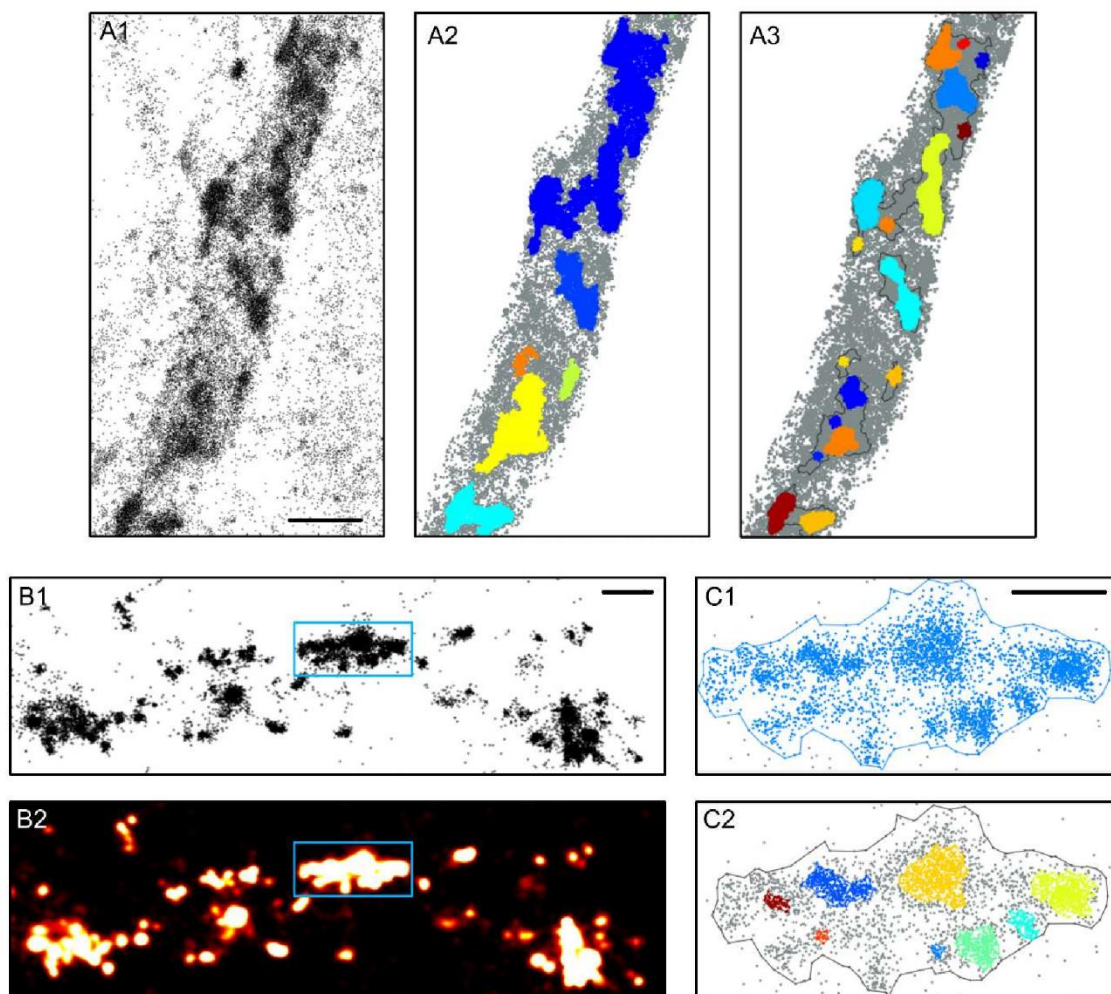


**Fig 5. Clustering analysis in PALM vs STORM data.** Pointillistic images (A1, B1); rendered images (A2, B2) and cluster detection (A3, B3) of a PALM (A) and STORM (B) dataset obtained on the same molecules (Kv2.1WT-Dendra2, labelled with Alexa 647-coupled antibodies anti-Dendra2) of the sample. In A3, B3, each detected cluster is depicted with a different color; all the other detections appear in grey. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . (C) Overlay of pointillistic images in A1, B1. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . (D) Cluster detection results (number of detections per cluster, D1; area of clusters, D2) of the data in A3, B3.





**Fig 6. Detection of clusters and subdomains within clusters on SMLM data. (A)** SMLM detections (pointillistic image, A1) and cluster detection in an example of dense PALM data for Kv2.1 in a cultured hippocampal neuron. (A2) Clusters found by Diinamic-R, depicted in different colours. (A3) Second detection of clusters by DBSCAN (subdomains), inside the clusters detected by Diinamic. Scale bar: 1  $\mu$ m. **(B)** Pointillistic (B1) and rendered (B2, false colours) STORM images of the  $\alpha$ 1 subunit of GABA<sub>A</sub>R at the surface of a cultured hippocampal neuron. The blue rectangle indicates the region zoomed in C. Scale bar: 200 nm. **(C)** Higher magnification of a cluster detected in B1 (C1) and the subdomains found (C2). In C2, each subdomain appears in a different colour. Detections in the cluster but not in subdomains appear in grey. The contour indicates the border of the cluster. Scale bar: 100 nm.





## BIBLIOGRAPHIE

- Abriel, H., Motoike, H., & Kass, R. S. (2000). KChAP: A novel chaperone for specific K<sup>+</sup> channels key to repolarization of the cardiac action potential. Focus on “KChAP as a chaperone for specific K<sup>+</sup> channels”. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 278(5).
- Achard, P., & Schutter, E. D. (2006). Complex Parameter Landscape for a Complex Neuron Model. *PLOS Computational Biology*, 2(7), e94.
- Aggarwal, S. K., & MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K<sup>+</sup> Channel. *Neuron*, 16(6), 1169–1177.
- Almog, M., & Korngreen, A. (2016). Is realistic neuronal modeling realistic? *Journal of Neurophysiology*, 116(5), 2180–2209.
- Amberg, G. C., Rossow, C. F., Navedo, M. F., & Santana, L. F. (2004). NFATc3 Regulates Kv2.1 Expression in Arterial Smooth Muscle\*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 47326–47334.
- Amberg, G. C., & Santana, L. F. (2006). Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(2).
- Aminoff, M. J., Boller, F., & Swaab, D. F. (2013). *Pediatric Neurology, Part I: Handbook of Clinical Neurology Volume 111*. Elsevier Science.
- An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.-P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S., & Rhodes, K. J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, 403(6769), Article 6769.
- Antonucci, D. E., Lim, S. T., Vassanelli, S., & Trimmer, J. S. (2001). Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, 108(1), 69–81.
- Antz, C., & Fakler, B. (1998). Fast Inactivation of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels: From Cartoon to Structure. *Physiology*, 13(4).
- Archer, S. L., Souil, E., Dinh-Xuan, A. T., Schremmer, B., Mercier, J. C., El Yaagoubi, A., Nguyen-Huu, L., Reeve, H. L., & Hampl, V. (1998). Molecular identification of the role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2319–2330.
- Armstrong, C. M. (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *The Journal of General Physiology*, 58(4), 413–437.

- Arzimanoglou, A., French, J., Blume, W. T., Cross, J. H., Ernst, J.-P., Feucht, M., Genton, P., Guerrini, R., Kluger, G., Pellock, J. M., Perucca, E., & Wheless, J. W. (2009). Lennox-Gastaut syndrome: A consensus approach on diagnosis, assessment, management, and trial methodology. *The Lancet. Neurology*, *8*(1), 82–93.
- Auvin, S., Pineda, E., Shin, D., Gressens, P., & Mazarati, A. (2012). Novel Animal Models of Pediatric Epilepsy. *Neurotherapeutics*, *9*(2), 245–261.
- Baculis, B. C., Zhang, J., & Chung, H. J. (2020). The Role of Kv7 Channels in Neural Plasticity and Behavior. *Frontiers in Physiology*, *11*.
- Baddeley, D., Cannell, M. B., & Soeller, C. (2010). Visualization of Localization Microscopy Data. *Microscopy and Microanalysis*, *16*(1), 64–72.
- Bar, C., Barcia, G., Jennesson, M., Le Guyader, G., Schneider, A., Mignot, C., Lesca, G., Breuillard, D., Montomoli, M., Keren, B., Doummar, D., Billette de Villemeur, T., Afenjar, A., Marey, I., Gerard, M., Isnard, H., Poisson, A., Dupont, S., Berquin, P., ... Nabbout, R. (2020). Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Human Mutation*, *41*(1).
- Bar, C., Breuillard, D., Kuchenbuch, M., Jennesson, M., Le Guyader, G., Isnard, H., Rolland, A., Doummar, D., Fluss, J., Afenjar, A., Berquin, P., De Saint Martin, A., Dupont, S., Goldenberg, A., Lederer, D., Lesca, G., Maurey, H., Meyer, P., Mignot, C., ... Nabbout, R. (2022). Adaptive behavior and psychiatric comorbidities in KCNB1 encephalopathy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, *126*.
- Bar, C., Kuchenbuch, M., Barcia, G., Schneider, A., Jennesson, M., Le Guyader, G., Lesca, G., Mignot, C., Montomoli, M., Parrini, E., Isnard, H., Rolland, A., Keren, B., Afenjar, A., Dorison, N., Sadleir, L. G., Breuillard, D., Levy, R., Rio, M., ... Nabbout, R. (2020). Developmental and epilepsy spectrum of KCNB1 encephalopathy with long-term outcome. *Epilepsia*, *61*(11).
- Bar Maillet, C. (2021). *Encéphalopathie KCNB1: Du phénotype humain aux modèles poissons-zèbres* [These de doctorat, Sorbonne université].
- Barak, N., Greitzer, D., Berlin, S., Chikvashvili, D., Singer-Lahat, D., & Lotan, I. (2011). Non Channel Function of Kv2.1 to Facilitate Exocytosis; Underlying Molecular Mechanism. *Biophysical Journal*, *100*(3, Supplement 1), 410a.
- Baranauskas, G. (2007). Ionic Channel Function in Action Potential Generation: Current Perspective. *Molecular Neurobiology*, *35*(2), 129–150.

- Baukrowitz, T., & Yellen, G. (1995). Modulation of K<sup>+</sup> current by frequency and external [K<sup>+</sup>]: A tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*, 15(4), 951–960.
- Beckner, M. E. (2020). A roadmap for potassium buffering/dispersion via the glial network of the CNS. *Neurochemistry International*, 136, 104727.
- beim Graben, P., & Wright, J. (2011). From McCulloch–Pitts Neurons Toward Biology. *Bulletin of Mathematical Biology*, 73(2), 261–265.
- Bemporad, D., Sands, Z. A., Wee, C. L., Grottesi, A., & Sansom, M. S. P. (2006). Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers. *Biochemistry*, 45(39), 11844–11855.
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P., & Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685.
- Berg, A. T., Zelko, F. A., Levy, S. R., & Testa, F. M. (2012). Age at onset of epilepsy, pharmacoresistance, and cognitive outcomes: A prospective cohort study. *Neurology*, 79(13), 1384–1391.
- Bertocchi, I., Cambiaghi, M., & Hasan, M. T. (2023). Advances toward precision therapeutics for developmental and epileptic encephalopathies. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1140679.
- Bezanilla, F., & Armstrong, C. M. (1972). Negative Conductance Caused by Entry of Sodium and Cesium Ions into the Potassium Channels of Squid Axons. *Journal of General Physiology*, 60(5), 588–608.
- Bishop, H. I., Guan, D., Bocksteins, E., Parajuli, L. K., Murray, K. D., Cobb, M. M., Misonou, H., Zito, K., Foehring, R. C., & Trimmer, J. S. (2015). Distinct Cell- and Layer-Specific Expression Patterns and Independent Regulation of Kv2 Channel Subtypes in Cortical Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 35(44), 14922–14942.
- Bocksteins, E. (2016). Kv5, Kv6, Kv8, and Kv9 subunits: No simple silent bystanders. *The Journal of General Physiology*, 147(2), 105–125.
- Bocksteins, E., Raes, A. L., Van de Vijver, G., Bruyns, T., Van Bogaert, P.-P., & Snyders, D. J. (2009). Kv2.1 and silent Kv subunits underlie the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured small mouse DRG neurons. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296(6), C1271–C1278.
- Bocksteins, E., & Snyders, D. J. (2012). Electrically Silent Kv Subunits: Their Molecular and Functional Characteristics. *Physiology*, 27(2), 73–84.

- Borg-Graham, L. J. (1989). Modelling The Somatic Electrical Response Of Hippocampal Pyramidal Neurons. *MIT Artificial Intelligence Laboratory, A.I. Technical Report No. 1161*.
- Börjesson, S. I., & Elinder, F. (2008). Structure, Function, and Modification of the Voltage Sensor in Voltage-Gated Ion Channels. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *52*(3), 149–174.
- Brew, H. M., Gittelman, J. X., Silverstein, R. S., Hanks, T. D., Demas, V. P., Robinson, L. C., Robbins, C. A., McKee-Johnson, J., Chiu, S. Y., Messing, A., & Tempel, B. L. (2007). Seizures and reduced life span in mice lacking the potassium channel subunit Kv1.2, but hypoexcitability and enlarged Kv1 currents in auditory neurons. *Journal of Neurophysiology*, *98*(3), 1501–1525.
- Brown, A. M. (2020). *A companion guide to the Hodgkin-Huxley papers*. The Physiological Society.
- Brunel, N., & van Rossum, M. C. W. (2007). Lapicque's 1907 paper: From frogs to integrate-and-fire. *Biological Cybernetics*, *97*(5), 337–339.
- Burger, C., & Ribera, A. (1996). Xenopus spinal neurons express Kv2 potassium channel transcripts during embryonic development. *The Journal of Neuroscience*, *16*(4), 1412–1421.
- Calhoun, J. D., Vanoye, C. G., Kok, F., George, A. L., & Kearney, J. A. (2017). Characterization of a KCNB1 variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. *Neurology: Genetics*, *3*(6).
- Capera, J., Serrano-Novillo, C., Navarro-Pérez, M., Cassinelli, S., & Felipe, A. (2019). The Potassium Channel Odyssey: Mechanisms of Traffic and Membrane Arrangement. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), Article 3.
- Capovilla, G., Wolf, P., Beccaria, F., & Avanzini, G. (2013). The history of the concept of epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, *54*(s8), 2–5.
- Carrasco, S., & Meyer, T. (2011). STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annual Review of Biochemistry*, *80*, 973–1000.
- Carrisoza-Gaytán, R., Salvador, C., Diaz-Bello, B., & Escobar, L. I. (2014). Differential expression of the Kv1 voltage-gated potassium channel family in the rat nephron. *Journal of Molecular Histology*, *45*(5), 583–597.
- Catterall, W. A., Raman, I. M., Robinson, H. P. C., Sejnowski, T. J., & Paulsen, O. (2012). The Hodgkin-Huxley Heritage: From Channels to Circuits. *The Journal of Neuroscience*, *32*(41), 14064–14073.
- Cerda, O., & Trimmer, J. S. (2010). Analysis and functional implications of phosphorylation of neuronal voltage-gated potassium channels. *Neuroscience Letters*, *486*(2), 60–67.



- Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Eugène, E., Poncer, J. C., & Lévi, S. (2013). Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(39), 15488–15503.
- Chang, C.-L., Chen, Y.-J., & Liou, J. (2017). ER-plasma membrane junctions: Why and how do we study them? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(9), 1494–1506.
- Clausen, M. J. V., & Poulsen, H. (2013). Sodium/Potassium Homeostasis in the Cell. In L. Banci (Ed.), *Metallomics and the Cell* (pp. 41–67). Springer Netherlands.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCORMACK, T., Morena, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., De Miera, E. V.-S., & Rudy, B. (1999). Molecular Diversity of K<sup>+</sup> Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1), 233–255.
- Cohen, A., Ben-Abu, Y., & Zilberberg, N. (2009). Gating the pore of potassium leak channels. *European Biophysics Journal*, 39(1), 61–73.
- Combe, C. L., Canavier, C. C., & Gasparini, S. (2018). Intrinsic Mechanisms of Frequency Selectivity in the Proximal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 38(38), 8110–8127.
- Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M. S., Peacock, W. S., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2000). Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4914–4919.
- Cressman, J. R., Ullah, G., Ziburkus, J., Schiff, S. J., & Barreto, E. (2009). The influence of sodium and potassium dynamics on excitability, seizures, and the stability of persistent states: I. Single neuron dynamics. *Journal of Computational Neuroscience*, 26(2), 159–170.
- Cross, J. H., & Guerrini, R. (2013). Chapter 64—The epileptic encephalopathies. In O. Dulac, M. Lasseonde, & H. B. Sarnat (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 111, pp. 619–626). Elsevier.
- Cserép, C., Pósfai, B., Lénárt, N., Fekete, R., László, Z. I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnár, G., Heindl, S., Schwarcz, A. D., Ujvári, K., Környei, Z., Tóth, K., Szabadits, E., Sperlág, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobágyi, T., Maglóczy, Z., ... Dénes, Á. (2020). Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science*, 367(6477), 528–537.

- Czirják, G., Tóth, Z. E., & Enyedi, P. (2007). Characterization of the Heteromeric Potassium Channel Formed by Kv2.1 and the Retinal Subunit Kv8.2 in *Xenopus Oocytes*. *Journal of Neurophysiology*, *98*(3), 1213–1222.
- D'Ambrosio, R., Gordon, D. S., & Winn, H. R. (2002). Differential Role of KIR Channel and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pump in the Regulation of Extracellular K<sup>+</sup> in Rat Hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, *87*(1), 87–102.
- D'Ambrosio, R., Maris, D. O., Grady, M. S., Winn, H. R., & Janigro, D. (1999). Impaired K<sup>+</sup> Homeostasis and Altered Electrophysiological Properties of Post-Traumatic Hippocampal Glia. *The Journal of Neuroscience*, *19*(18), 8152–8162.
- de Kovel, C. G. F., Syrbe, S., Brilstra, E. H., Verbeek, N., Kerr, B., Dubbs, H., Bayat, A., Desai, S., Naidu, S., Srivastava, S., Cagaylan, H., Yis, U., Saunders, C., Rook, M., Plugge, S., Muhle, H., Afawi, Z., Klein, K.-M., Jayaraman, V., ... Koeleman, B. P. C. (2017). Neurodevelopmental Disorders Caused by De Novo Variants in KCNB1 Genotypes and Phenotypes. *JAMA Neurology*, *74*(10).
- de Saint-Martin, A., Rudolf, G., Seegmuller, C., Valenti-Hirsch, M. P., & Hirsch, E. (2014). Epileptic encephalopathy with continuous spike-waves during sleep: The need for transition from childhood to adulthood medical care appears to be related to etiology. *Epilepsia*, *55 Suppl 3*, 21–23.
- Derera, I. D., Smith, K. Cs., & Smith, B. N. (2019). Altered A-type potassium channel function in the nucleus tractus solitarii in acquired temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurophysiology*, *121*(1), 177–187.
- Deutsch, E., Weigel, A. V., Akin, E. J., Fox, P., Hansen, G., Haberkorn, C. J., Loftus, R., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2012). Kv2.1 cell surface clusters are insertion platforms for ion channel delivery to the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(15), 2917–2929.
- Devaux, J. J., Kleopa, K. A., Cooper, E. C., & Scherer, S. S. (2004). KCNQ2 Is a Nodal K<sup>+</sup> Channel. *Journal of Neuroscience*, *24*(5), 1236–1244.
- Dickson, E. J. (2017). Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contacts Regulate Cellular Excitability. In M. Tagaya & T. Simmen (Eds.), *Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Disease* (pp. 95–109). Springer.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science*, *280*(5360), 69–77.

- Dr. Astrid Prinz (Director). (2018, January 5). *Dr. Astrid Prinz—Biophysical models of single neurons—FENS CCCN 2017*. <https://www.youtube.com/watch?v=aFqU6Zbim-Q>
- Du, J., Haak, L. L., Phillips-Tansey, E., Russell, J. T., & McBain, C. J. (2000). Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K<sup>+</sup> channel subunit Kv2.1. *The Journal of Physiology*, *522*(Pt 1), 19–31.
- Dubois, J.-M., Ouanounou, G., & Rouzair-Dubois, B. (2009). The Boltzmann equation in molecular biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *99*(2), 87–93.
- Duran-Urriago, A., & Marzen, S. (2023). Not so optimal: The evolution of mutual information in potassium voltage-gated channels. *PLOS ONE*, *18*(2), e0264424.
- Ebbinghaus, J., Legros, C., Nolting, A., Guette, C., Celerier, M.-L., Pongs, O., & Bähring, R. (2004). Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *43*(8), 923–932.
- Elkins, T., Ganetzky, B., & Wu, C. F. (1986). A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(21), 8415–8419.
- English, A. R., Zurek, N., & Voeltz, G. K. (2009). Peripheral ER Structure to Function. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(4), 596–602.
- Erecińska, M., & Silver, I. A. (1994). Ions and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, *43*(1), 37–71.
- Escobar, L. I., Martínez-Téllez, J. C., Salas, M., Castilla, S. A., Carrisoza, R., Tapia, D., Vázquez, M., Bargas, J., & Bolívar, J. J. (2004). A voltage-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *286*(4), C965-974.
- Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.-L., Nakajima, T., & Lazdunski, M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Molecular Pharmacology*, *62*(1), 48–57.
- Esmaeeli Nieh, S., & Sherr, E. H. (2014). Epileptic Encephalopathies: New Genes and New Pathways. *Neurotherapeutics*, *11*(4), 796–806.
- Feinshreiber, L., Singer-Lahat, D., Ashery, U., & Lotan, I. (2009). Voltage-gated Potassium Channel as a Facilitator of Exocytosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1152*(1), 87–92.
- Feldman, D. H., Thinschmidt, J. S., Peel, A. L., Papke, R. L., & Reier, P. J. (1996). Differentiation of ionic currents in CNS progenitor cells: Dependence upon substrate attachment and epidermal growth factor. *Experimental Neurology*, *140*(2), 206–217.

- Flowerdew, S. E., & Burgoyne, R. D. (2009). A VAMP7/Vti1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels. *Biochemical Journal*, 418(Pt 3), 529–540.
- Fortenbach, C., Peinado Allina, G., Shores, C. M., Karlen, S. J., Miller, E. B., Bishop, H., Trimmer, J. S., Burns, M. E., & Pugh, E. N. (2021). Loss of the K<sup>+</sup> channel Kv2.1 greatly reduces outward dark current and causes ionic dysregulation and degeneration in rod photoreceptors. *The Journal of General Physiology*, 153(2), e202012687.
- Forzisi, E., Yu, W., Rajwade, P., & Sesti, F. (2022). Antagonistic roles of Ras-MAPK and Akt signaling in integrin-K<sup>+</sup> channel complex-mediated cellular apoptosis. *The FASEB Journal*, 36(5), e22292.
- Fox, P. D., Haberkorn, C. J., Akin, E. J., Seel, P. J., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2015). Induction of stable ER-plasma-membrane junctions by Kv2.1 potassium channels. *Journal of Cell Science*, 128(11), 2096–2105.
- Fox, P. D., Haberkorn, C. J., Weigel, A. V., Higgins, J. L., Akin, E. J., Kennedy, M. J., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2013). Plasma membrane domains enriched in cortical endoplasmic reticulum function as membrane protein trafficking hubs. *Molecular Biology of the Cell*, 24(17), 2703–2713.
- Fox, P. D., Loftus, R. J., & Tamkun, M. M. (2013). Regulation of Kv2.1 K<sup>+</sup> Conductance by Cell Surface Channel Density. *The Journal of Neuroscience*, 33(3), 1259–1270.
- Frech, G. C., VanDongen, A. M., Schuster, G., Brown, A. M., & Joho, R. H. (1989). A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature*, 340(6235), 642–645.
- Frolov, R. V., Bagati, A., Casino, B., & Singh, S. (2012). Potassium Channels in Drosophila: Historical Breakthroughs, Significance, and Perspectives. *Journal of Neurogenetics*, 26(3–4), 275–290.
- Fu, J., Dai, X., Plummer, G., Suzuki, K., Bautista, A., Githaka, J. M., Senior, L., Jensen, M., Greitzer-Antes, D., Manning Fox, J. E., Gaisano, H. Y., Newgard, C. B., Touret, N., & MacDonald, P. E. (2017). Kv2.1 Clustering Contributes to Insulin Exocytosis and Rescues Human  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Diabetes*, 66(7), 1890–1900.
- Gabbiani, F., & Cox, S. J. (2010). CHAPTER 10—Reduced Single Neuron Models. In F. Gabbiani & S. J. Cox (Eds.), *Mathematics for Neuroscientists* (pp. 143–154). Academic Press.
- Gallo, A., Vannier, C., & Galli, T. (2016). Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Associations: Structures and Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 279–301.

- Galloni, A. R., Laffere, A., & Rancz, E. (2020). Apical length governs computational diversity of layer 5 pyramidal neurons. *ELife*, *9*, e55761.
- Gayet-Primo, J., Yaeger, D. B., Khanjian, R. A., & Puthussery, T. (2018). Heteromeric KV2/KV8.2 Channels Mediate Delayed Rectifier Potassium Currents in Primate Photoreceptors. *The Journal of Neuroscience*, *38*(14), 3414–3427.
- Gerstner, W., M. Kistler, W., Naud, R., & Paninski, L. (2014). *Neuronal Dynamics—From single neurons to networks and models of cognition*. Cambridge University Press.
- Gilles, J.-F., Dos Santos, M., Boudier, T., Bolte, S., & Heck, N. (2017). DiAna, an ImageJ tool for object-based 3D co-localization and distance analysis. *Methods*, *115*, 55–64.
- Gittelman, J. X., & Tempel, B. L. (2006). Kv1.1-containing channels are critical for temporal precision during spike initiation. *Journal of Neurophysiology*, *96*(3), 1203–1214.
- Glasscock, E., Yoo, J. W., Chen, T. T., Klassen, T. L., & Noebels, J. L. (2010). Kv1.1 potassium channel deficiency reveals brain-driven cardiac dysfunction as a candidate mechanism for sudden unexplained death in epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(15), 5167–5175.
- Goaillard, J.-M., & Marder, E. (2021). Ion Channel Degeneracy, Variability, and Covariation in Neuron and Circuit Resilience. *Annual Review of Neuroscience*, *44*, 335–357.
- Goldberg, E. M., Clark, B. D., Zaghera, E., Nahmani, M., Erisir, A., & Rudy, B. (2008). K<sup>+</sup> channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron*, *58*(3), 387–400.
- Goldberg-Stern, H., Kaufmann, R., Kivity, S., Afawi, Z., & Heron, S. E. (2009). Novel Mutation in KCNQ2 Causing Benign Familial Neonatal Seizures. *Pediatric Neurology*, *41*(5), 367–370.
- Goodwill, A. G., Noblet, J. N., Sassoon, D., Fu, L., Kassab, G. S., Schepers, L., Herring, B. P., Rottgen, T. S., Tune, J. D., & Dick, G. M. (2016). Critical contribution of KV1 channels to the regulation of coronary blood flow. *Basic Research in Cardiology*, *111*(5), 56.
- Grafe, P., & Ballanyi, K. (1987). *Cellular mechanisms of potassium homeostasis in the mammalian nervous system*. *65*(4).
- Guan, D., Armstrong, W. E., & Foehring, R. C. (2013). Kv2 channels regulate firing rate in pyramidal neurons from rat sensorimotor cortex. *The Journal of Physiology*, *591*(Pt 19), 4807–4825.
- Gubitosi-Klug, R. A., Mancuso, D. J., & Gross, R. W. (2005). The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(17), 5964–5968.

- Guerrini, R., & Pellock, J. M. (2012). Chapter 11—Age-related epileptic encephalopathies. In H. Stefan & W. H. Theodore (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 107, pp. 179–193). Elsevier.
- Guimaraes, T. A. C. D., Georgiou, M., Robson, A. G., & Michaelides, M. (2020). KCNV2 retinopathy: Clinical features, molecular genetics and directions for future therapy. *Ophthalmic Genetics*, *41*(3), 208–215.
- Gullotta, G. S., Costantino, G., Sortino, M. A., & Spampinato, S. F. (2023). Microglia and the Blood-Brain Barrier: An External Player in Acute and Chronic Neuroinflammatory Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(11), 9144.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, *57*(4), 473–508.
- Hart, N. S., Mountford, J. K., Voigt, V., Fuller-Carter, P., Barth, M., Nerbonne, J. M., Hunt, D. M., & Carvalho, L. S. (2019). The Role of the Voltage-Gated Potassium Channel Proteins Kv8.2 and Kv2.1 in Vision and Retinal Disease: Insights from the Study of Mouse Gene Knock-Out Mutations. *ENeuro*, *6*(1), ENEURO.0032-19.2019.
- Häusser, M. (2000). The Hodgkin-Huxley theory of the action potential. *Nature Neuroscience*, *3*(11), Article 11.
- Hawkins, N. A., Misra, S. N., Jurado, M., Kang, S. K., Vierra, N. C., Nguyen, K., Wren, L., George, A. L., Trimmer, J. S., & Kearney, J. A. (2021). Epilepsy and neurobehavioral abnormalities in mice with a dominant-negative KCNB1 pathogenic variant. *Neurobiology of Disease*, *147*.
- Hebb, D. O. (1950). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. (Vol. 34). John Wiley and Sons, Inc.
- Hebbar, M., & Mefford, H. C. (2020). Recent advances in epilepsy genomics and genetic testing. *F1000Research*, *9*, F1000 Faculty Rev-185.
- Helbig, I., von Deimling, M., & Marsh, E. D. (2017). Epileptic Encephalopathies as Neurodegenerative Disorders. *Advances in Neurobiology*, *15*, 295–315.
- Henne, W. M., Liou, J., & Emr, S. D. (2015). Molecular mechanisms of inter-organelle ER–PM contact sites. *Current Opinion in Cell Biology*, *35*, 123–130.
- Herrington, J., Zhou, Y.-P., Bugianesi, R. M., Dulski, P. M., Feng, Y., Warren, V. A., Smith, M. M., Kohler, M. G., Garsky, V. M., Sanchez, M., Wagner, M., Raphaelli, K., Banerjee, P., Ahaghotu, C., Wunderler, D., Priest, B. T., Mehl, J. T., Garcia, M. L., McManus, O. B., ...

- Slaughter, R. S. (2006). Blockers of the Delayed-Rectifier Potassium Current in Pancreatic  $\beta$ -Cells Enhance Glucose-Dependent Insulin Secretion. *Diabetes*, 55(4), 1034–1042.
- Herz, A. V. M., Gollisch, T., Machens, C. K., & Jaeger, D. (2006). Modeling Single-Neuron Dynamics and Computations: A Balance of Detail and Abstraction. *Science*, 314(5796), 80–85.
- Hildebrand, M. S., Dahl, H.-H. M., Damiano, J. A., Smith, R. J. H., Scheffer, I. E., & Berkovic, S. F. (2013). Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *Journal of Medical Genetics*, 50(5), 271–279.
- Hille, B. (1985). *Ionic channels of excitable membranes* (2nd edition, Vol. 16). Sunderland (Mass.): Sinauer Associates, cop. 1992.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1939). Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature*, 144(3651), Article 3651.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1945). Resting and action potentials in single nerve fibres. *The Journal of Physiology*, 104(2), 176–195.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4).
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4).
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952c). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4).
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952d). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4).
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4).
- Hodgkin, A. L., & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *The Journal of Physiology*, 108(1), 37–77.
- Hodgkin, A. L., & Keynes, R. D. (1955). The potassium permeability of a giant nerve fibre. *The Journal of Physiology*, 128(1).
- Holmgren, M., Shin, K. S., & Yellen, G. (1998). The Activation Gate of a Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Can Be Trapped in the Open State by an Intersubunit Metal Bridge. *Neuron*, 21(3), 617–621.
- Hölter, P., Kunst, S., Wolloscheck, T., Kelleher, D. K., Sticht, C., Wolfrum, U., & Spessert, R. (2012). The Retinal Clock Drives the Expression of Kcnc2, a Channel Essential for Visual

- Function and Cone Survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(11), 6947–6954.
- Hopper, A. J., Beswick-Jones, H., & Brown, A. M. (2022). A color-coded graphical guide to the Hodgkin and Huxley papers. *Advances in Physiology Education*, 46(4), 580–592.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4980), 533–538. <https://doi.org/10.1126/science.2122519>
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: Effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, 7(4), 547–556.
- Howell, K. B., Harvey, A. S., & Archer, J. S. (2016). Epileptic encephalopathy: Use and misuse of a clinically and conceptually important concept. *Epilepsia*, 57(3), 343–347.
- Hristov, K. L., Chen, M., Soder, R. P., Parajuli, S. P., Cheng, Q., Kellett, W. F., & Petkov, G. V. (2012). KV2.1 and electrically silent KV channel subunits control excitability and contractility of guinea pig detrusor smooth muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 302(2), C360-372.
- Hughes, F. M., & Cidlowski, J. A. (1999). Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Advances in Enzyme Regulation*, 39, 157–171.
- Hwang, P., Fotuhi, M., Bredt, D., Cunningham, A., & Snyder, S. (1993). Contrasting immunohistochemical localizations in rat brain of two novel K<sup>+</sup> channels of the Shab subfamily. *The Journal of Neuroscience*, 13(4), 1569–1576.
- Ipavec, V., Martire, M., Barrese, V., Taglialatela, M., & Currò, D. (2011). KV7 channels regulate muscle tone and nonadrenergic noncholinergic relaxation of the rat gastric fundus. *Pharmacological Research*, 64(4), 397–409.
- Ismailov, I. I., & Benos, D. J. (1995). Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney International*, 48(4), 1167–1179.
- Jackson, W. F. (2018). KV channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 25(1), 10.1111/micc.12421.
- Jacobson, D. A., Kuznetsov, A., Lopez, J. P., Kash, S., Ämmälä, C. E., & Philipson, L. H. (2007). Kv2.1 Ablation Alters Glucose Induced Islet Electrical Activity, Enhancing Insulin Secretion. *Cell Metabolism*, 6(3), 229–235.
- Jedrychowska, J., Gasanov, E. V., & Korzh, V. (2021). Kcnb1 plays a role in development of the inner ear. *Developmental Biology*, 471, 65–75.
- Jehi, L., Wyllie, E., & Devinsky, O. (2015). Epileptic encephalopathies: Optimizing seizure control and developmental outcome. *Epilepsia*, 56(10), 1486–1489.



- Jensen, C. S., Rasmussen, H. B., & Misonou, H. (2011). Neuronal trafficking of voltage-gated potassium channels. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *48*(4), 288–297.
- Jensen, C. S., Watanabe, S., Stas, J. I., Klaphaak, J., Yamane, A., Schmitt, N., Olesen, S.-P., Trimmer, J. S., Rasmussen, H. B., & Misonou, H. (2017). Trafficking of Kv2.1 Channels to the Axon Initial Segment by a Novel Nonconventional Secretory Pathway. *The Journal of Neuroscience*, *37*(48), 11523–11536.
- Jiang, X., Rashwan, R., Voigt, V., Nerbonne, J., Hunt, D. M., & Carvalho, L. S. (2021). Molecular, Cellular and Functional Changes in the Retinas of Young Adult Mice Lacking the Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Subunits Kv8.2 and K2.1. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4877.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*, *423*(6935), Article 6935.
- Jindal, H. K., Folco, E. J., Liu, G. X., & Koren, G. (2008). Posttranslational modification of voltage-dependent potassium channel Kv1.5: COOH-terminal palmitoylation modulates its biological properties. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *294*(5), H2012-2021.
- Johnson, B., Leek, A. N., Solé, L., Maverick, E. E., Levine, T. P., & Tamkun, M. M. (2018). Kv2 potassium channels form endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions via interaction with VAPA and VAPB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(31), E7331–E7340.
- Johnson, D. H., & Cook, R. D. (2013). A Model of Strength. *Science*, *342*(6155), 192–193.
- Johnston, G. A. (2013). Advantages of an antagonist: Bicuculline and other GABA antagonists. *British Journal of Pharmacology*, *169*(2), 328–336.
- Johnston, J., Forsythe, I. D., & Kopp-Scheinflug, C. (2010). SYMPOSIUM REVIEW: Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability: K<sup>+</sup> channels and auditory processing. *The Journal of Physiology*, *588*(17), 3187–3200.
- Johnston, J., Griffin, S. J., Baker, C., Skrzypiec, A., Chernova, T., & Forsythe, I. D. (2008). Initial segment Kv2.2 channels mediate a slow delayed rectifier and maintain high frequency action potential firing in medial nucleus of the trapezoid body neurons. *The Journal of Physiology*, *586*(Pt 14), 3493–3509.
- Jung, S.-C., Kim, J., & Hoffman, D. A. (2008). Rapid, bidirectional remodeling of synaptic NMDA receptor subunit composition by A-type K<sup>+</sup> channel activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, *60*(4), 657–671.

- Justice, J. A., Schulien, A. J., He, K., Hartnett, K. A., Aizenman, E., & Shah, N. H. (2017). Disruption of KV2.1 somato-dendritic clusters prevents the apoptogenic increase of potassium currents. *Neuroscience*, *354*, 158–167.
- Kamien, B. A., Cardamone, M., Lawson, J. A., & Sachdev, R. (2012). A genetic diagnostic approach to infantile epileptic encephalopathies. *Journal of Clinical Neuroscience*, *19*(7), 934–941.
- Kanal, L. N. (2003). Perceptron. In *Encyclopedia of Computer Science* (pp. 1383–1385). John Wiley and Sons Ltd.
- Kang, S. K., Hawkins, N. A., Echevarria-Cooper, D. M., Baker, E. M., Dixon, C. J., Speakes, N., & Kearney, J. A. (2023). Altered neurological and neurobehavioral phenotypes in a mouse model of the recurrent KCNB1 -p.R306C voltage-sensor variant. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*.
- Kang, S. K., Vanoye, C. G., Misra, S. N., Echevarria, D. M., Calhoun, J. D., O'Connor, J. B., Fabre, K. L., McKnight, D., Demmer, L., Goldenberg, P., Grote, L. E., Thiffault, I., Saunders, C., Strauss, K. A., Torkamani, A., van der Smagt, J., van Gassen, K., Carson, R. P., Diaz, J., ... Kearney, J. A. (2019). Spectrum of KV 2.1 Dysfunction in KCNB1-Associated Neurodevelopmental Disorders. *Annals of Neurology*, *86*(6).
- Kaplan, W. D., & Trout, W. E. (1969). The Behavior of Four Neurological Mutants of Drosophila. *Genetics*, *61*(2), 399–409.
- Kaya Özçora, G. D., Söbü, E., & Gümüş, U. (2023). Genetic and clinical variations of developmental epileptic encephalopathies. *Neurological Research*, *45*(3), 226–233.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239–257.
- Khan, S., & Al Baradie, R. (2012). Epileptic Encephalopathies: An Overview. *Epilepsy Research and Treatment*, *2012*, 403592.
- Kim, D. M., & Nimigean, C. M. (2016). *Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating*.
- Kim, K.-R., Lee, S. Y., Yoon, S. H., Kim, Y., Jeong, H.-J., Lee, S., Suh, Y. H., Kang, J.-S., Cho, H., Lee, S.-H., Kim, M.-H., & Ho, W.-K. (2020). Kv4.1, a Key Ion Channel For Low Frequency Firing of Dentate Granule Cells, Is Crucial for Pattern Separation. *Journal of Neuroscience*, *40*(11), 2200–2214.
- Kirmiz, M., Vierra, N. C., Palacio, S., & Trimmer, J. S. (2018). Identification of VAPA and VAPB as Kv2 Channel-Interacting Proteins Defining Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane

- Junctions in Mammalian Brain Neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(35), 7562–7584.
- Klepper, J. (2012). GLUT1 deficiency syndrome in clinical practice. *Epilepsy Research*, 100(3), 272–277.
- Knight, B. (1972). The Relationship between the Firing Rate of a Single Neuron and the Level of Activity in a Population of Neurons: Experimental Evidence for Resonant Enhancement in the Population Response. *Journal of General Physiology*.
- Kodirov, S. A., Brunner, M., Nerbonne, J. M., Buckett, P., Mitchell, G. F., & Koren, G. (2004). Attenuation of  $K_{slow1}$  and  $K_{slow2}$  in Kv1/Kv2DN mice prolongs APD and QT intervals but does not suppress spontaneous or inducible arrhythmias. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(1), H368–H374.
- Köhling, R., & Wolfart, J. (2016). Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), a022871.
- Korff, C. M., Brunklaus, A., & Zuberi, S. M. (2015). Epileptic activity is a surrogate for an underlying etiology and stopping the activity has a limited impact on developmental outcome. *Epilepsia*, 56(10), 1477–1481.
- Kuo, M. M.-C., Haynes, W. J., Loukin, S. H., Kung, C., & Saimi, Y. (2005). Prokaryotic  $K^+$  channels: From crystal structures to diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 961–985.
- Kuryshev, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A. M., & Wible, B. A. (2000). KChAP as a chaperone for specific  $K^+$  channels. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 278(5), C931–941.
- Lago, J., Rodríguez, L. P., Blanco, L., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2015). Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses. *Marine Drugs*, 13(10), 6384–6406.
- Laming, P. R. (2000). Potassium signalling in the brain: Its role in behaviour. *Neurochemistry International*, 36(4), 271–290.
- Lee, H. S., Qi, Y., & Im, W. (2015). Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*, 5, 8926.
- Leis, J. A., Bekar, L. K., & Walz, W. (2005). Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia*, 50(4), 407–416.
- Levitan, I. B. (1994). Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annual Review of Physiology*, 56, 193–212.

- Li, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5074), 1225–1230.
- Li, X. N., Herrington, J., Petrov, A., Ge, L., Eiermann, G., Xiong, Y., Jensen, M. V., Hohmeier, H. E., Newgard, C. B., Garcia, M. L., Wagner, M., Zhang, B. B., Thornberry, N. A., Howard, A. D., Kaczorowski, G. J., & Zhou, Y.-P. (2013). The role of voltage-gated potassium channels Kv2.1 and Kv2.2 in the regulation of insulin and somatostatin release from pancreatic islets. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *344*(2), 407–416.
- Li, X.-Y., & Toyoda, H. (2015). Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Research Bulletin*, *119*, 73–79.
- Li, Z., Dong, W., Zhang, X., Lu, J.-M., Mei, Y.-A., & Hu, C. (2021). Protein Kinase C Controls the Excitability of Cortical Pyramidal Neurons by Regulating Kv2.2 Channel Activity. *Neuroscience Bulletin*, *38*(2), 135–148.
- Lim, S. T., Antonucci, D. E., Scannevin, R. H., & Trimmer, J. S. (2000). A Novel Targeting Signal for Proximal Clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel in Hippocampal Neurons. *Neuron*, *25*(2), 385–397.
- Liu, F., Zhang, Y., Liang, Z., Sun, Q., Liu, H., Zhao, J., Xu, J., Zheng, J., Yun, Y., Yu, X., Song, W., & Sun, X. (2018). Cleavage of potassium channel Kv2.1 by BACE2 reduces neuronal apoptosis. *Molecular Psychiatry*, *23*(7), Article 7.
- Liu, J., Li, F., Wang, Y., Pan, L., Lin, P., Zhang, B., Zheng, Y., Xu, Y., Liao, H., Ko, G., Fei, F., Xu, C., Du, Y., Shin, K., Kim, D., Jang, S.-S., Chung, H. J., Tian, H., Wang, Q., ... Ling, D. (2020). A sensitive and specific nanosensor for monitoring extracellular potassium levels in the brain. *Nature Nanotechnology*, *15*(4), Article 4.
- Liu, P. W., & Bean, B. P. (2014). Kv2 Channel Regulation of Action Potential Repolarization and Firing Patterns in Superior Cervical Ganglion Neurons and Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *34*(14), 4991–5002.
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, *450*(7168), Article 7168.
- Lu, Y., Hanna, S. T., Tang, G., & Wang, R. (2002). Contributions of Kv1.2, Kv1.5 and Kv2.1 subunits to the native delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Life Sciences*, *71*(12), 1465–1473.
- Lu, Z., Klem, A. M., & Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*, *413*(6858), Article 6858.

- MacDonald, P. E., Ha, X. F., Wang, J., Smukler, S. R., Sun, A. M., Gaisano, H. Y., Salapatek, A. M. F., Backx, P. H., & Wheeler, M. B. (2001). Members of the Kv1 and Kv2 Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel Families Regulate Insulin Secretion. *Molecular Endocrinology*, *15*(8), 1423–1435.
- MacDonald, P. E., Sewing, S., Wang, J., Joseph, J. W., Smukler, S. R., Sakellaropoulos, G., Wang, J., Saleh, M. C., Chan, C. B., Tsushima, R. G., Salapatek, A. M. F., & Wheeler, M. B. (2002). Inhibition of Kv2.1 Voltage-dependent K<sup>+</sup> Channels in Pancreatic  $\beta$ -Cells Enhances Glucose-dependent Insulin Secretion\*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 44938–44945.
- MacDonald, P. E., Wang, G., Tsuk, S., Dodo, C., Kang, Y., Tang, L., Wheeler, M. B., Cattral, M. S., Lakey, J. R. T., Salapatek, A. M. F., Lotan, I., & Gaisano, H. Y. (2002). Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons modulates Kv2.1 voltage-dependent K<sup>(+)</sup> channels in neuroendocrine islet beta-cells through an interaction with the channel N terminus. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *16*(11), 2452–2461.
- MacDonald, P. E., & Wheeler, M. B. (2003). Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia*, *46*(8), 1046–1062.
- MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., & Chait, B. T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5360), 106–109.
- Magee, J. C. (2016). Dendritic voltage-gated ion channels. In G. Stuart, N. Spruston, & M. Häusser (Eds.), *Dendrites* (p. 0). Oxford University Press.
- Maletic-Savatic, M., Lenn, N. J., & Trimmer, J. S. (1995). Differential spatiotemporal expression of K<sup>+</sup> channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(5 Pt 2), 3840–3851.
- Maljevic, S., Reid, C. A., & Petrou, S. (2017). Models for discovery of targeted therapy in genetic epileptic encephalopathies. *Journal of Neurochemistry*, *143*(1), 30–48.
- Mandikian, D., Bocksteins, E., Parajuli, L. K., Bishop, H. I., Cerda, O., Shigemoto, R., & Trimmer, J. S. (2014). Cell Type Specific Spatial and Functional Coupling Between Mammalian Brain Kv2.1 K<sup>+</sup> Channels and Ryanodine Receptors. *The Journal of Comparative Neurology*, *522*(15), 3555–3574.
- Marini, C., Romoli, M., Parrini, E., Costa, C., Mei, D., Mari, F., Parmeggiani, L., Procopio, E., Metitieri, T., Cellini, E., Virdò, S., De Vita, D., Gentile, M., Prontera, P., Calabresi, P., &

- Guerrini, R. (2017). Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo KCNB1 gene mutations. *Neurology. Genetics*, 3(6).
- Martens, J. R., Kwak, Y.-G., & Tamkun, M. M. (1999). Modulation of Kv Channel  $\alpha/\beta$  Subunit Interactions. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(8), 253–258.
- Maverick, E. E., Leek, A. N., & Tamkun, M. M. (2021). Kv2 channel–AMIGO  $\beta$ -subunit assembly modulates both channel function and cell adhesion molecule surface trafficking. *Journal of Cell Science*, 134(12), jcs256339.
- Maverick, E. E., & Tamkun, M. M. (2022). High spatial density is associated with non-conducting Kv channels from two families. *Biophysical Journal*, 121(5), 755–768.
- McCord, M. C., & Aizenman, E. (2013). Convergent  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  signaling regulates apoptotic Kv2.1 K<sup>+</sup> currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13988–13993.
- McCrossan, Z. A., & Abbott, G. W. (2004). The MinK-related peptides. *Neuropharmacology*, 47(6), 787–821.
- McCulloch, W. S., & Pitts, W. (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5(4), 115–133.
- McLaughlin, B., Pal, S., Tran, M. P., Parsons, A. A., Barone, F. C., Erhardt, J. A., & Aizenman, E. (2001). P38 activation is required upstream of potassium current enhancement and caspase cleavage in thiol oxidant-induced neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(10), 3303–3311.
- McManus, O. B. (1991). Calcium-activated potassium channels: Regulation by calcium. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 23(4), 537–560.
- McTague, A., Howell, K. B., Cross, J. H., Kurian, M. A., & Scheffer, I. E. (2016). The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *The Lancet. Neurology*, 15(3), 304–316.
- Mefford, H. C., Yendle, S. C., Hsu, C., Cook, J., Geraghty, E., McMahon, J. M., Eeg-Olofsson, O., Sadleir, L. G., Gill, D., Ben-Zeev, B., Lerman-Sagie, T., Mackay, M., Freeman, J. L., Andermann, E., Pelakanos, J. T., Andrews, I., Wallace, G., Eichler, E. E., Berkovic, S. F., & Scheffer, I. E. (2011). Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Annals of Neurology*, 70(6), 974–985.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 102(3), 527–540.

- Michaevlevski, I., Chikvashvili, D., Tsuk, S., Singer-Lahat, D., Kang, Y., Linial, M., Gaisano, H. Y., Fili, O., & Lotan, I. (2003). Direct interaction of target SNAREs with the Kv2.1 channel. Modal regulation of channel activation and inactivation gating. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 34320–34330.
- Miller, C. (1995). The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides. *Neuron*, *15*(1), 5–10.
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, *1*(4), reviews0004.1-reviews0004.5.
- Minardi, R., Licchetta, L., Baroni, M. C., Pippucci, T., Stipa, C., Mostacci, B., Severi, G., Toni, F., Bergonzini, L., Carelli, V., Seri, M., Tinuper, P., & Bisulli, F. (2020). Whole-exome sequencing in adult patients with developmental and epileptic encephalopathy: It is never too late. *Clinical Genetics*, *98*(5), 477–485.
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., Menegola, M., & Trimmer, J. S. (2005). Calcium- and Metabolic State-Dependent Modulation of the Voltage-Dependent Kv2.1 Channel Regulates Neuronal Excitability in Response to Ischemia. *The Journal of Neuroscience*, *25*(48), 11184–11193.
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., Park, E. W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., Anderson, A. E., & Trimmer, J. S. (2004). Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nature Neuroscience*, *7*(7), Article 7.
- Misonou, H., Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2005). Kv2.1 channel phosphorylation regulates its localization and function. *Journal of Neuroscience*, *25*(48), 11184–11193.
- Mohapatra, D. P., Misonou, H., Pan, S.-J., Held, J. E., Surmeier, D. J., & Trimmer, J. S. (2009). Regulation of intrinsic excitability in hippocampal neurons by activity-dependent modulation of the Kv2.1 potassium channel. *Channels*, *3*(1), 46–56.
- Mohapatra, D. P., Misonou, H., & Trimmer, J. S. (2005). Kv2.1 channel phosphorylation regulates its localization and function. *Channels*, *3*(1), 46–56.
- Mohapatra, D. P., Park, K.-S., & Trimmer, J. S. (2007). Dynamic regulation of the voltage-gated Kv2.1 potassium channel by multisite phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, *35*(5), 1064–1068.
- Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2006). The Kv2.1 C Terminus Can Autonomously Transfer Kv2.1-Like Phosphorylation-Dependent Localization, Voltage-Dependent Gating, and Muscarinic Modulation to Diverse Kv Channels. *Journal of Neuroscience*, *26*(2), 685–695.
- Mohapatra, D. P., Vacher, H., & Trimmer, J. S. (2007). The surprising catch of a voltage-gated potassium channel in a neuronal SNARE. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, *2007*(393), pe37. <https://doi.org/10.1126/stke.3932007pe37>

- Moldenhauer, H., Díaz-Franulic, I., Poblete, H., & Naranjo, D. (2019). Trans-toxin ion-sensitivity of charybdotoxin-blocked potassium-channels reveals unbinding transitional states. *ELife*, 8, e46170.
- Monaghan, M. M., Trimmer, J. S., & Rhodes, K. J. (2001). Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), 5973–5983.
- Moran, Y., Barzilai, M. G., Liebeskind, B. J., & Zakon, H. H. (2015). Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 515–525.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), Article 1.
- Müller, S., Guli, X., Hey, J., Einsle, A., Pfanz, D., Sudmann, V., Kirschstein, T., & Köhling, R. (2018). Acute epileptiform activity induced by gabazine involves proteasomal rather than lysosomal degradation of KCa2.2 channels. *Neurobiology of Disease*, 112, 79–84.
- Murakoshi, H., Shi, G., Scannevin, R. H., & Trimmer, J. S. (1997). Phosphorylation of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel Alters Voltage-Dependent Activation. *Molecular Pharmacology*, 52(5), 821–828.
- Murakoshi, H., & Trimmer, J. S. (1999). Identification of the Kv2.1 K<sup>+</sup> Channel as a Major Component of the Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Rat Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19(5), 1728–1735.
- Musante, L., Costa, P., Zanus, C., Faletra, F., Murru, F. M., Bianco, A. M., La Bianca, M., Ragusa, G., Athanasakis, E., d'Adamo, A. P., Carrozzi, M., & Gasparini, P. (2022). The Genetic Diagnosis of Ultrarare DEEs: An Ongoing Challenge. *Genes*, 13(3), 500.
- Myers, C. T., & Mefford, H. C. (2016). Chapter 2 - Genetic investigations of the epileptic encephalopathies: Recent advances. In E. Rossignol, L. Carmant, & J.-C. Lacaillle (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 226, pp. 35–60). Elsevier.
- Nabbout, R., & Dulac, O. (2003). Epileptic encephalopathies: A brief overview. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 20(6), 393–397.
- Natale, A. M., Deal, P. E., & Minor, D. L. (2021). Structural Insights into the Mechanisms and Pharmacology of K2P Potassium Channels. *Journal of Molecular Biology*, 433(17), 166995.



- Nei, M., Ngo, L., Sirven, J. I., & Sperling, M. R. (2014). Ketogenic diet in adolescents and adults with epilepsy. *Seizure*, 23(6), 439–442.
- Newkirk, G. S., Guan, D., Dembrow, N., Armstrong, W. E., Foehring, R. C., & Spain, W. J. (2021). Kv2.1 Potassium Channels Regulate Repetitive Burst Firing in Extratelencephalic Neocortical Pyramidal Neurons. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 32(5), 1055–1076.
- Nguyen, N. H., & Brodsky, J. L. (2023). The cellular pathways that maintain the quality control and transport of diverse potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1866(1), 194908.
- Nieves, D. J., Pike, J. A., Levet, F., Williamson, D. J., Baragilly, M., Oloketuyi, S., de Marco, A., Griffié, J., Sage, D., Cohen, E. A. K., Sibarita, J.-B., Heilemann, M., & Owen, D. M. (2023). A framework for evaluating the performance of SMLM cluster analysis algorithms. *Nature Methods*, 20(2), Article 2.
- Nimigeau, C. M. (2022). 35 years of channelling potassium ions. *Nature*, 608(7924), 670–672.
- Noskov, S. Y., Bernèche, S., & Roux, B. (2004). Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature*, 431(7010), Article 7010.
- Nowotny, T., van Albada, S. J., Fellous, J.-M., Haas, J. S., Jolivet, R. B., Metzner, C., & Sharpee, T. (2022). Editorial: Advances in Computational Neuroscience. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 15.
- O'Connell, K. M. S., Loftus, R., & Tamkun, M. M. (2010). Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12351–12356.
- O'Connell, K. M. S., Whitesell, J. D., & Tamkun, M. M. (2008). Localization and mobility of the delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel Kv2.1 in adult cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(1), H229–H237.
- O'Dwyer, S. C., Palacio, S., Matsumoto, C., Guarina, L., Klug, N. R., Tajada, S., Rosati, B., McKinnon, D., Trimmer, J. S., & Santana, L. F. (2020). Kv2.1 channels play opposing roles in regulating membrane potential, Ca<sup>2+</sup> channel function, and myogenic tone in arterial smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3858–3866.
- Ohanyan, V., Yin, L., Bardakjian, R., Kolz, C., Enrick, M., Hakobyan, T., Kmetz, J., Bratz, I., Luli, J., Nagane, M., Khan, N., Hou, H., Kuppusamy, P., Graham, J., Fu, F. K., Janota, D., Oyewumi, M. O., Logan, S., Lindner, J. R., & Chilian, W. M. (2015). Requisite Role of Kv1.5 Channels in Coronary Metabolic Dilation. *Circulation Research*, 117(7), 612–621.

- Ohanyan, V., Yin, L., Bardakjian, R., Kolz, C., Enrick, M., Hakobyan, T., Luli, J., Graham, K., Khayata, M., Logan, S., Kmetz, J., & Chilian, W. M. (2017). Kv1.3 Channels Facilitate the Connection Between Metabolism and Blood Flow in the Heart. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 24(4), 10.1111/micc.12334.
- Oliveras, A., Roura-Ferrer, M., Solé, L., de la Cruz, A., Prieto, A., Etxebarria, A., Manils, J., Morales-Cano, D., Condom, E., Soler, C., Cogolludo, A., Valenzuela, C., Villarroel, A., Comes, N., & Felipe, A. (2014). Functional Assembly of Kv7.1/Kv7.5 Channels With Emerging Properties on Vascular Muscle Physiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), 1522–1530.
- Ördög, B., Brutyó, E., Puskás, L. G., Papp, J. G., Varró, A., Szabad, J., & Boldogkői, Z. (2006). Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *International Journal of Cardiology*, 111(3), 386–393.
- Orhan, G., Bock, M., Schepers, D., Ilina, E. I., Reichel, S. N., Löffler, H., Jezutkovic, N., Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Danker, T., Guenther, E., Scheffer, I. E., De Jonghe, P., Lerche, H., & Maljevic, S. (2014). Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 75(3), 382–394.
- Pageon, S. V., Nicovich, P. R., Mollazade, M., Tabarin, T., & Gaus, K. (2016). Clus-DoC: A combined cluster detection and colocalization analysis for single-molecule localization microscopy data. *Molecular Biology of the Cell*, 27(22), 3627–3636.
- Pal, S., Hartnett, K. A., Nerbonne, J. M., Levitan, E. S., & Aizenman, E. (2003). Mediation of Neuronal Apoptosis by Kv2.1-Encoded Potassium Channels. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 4798–4802.
- Pal, S. K., Takimoto, K., Aizenman, E., & Levitan, E. S. (2006). Apoptotic surface delivery of K<sup>+</sup> channels. *Cell Death and Differentiation*, 13(4), 661.
- Papazian, D. M. (1999). Potassium channels: Some assembly required. *Neuron*, 23(1), 7–10.
- Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4816), 749–753.
- Parent, J. M., & Anderson, S. A. (2015). REPROGRAMMING PATIENT-DERIVED CELLS TO STUDY THE EPILEPSIES. *Nature Neuroscience*, 18(3), 360–366.
- Park, K.-S., Mohapatra, D. P., Misonou, H., & Trimmer, J. S. (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5789), 976–979.

- Patel, A. J., Lazdunski, M., & Honoré, E. (1997). Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *The EMBO Journal*, *16*(22), 6615–6625.
- Paupiah, A.-L., Marques, X., Merlaud, Z., Russeau, M., Levi, S., & Renner, M. (2023). Introducing Diinamic, a flexible and robust method for clustering analysis in single-molecule localisation microscopy. *Biological Imaging*, 1–31.
- Peltola, M. A., Kuja-Panula, J., Lauri, S. E., Taira, T., & Rauvala, H. (2011). AMIGO is an auxiliary subunit of the Kv2.1 potassium channel. *EMBO Reports*, *12*(12), 1293–1299.
- Perozo, E., & Bezanilla, F. (1990). Phosphorylation affects voltage gating of the delayed rectifier K<sup>+</sup> channel by electrostatic interactions. *Neuron*, *5*(5), 685–690.
- Piper, D. R., Mujtaba, T., Rao, M. S., & Lucero, M. T. (2000). Immunocytochemical and Physiological Characterization of a Population of Cultured Human Neural Precursors. *Journal of Neurophysiology*, *84*(1), 534–548.
- Pivovarov, A. S., Calahorra, F., & Walker, R. J. (2019). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebrate Neuroscience*, *19*(1), 1.
- Poirazi, P., Brannon, T., & Mel, B. W. (2003). Pyramidal Neuron as Two-Layer Neural Network. *Neuron*, *37*(6), 989–999.
- Poirazi, P., & Pissadaki, E.-K. (2010). The Making of a Detailed CA1 Pyramidal Neuron Model. In V. Cutsuridis, B. Graham, S. Cobb, & I. Vida (Eds.), *Hippocampal Microcircuits: A Computational Modeler's Resource Book* (pp. 317–352). Springer.
- Pongs, O. (1997). Voltage-gated potassium channels. In A. G. Lee (Ed.), *Biomembranes: A Multi-Volume Treatise* (Vol. 6, pp. 199–220). JAI.
- Prince, D. A., Lux, H. D., & Neher, E. (1973). Measurement of extracellular potassium activity in cat cortex. *Brain Research*, *50*(2), 489–495.
- Prinz, A. A., Billimoria, C. P., & Marder, E. (2003). Alternative to hand-tuning conductance-based models: Construction and analysis of databases of model neurons. *Journal of Neurophysiology*, *90*(6), 3998–4015.
- Proskurina, E. Yu., & Zaitsev, A. V. (2022). Regulation of Potassium and Chloride Concentrations in Nervous Tissue as a Method of Anticonvulsant Therapy. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, *58*(5), 1275–1292.
- Ptáček, L. J. (1997). Channelopathies: Ion channel disorders of muscle as a paradigm for paroxysmal disorders of the nervous system. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *7*(4), 250–255.

- Púa-Torrejón, R. C., González-Alguacil, E., Soto-Insuga, V., Moreno-Cantero, T., Ortiz-Cabrera, N. V., Pérez-Poyato, M. S., Ruiz Falcó-Rojas, M. L., & García-Peñas, J. J. (2021). [Variability of the clinical expression of KCNB1 encephalopathy]. *Revista De Neurologia*, *73*(12), 403–408.
- Raghavan, M., Fee, D., & Barkhaus, P. E. (2019). Generation and propagation of the action potential. *Handbook of Clinical Neurology*, *160*, 3–22.
- Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., Buchillier, V., & Markram, H. (2019). A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 358.
- Ransom, C. B., Ransom, B. R., & Sontheimer, H. (2000). Activity-dependent extracellular K<sup>+</sup> accumulation in rat optic nerve: The role of glial and axonal Na<sup>+</sup> pumps. *The Journal of Physiology*, *522*(3), 427–442.
- Raus Balind, S., Magó, Á., Ahmadi, M., Kis, N., Varga-Németh, Z., Lőrincz, A., & Makara, J. K. (2019). Diverse synaptic and dendritic mechanisms of complex spike burst generation in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Nature Communications*, *10*, 1859.
- Redman, P. T., He, K., Hartnett, K. A., Jefferson, B. S., Hu, L., Rosenberg, P. A., Levitan, E. S., & Aizenman, E. (2007). Apoptotic surge of potassium currents is mediated by p38 phosphorylation of Kv2.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(9), 3568–3573.
- Renner, M., Wang, L., Levi, S., Hennekinne, L., & Antoine, T. (2017). A Simple and Powerful Analysis of Lateral Subdiffusion Using Single Particle Tracking. *Biophysical Journal*, *113*, 2452–2463.
- Robbins, C. A., & Tempel, B. L. (2012). Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models. *Epilepsia*, *53 Suppl 1*, 134–141.
- Roe, M. Wm., Worley, J. F., Mittal, A. A., Kuznetsov, A., DasGupta, S., Mertz, R. J., Witherspoon, S. M., Blair, N., Lancaster, M. E., McIntyre, M. S., Shehee, W. R., Dukes, I. D., & Philipson, L. H. (1996). Expression and Function of Pancreatic  $\beta$ -Cell Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Channels: ROLE IN STIMULUS-SECRETION COUPLING\*. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(50), 32241–32246.
- Rogawski, M. A. (1985). The A-current: How ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends in Neurosciences*, *8*, 214–219.
- Rosenbluth, J. (1962). SUBSURFACE CISTERNS AND THEIR RELATIONSHIP TO THE NEURONAL PLASMA MEMBRANE. *The Journal of Cell Biology*, *13*(3), 405–421.

- Roux, B., & MacKinnon, R. (1999). The Cavity and Pore Helices in the KcsA K<sup>+</sup> Channel: Electrostatic Stabilization of Monovalent Cations. *Science*, 285(5424), 100–102.
- Ruan, Y., Chen, L., She, D., Chung, Y., Ge, L., & Han, L. (2022). Ketogenic diet for epilepsy: An overview of systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 76(9), 1234–1244.
- Ruta, V., Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., & MacKinnon, R. (2003). Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*, 422(6928), Article 6928.
- Sah, P., & Davies, P. (2000). Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 27(9), 657–663.
- Saitou, H., Akita, T., Tohyama, J., Goldberg-Stern, H., Kobayashi, Y., Cohen, R., Kato, M., Ohba, C., Miyatake, S., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Miyake, N., Fukuda, A., & Matsumoto, N. (2015). De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Scientific Reports*, 5(1).
- Sansom, M. S. P., Shrivastava, I. H., Bright, J. N., Tate, J., Capener, C. E., & Biggin, P. C. (2002). Potassium channels: Structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1565(2), 294–307.
- Sarmiere, P. D., Weigle, C. M., & Tamkun, M. M. (2008). The Kv2.1 K<sup>+</sup> channel targets to the axon initial segment of hippocampal and cortical neurons in culture and in situ. *BMC Neuroscience*, 9, 112.
- Scannevin, R. H., Murakoshi, H., Rhodes, K. J., & Trimmer, J. S. (1996). Identification of a cytoplasmic domain important in the polarized expression and clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel. *Journal of Cell Biology*, 135(6), 1619–1632.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.-H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE Classification of the Epilepsies Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521.
- Scheffer, I. E., & Liao, J. (2020). Deciphering the concepts behind “Epileptic encephalopathy” and “Developmental and epileptic encephalopathy”. *European Journal of Paediatric Neurology*, 24, 11–14.
- Schulien, A. J., Yeh, C.-Y., Orange, B. N., Pav, O. J., Hopkins, M. P., Moutal, A., Khanna, R., Sun, D., Justice, J. A., & Aizenman, E. (2020). Targeted disruption of Kv2.1-VAPA association provides neuroprotection against ischemic stroke in mice by declustering Kv2.1 channels. *Science Advances*, 6(27).

- Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T., & Jentsch, T. J. (2000). Surface Expression and Single Channel Properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K<sup>+</sup> Channels Involved in Epilepsy\*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13343–13348.
- Scott, V. E. S., Muniz, Z. M., Sewing, S., Lichtinghagen, R., Parcej, D. N., Pongs, O., & Dolly, J. O. (1994). Antibodies specific for distinct Kv subunits unveil a heterooligomeric basis for subtypes of .alpha.-dendrotoxin-sensitive potassium channels in bovine brain. *Biochemistry*, 33(7), 1617–1623.
- Seoh, S.-A., Sigg, D., Papazian, D. M., & Bezanilla, F. (1996). Voltage-Sensing Residues in the S2 and S4 Segments of the Shaker K<sup>+</sup> Channel. *Neuron*, 16(6), 1159–1167.
- Sepela, R. J., Stewart, R. G., Valencia, L. A., Thapa, P., Wang, Z., Cohen, B. E., & Sack, J. T. (2022). The AMIGO1 adhesion protein activates Kv2.1 voltage sensors. *Biophysical Journal*, 121(8), 1395–1416.
- Sharma, K., Wu, L.-J., & Eyo, U. B. (2020). Calming Neurons with a Microglial Touch. *Trends in Neurosciences*, 43(4), 197–199.
- Sharma, T., Dreyer, I., & Riedelsberger, J. (2013). The role of K<sup>(+)</sup> channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 4, 224.
- Shbarou, R., & Mikati, M. A. (2016). The Expanding Clinical Spectrum of Genetic Pediatric Epileptic Encephalopathies. *Seminars in Pediatric Neurology*, 23(2), 134–142.
- Shen, N. V., & Pfaffinger, P. J. (1995). Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. *Neuron*, 14(3), 625–633.
- Sheng, M., Liao, Y. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1993). Presynaptic A-current based on heteromultimeric K<sup>+</sup> channels detected in vivo. *Nature*, 365(6441), Article 6441.
- Shi, G., Kleinklaus, A. K., Marrion, N. V., & Trimmer, J. S. (1994). Properties of Kv2.1 K<sup>+</sup> channels expressed in transfected mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(37), 23204–23211.
- Shi, G., & Trimmer, J. S. (1999). Differential asparagine-linked glycosylation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in mammalian brain and in transfected cells. *The Journal of Membrane Biology*, 168(3), 265–273.
- Singer-Lahat, D., Chikvashvili, D., & Lotan, I. (2008). Direct Interaction of Endogenous Kv Channels with Syntaxin Enhances Exocytosis by Neuroendocrine Cells. *PLoS ONE*, 3(1), e1381.

- Singer-Lahat, D., Sheinin, A., Chikvashvili, D., Tsuk, S., Greitzer, D., Friedrich, R., Feinshreiber, L., Ashery, U., Benveniste, M., Levitan, E. S., & Lotan, I. (2007). K<sup>+</sup> Channel Facilitation of Exocytosis by Dynamic Interaction with Syntaxin. *The Journal of Neuroscience*, *27*(7), 1651–1658.
- Siniatchkin, M., & Capovilla, G. (2013). Functional neuroimaging in epileptic encephalopathies. *Epilepsia*, *54*(s8), 27–33.
- Smart, S. L., Lopantsev, V., Zhang, C. L., Robbins, C. A., Wang, H., Chiu, S. Y., Schwartzkroin, P. A., Messing, A., & Tempel, B. L. (1998). Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron*, *20*(4), 809–819.
- Smith, D. O., Rosenheimer, J. L., & Kalil, R. E. (2008). Delayed Rectifier and A-Type Potassium Channels Associated with Kv 2.1 and Kv 4.3 Expression in Embryonic Rat Neural Progenitor Cells. *PLOS ONE*, *3*(2), e1604.
- Smith, K. E., Wilkie, S. E., Tebbs-Warner, J. T., Jarvis, B. J., Gallasch, L., Stocker, M., & Hunt, D. M. (2012). Functional Analysis of Missense Mutations in Kv8.2 Causing Cone Dystrophy with Supernormal Rod Electroretinogram\*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(52), 43972–43983.
- Smith, L. S. (2006). Implementing Neural Models in Silicon. In A. Y. Zomaya (Ed.), *Handbook of Nature-Inspired and Innovative Computing* (pp. 433–475). Kluwer Academic Publishers.
- Soden, S. E., Saunders, C. J., Willig, L. K., Farrow, E. G., Smith, L. D., Petrikin, J. E., LePichon, J.-B., Miller, N. A., Thiffault, I., Dinwiddie, D. L., Twist, G., Noll, A., Heese, B. A., Zellmer, L., Atherton, A. M., Abdelmoity, A. T., Safina, N., Nyp, S. S., Zuccarelli, B., ... Kingsmore, S. F. (2014). Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Science Translational Medicine*, *6*(265).
- Song, W.-J., Tkatch, T., Baranauskas, G., Ichinohe, N., Kitai, S. T., & Surmeier, D. J. (1998). Somatodendritic Depolarization-Activated Potassium Currents in Rat Neostriatal Cholinergic Interneurons Are Predominantly of the A Type and Attributable to Coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 Subunits. *The Journal of Neuroscience*, *18*(9), 3124–3137.
- Specia, D. J., Ogata, G., Mandikian, D., Bishop, H. I., Wiler, S. W., Eum, K., Wenzel, H. J., Doisy, E. T., Matt, L., Campi, K. L., Golub, M. S., Nerbonne, J. M., Hell, J. W., Trainor, B. C., Sack, J. T., Schwartzkroin, P. A., & Trimmer, J. S. (2014). Deletion of the Kv2.1 delayed rectifier potassium channel leads to neuronal and behavioral hyperexcitability. *Genes, Brain, and Behavior*, *13*(4), 394–408.
- Specchio, N., & Curatolo, P. (2021). Developmental and epileptic encephalopathies: What we do and do not know. *Brain*, *144*(1), 32–43.

- Specht, C. G., Izeddin, I., Rodriguez, P. C., El Beheiry, M., Rostaing, P., Darzacq, X., Dahan, M., & Triller, A. (2013). Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: Counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron*, *79*(2), 308–321.
- Stafstrom, C. E. (2007). Neurobiological mechanisms of developmental epilepsy: Translating experimental findings into clinical application. *Seminars in Pediatric Neurology*, *14*(4), 164–172.
- Stafstrom, C. E., & Kossoff, E. H. (2016). Epileptic Encephalopathy in Infants and Children. *Epilepsy Currents*, *16*(4), 273–279.
- Striano, P., de Jonghe, P., & Zara, F. (2013). Genetic epileptic encephalopathies: Is all written into the DNA? *Epilepsia*, *54*(s8), 22–26.
- Sun, E. W., & De Camilli, P. (2018). Kv2 potassium channels meet VAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(31), 7849–7851.
- Sun, Q., Liu, F., Zhao, J., Wang, P., & Sun, X. (2022). Cleavage of Kv2.1 by BACE1 decreases potassium current and reduces neuronal apoptosis. *Neurochemistry International*, *155*, 105310.
- Surmeier, D. J., & Foehring, R. (2004). A mechanism for homeostatic plasticity. *Nature Neuroscience*, *7*(7), Article 7.
- Sutachan, J. J., Watanabe, I., Zhu, J., Gottschalk, A., Recio-Pinto, E., & Thornhill, W. B. (2005). Effects of Kv1.1 channel glycosylation on C-type inactivation and simulated action potentials. *Brain Research*, *1058*(1), 30–43.
- Suzuki, E., Nishimatsu, H., Satonaka, H., Walsh, K., Goto, A., Omata, M., Fujita, T., Nagai, R., & Hirata, Y. (2002). Angiotensin II Induces Myocyte Enhancer Factor 2- and Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T Cell-Dependent Transcriptional Activation in Vascular Myocytes. *Circulation Research*, *90*(9), 1004–1011.
- Swanson, R., Marshall, J., Smith, J. S., Williams, J. B., Boyle, M. B., Folander, K., Luneau, C. J., Antanavage, J., Oliva, C., Buhrow, S. A., Bennet, C., Stein, R. B., & Kaczmarek, L. K. (1990). Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron*, *4*(6), 929–939.
- Swartz, K. J. (2007). Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *49*(2), 213–230.
- Swartz, K. J., & MacKinnon, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, *15*(4), 941–949.
- Tamarina, N. A., Kuznetsov, A., Fridlyand, L. E., & Philipson, L. H. (2005). Delayed-rectifier (KV2.1) regulation of pancreatic  $\beta$ -cell calcium responses to glucose: Inhibitor specificity



- and modeling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(4), E578–E585.
- Thiffault, I., Speca, D. J., Austin, D. C., Cobb, M. M., Eum, K. S., Safina, N. P., Grote, L., Farrow, E. G., Miller, N., Soden, S., Kingsmore, S. F., Trimmer, J. S., Saunders, C. J., & Sack, J. T. (2015). A novel epileptic encephalopathy mutation in KCNB1 disrupts Kv2.1 ion selectivity, expression, and localization. *The Journal of General Physiology*, 146(5).
- Thomas, M. J., Watabe, A. M., Moody, T. D., Makhinson, M., & O'Dell, T. J. (1998). Postsynaptic Complex Spike Bursting Enables the Induction of LTP by Theta Frequency Synaptic Stimulation. *Journal of Neuroscience*, 18(18), 7118–7126.
- Thorneloe, K. S., & Nelson, M. T. (2003). Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K<sup>+</sup> current. *The Journal of Physiology*, 549(Pt 1), 65–74.
- Tilley, D. C., Angueyra, J. M., Eum, K. S., Kim, H., Chao, L. H., Peng, A. W., & Sack, J. T. (2019). The tarantula toxin GxTx detains K<sup>+</sup> channel gating charges in their resting conformation. *The Journal of General Physiology*, 151(3), 292–315.
- Torkamani, A., Bersell, K., Jorge, B. S., Bjork, R. L., Friedman, J. R., Bloss, C. S., Cohen, J., Gupta, S., Naidu, S., Vanoye, C. G., George, A. L., & Kearney, J. A. (2014). De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 76(4).
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496.
- Trimmer, J. S. (1991). Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel polypeptide in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10764–10768.
- Trimmer, J. S. (1993). Expression of Kv2.1 delayed rectifier K<sup>+</sup> channel isoforms in the developing rat brain. *FEBS Letters*, 324(2), 205–210.
- Tritsch, D., Chesnoy-Marchais, D., & Feltz, A. (1999). *Physiologie du neurone*. Doin éditeurs.
- Trivisano, M., & Specchio, N. (2020). What are the epileptic encephalopathies? *Current Opinion in Neurology*, 33(2), 179.
- Uctepe, E., Esen, F. N., Tümer, S., Mancılar, H., & Yeşilyurt, A. (2022). KCNB1 frameshift variant caused inherited intellectual disability, developmental delay, and seizure. *Intractable & Rare Diseases Research*, 11(4).
- Vacher, H., & Trimmer, J. S. (2011). Diverse Roles for Auxiliary Subunits in Phosphorylation-Dependent Regulation of Mammalian Brain Voltage-Gated Potassium Channels. *Pflugers Archiv*, 462(5), 631–643.

- Van Der Malsburg, C. (1986). Frank Rosenblatt: Principles of Neurodynamics: Perceptrons and the Theory of Brain Mechanisms. In G. Palm & A. Aertsen (Eds.), *Brain Theory* (pp. 245–248). Springer.
- Van Geit, W., Gevaert, M., Chindemi, G., Rössert, C., Courcol, J.-D., Muller, E. B., Schürmann, F., Segev, I., & Markram, H. (2016). BluePyOpt: Leveraging Open Source Software and Cloud Infrastructure to Optimise Model Parameters in Neuroscience. *Frontiers in Neuroinformatics*, *10*.
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S., & Nerbonne, J. M. (1997). Outward K<sup>+</sup> Current Densities and Kv1.5 Expression Are Reduced in Chronic Human Atrial Fibrillation. *Circulation Research*, *80*(6), 772–781.
- Veale, E. L., Golluscio, A., Grand, K., Graham, J. M., & Mathie, A. (2022). A KCNB1 gain of function variant causes developmental delay and speech apraxia but not seizures. *Frontiers in Pharmacology*, *13*.
- Vezzani, A., Bartfai, T., Bianchi, M., Rossetti, C., & French, J. (2011). Therapeutic potential of new antiinflammatory drugs. *Epilepsia*, *52 Suppl 8*, 67–69.
- Vierra, N. C., Kirmiz, M., van der List, D., Santana, L. F., & Trimmer, J. S. (2019). Kv2.1 mediates spatial and functional coupling of L-type calcium channels and ryanodine receptors in mammalian neurons. *ELife*, *8*, e49953.
- Vigevano, F., Arzimanoglou, A., Plouin, P., & Specchio, N. (2013). Therapeutic approach to epileptic encephalopathies. *Epilepsia*, *54 Suppl 8*, 45–50.
- Volkers, L., Rook, M. B., Das, J. H. G., Verbeek, N. E., Groenewegen, W. A., van Kempen, M. J. A., Lindhout, D., & Koeleman, B. P. C. (2009). Functional analysis of novel KCNQ2 mutations found in patients with Benign Familial Neonatal Convulsions. *Neuroscience Letters*, *462*(1), 24–29.
- von Deimling, M., Helbig, I., & Marsh, E. D. (2017). Epileptic Encephalopathies-Clinical Syndromes and Pathophysiological Concepts. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *17*(2), 10.
- Walz, W. (2003). Potassium homeostasis in the brain at the organ and cell level. In *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 31, pp. 595–609). Elsevier.
- Wang, H., Kunkel, D. D., Schwartzkroin, P. A., & Tempel, B. L. (1994). Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *14*(8), 4588–4599.

- Wang, H.-S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 Potassium Channel Subunits: Molecular Correlates of the M-Channel. *Science*, *282*(5395), 1890–1893.
- Wang, K. (2008). Modulation by clamping: Kv4 and KChIP interactions. *Neurochemical Research*, *33*(10), 1964–1969.
- Watanabe, I., Wang, H.-G., Sutachan, J. J., Zhu, J., Recio-Pinto, E., & Thornhill, W. B. (2003). Glycosylation Affects Rat Kv1.1 Potassium Channel Gating by a Combined Surface Potential and Cooperative Subunit Interaction Mechanism. *The Journal of Physiology*, *550*(1), 51–66.
- Wee, C. L., Bemporad, D., Sands, Z. A., Gavaghan, D., & Sansom, M. S. P. (2007). SGTx1, a Kv Channel Gating-Modifier Toxin, Binds to the Interfacial Region of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, *92*(1), L07–L09.
- West, W. J. (1841). ON A PECULIAR FORM OF INFANTILE CONVULSIONS,. *The Lancet*, *35*(911), 724–725.
- Wible, B. A., Yang, Q., Kuryshev, Y. A., Accili, E. A., & Brown, A. M. (1998). Cloning and Expression of a Novel K<sup>+</sup> Channel Regulatory Protein, KChAP \*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(19), 11745–11751.
- Wu, Y., Whiteus, C., Xu, C. S., Hayworth, K. J., Weinberg, R. J., Hess, H. F., & De Camilli, P. (2017). Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(24), E4859–E4867.
- Xiong, J., Liu, Z., Chen, S., Kessi, M., Chen, B., Duan, H., Deng, X., Yang, L., Peng, J., & Yin, F. (2022). Correlation Analyses of Clinical Manifestations and Variant Effects in KCNB1-Related Neurodevelopmental Disorder. *Frontiers in Pediatrics*, *9*.
- Xu, D., Miller, S. D., & Koh, S. (2013). Immune mechanisms in epileptogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 195.
- Xu, H., Barry, D. M., Li, H., Brunet, S., Guo, W., & Nerbonne, J. M. (1999). Attenuation of the Slow Component of Delayed Rectification, Action Potential Prolongation, and Triggered Activity in Mice Expressing a Dominant-Negative Kv2  $\alpha$  Subunit. *Circulation Research*, *85*(7), 623–633.
- Xu, N. (2013). On the Concept of Resting Potential—Pumping Ratio of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Pump and Concentration Ratios of Potassium Ions Outside and Inside the Cell to Sodium Ions Inside and Outside the Cell. *The Journal of Membrane Biology*, *246*(1), 75–90.

- Xu, Z., Khan, S., Schnicker, N. J., & Baker, S. (2022). Pentameric assembly of the Kv2.1 tetramerization domain. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*, 78(Pt 6), 792–802.
- Yeh, C.-Y., Bulas, A. M., Moutal, A., Saloman, J. L., Hartnett, K. A., Anderson, C. T., Tzounopoulos, T., Sun, D., Khanna, R., & Aizenman, E. (2017). Targeting a Potassium Channel/Syntaxin Interaction Ameliorates Cell Death in Ischemic Stroke. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(23), 5648–5658.
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), Article 6902.
- Yu, H., Shi, J., Qian, J., Wang, S., Li, S., Yu, H., Shi, J., Qian, J., Wang, S., & Li, S. (2023). Single dendritic neural classification with an effective spherical search-based whale learning algorithm. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 20(4), Article mbe-20-04-328.
- Yu, S. P. (2003). Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Progress in Neurobiology*, 70(4), 363–386.
- Yu, S. P., Canzoniero, L. M. T., & Choi, D. W. (2001). Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(4), 405–411.
- Yu, S. P., Yeh, C. H., Sensi, S. L., Gwag, B. J., Canzoniero, L. M., Farhangrazi, Z. S., Ying, H. S., Tian, M., Dugan, L. L., & Choi, D. W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science (New York, N. Y.)*, 278(5335), 114–117.
- Zavaritskaya, O., Zhuravleva, N., Schleifenbaum, J., Gloe, T., Devermann, L., Kluge, R., Mladenov, M., Frey, M., Gagov, H., Fésüs, G., Gollasch, M., & Schubert, R. (2013). Role of KCNQ channels in skeletal muscle arteries and periadventitial vascular dysfunction. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 61(1), 151–159.
- Zeldenrust, F., Wadman, W. J., & Englitz, B. (2018). Neural Coding With Bursts—Current State and Future Perspectives. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 12.
- Zhang, Y.-X., Liu, Y., Dong, J., Wang, Y.-X., Wang, J., Zhuang, G.-Q., Han, S.-J., Guo, Q.-Q., Luo, Y.-X., Zhang, J., Peng, X.-X., Zhang, L., Yan, Y.-X., Yang, X., Wang, H., Han, X., Liu, G.-X., Kang, Y.-H., Liu, Y.-Q., ... He, Y. (2013). An Exploratory Study of the Association between KCNB1 rs1051295 and Type 2 Diabetes and Its Related Traits in Chinese Han Population. *PLoS ONE*, 8(2), e56365.
- Zhong, X. Z., Abd-Elrahman, K. S., Liao, C.-H., El-Yazbi, A. F., Walsh, E. J., Walsh, M. P., & Cole, W. C. (2010). Stromatoxin-sensitive, heteromultimeric Kv2.1/Kv9.3 channels contribute to myogenic control of cerebral arterial diameter. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 22), 4519–4537.

- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., & MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel–Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414(6859), Article 6859.
- Zhuang, G., Wu, W., Liu, F., Ma, J., Luo, Y., Xiao, Z., Liu, Y., Wang, W., & He, Y. (2009). SNAP-251–180 enhances insulin secretion by blocking Kv2.1 channels in rat pancreatic islet β-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(4), 812–816.