



Université de Montréal

**Bases moléculaires et cellulaires d'un trouble  
neurodéveloppemental causé par l'haploinsuffisance de  
*SYNGAP1***

par  
Martin Berryer

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Sciences Biomédicales

Décembre, 2015

© Martin Berryer, 2015



## Résumé

La déficience intellectuelle est la cause d'handicap la plus fréquente chez l'enfant. De nombreuses évidences convergent vers l'idée selon laquelle des altérations dans les gènes synaptiques puissent expliquer une fraction significative des affections neurodéveloppementales telles que la déficience intellectuelle ou encore l'autisme. Jusqu'à récemment, la majorité des mutations associées à la déficience intellectuelle a été liée au chromosome X ou à la transmission autosomique récessive. D'un autre côté, plusieurs études récentes suggèrent que des mutations *de novo* dans des gènes à transmission autosomique dominante, requis dans les processus de la plasticité synaptique peuvent être à la source d'une importante fraction des cas de déficience intellectuelle non syndromique. Par des techniques permettant la capture de l'exome et le séquençage de l'ADN génomique, notre laboratoire a précédemment reporté les premières mutations pathogéniques dans le gène à transmission autosomique dominante *SYNGAP1*. Ces dernières ont été associées à des troubles comportementaux tels que la déficience intellectuelle, l'inattention, des problèmes d'humeur, d'impulsivité et d'agressions physiques. D'autres patients sont diagnostiqués avec des troubles autistiques et/ou des formes particulières d'épilepsie généralisée.

Chez la souris, le *knock-out* constitutif de *Syngap1* (souris *Syngap1<sup>+/-</sup>*) résulte en des déficits comme l'hyperactivité locomotrice, une réduction du comportement associée à l'anxiété, une augmentation du réflexe de sursaut, une propension à l'isolation, des problèmes dans le conditionnement à la peur, des troubles dans les mémoires de travail, de référence et social. Ainsi, la souris *Syngap1<sup>+/-</sup>* représente un modèle approprié pour l'étude des effets délétères causés par l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* sur le développement de circuits neuronaux. D'autre part, il est de première importance de statuer si les mutations humaines aboutissent à l'haploinsuffisance de la protéine.

*SYNGAP1* encode pour une protéine à activité GTPase pour Ras. Son haploinsuffisance entraîne l'augmentation des niveaux d'activité de Ras, de phosphorylation de ERK, cause une morphogénèse anormale des épines dendritiques et un excès dans la concentration des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique des neurones excitateurs. Plusieurs études suggèrent que l'augmentation précoce de l'insertion des récepteurs AMPA au sein des

synapses glutamatergiques contribue à certains phénotypes observés chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. En revanche, les conséquences de l'haploinsuffisance de SYNGAP1 sur les circuits neuronaux GABAergiques restent inconnues.

Les enjeux de mon projet de PhD sont: 1) d'identifier l'impact de mutations humaines dans la fonction de *SYNGAP1*; 2) de déterminer si *SYNGAP1* contribue au développement et à la fonction des circuits GABAergiques; 3) de révéler comment l'haploinsuffisance de *Syngap1* restreinte aux circuits GABAergiques affecte le comportement et la cognition.

Nous avons publié les premières mutations humaines de type faux-sens dans le gène *SYNGAP1* (c.1084T>C [p.W362R]; c.1685C>T [p.P562L]) ainsi que deux nouvelles mutations tronquantes (c.2212\_2213del [p.S738X]; c.283dupC [p.H95PfsX5]). Ces dernières sont toutes *de novo* à l'exception de c.283dupC, héritée d'un père mosaïque pour la même mutation. Dans cette étude, nous avons confirmé que les patients pourvus de mutations dans *SYNGAP1* présentent, entre autre, des phénotypes associés à des troubles comportementaux relatifs à la déficience intellectuelle. En culture organotypique, la transfection biolistique de l'ADNc de *Syngap1 wild-type* dans des cellules pyramidales corticales réduit significativement les niveaux de pERK, en fonction de l'activité neuronale. Au contraire les constructions plasmidiques exprimant les mutations W362R, P562L, ou celle précédemment répertoriée R579X, n'engendre aucun effet significatif sur les niveaux de pERK. Ces résultats suggèrent que ces mutations faux-sens et tronquante résultent en la perte de la fonction de SYNGAP1 ayant fort probablement pour conséquences d'affecter la régulation du développement cérébral.

Plusieurs études publiées suggèrent que les déficits cognitifs associés à l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* peuvent émerger d'altérations dans le développement des neurones excitateurs glutamatergiques. Toutefois, si, et auquel cas, de quelle manière ces mutations affectent le développement des interneurons GABAergiques résultant en un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition et aux déficits cognitifs restent sujet de controverses. Par conséquent, nous avons examiné la contribution de *Syngap1* dans le développement des circuits GABAergiques. A cette fin, nous avons généré une souris mutante *knockout* conditionnelle dans laquelle un allèle de *Syngap1* est spécifiquement excisé dans les interneurons GABAergiques issus de l'éminence ganglionnaire médiale (souris Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup>). En culture organotypique, nous avons démontré que la réduction de

*Syngap1* restreinte aux interneurons inhibiteurs résulte en des altérations au niveau de leur arborisation axonale et dans leur densité synaptique. De plus, réalisés sur des coupes de cerveau de souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, les enregistrements des courants inhibiteurs postsynaptiques miniatures (mIPSC) ou encore de ceux évoqués au moyen de l'optogénétique (oIPSC) dévoilent une réduction significative de la neurotransmission inhibitrice corticale. Enfin, nous avons comparé les performances de souris jeunes adultes *Syngap1<sup>+/-</sup>*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* à celles de leurs congénères contrôles dans une batterie de tests comportementaux. À l'inverse des souris *Syngap1<sup>+/-</sup>*, les souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* ne présentent pas d'hyperactivité locomotrice, ni de comportement associé à l'anxiété. Cependant, elles démontrent des déficits similaires dans la mémoire de travail et de reconnaissance sociale, suggérant que l'haploinsuffisance de *Syngap1* restreinte aux interneurons GABAergiques dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale récapitule en partie certains des phénotypes cognitifs observés chez la souris *Syngap1<sup>+/-</sup>*.

Mes travaux de PhD établissent pour la première fois que les mutations humaines dans le gène *SYNGAP1* associés à la déficience intellectuelle causent la perte de fonction de la protéine. Mes études dévoilent, également pour la première fois, l'influence significative de ce gène dans la régulation du développement et de la fonction des interneurons. D'admettre l'atteinte des cellules GABAergiques illustre plus réalistement la complexité de la déficience intellectuelle non syndromique causée par l'haploinsuffisance de *SYNGAP1*. Ainsi, seule une compréhension raffinée de cette condition neurodéveloppementale pourra mener à une approche thérapeutique adéquate.

**Mots-clés :** Déficience intellectuelle non syndromique, *SYNGAP1*, mutations *de novo* tronquantes et faux-sens, interneurons GABAergiques, innervation périsomatique inhibitrice, souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, neurotransmission GABAergique, comportement et cognition

## Abstract

Intellectual deficiency is the most frequent cause of severe handicap in children. A growing body of work indicates that disruption of synaptic genes explains a significant fraction of neurodevelopmental disorders, such as intellectual deficiency and autism. Until recently, the majority of known mutations associated with non-syndromic intellectual deficiency were either X-linked or autosomal recessive. On the other hand, more recent studies suggest that *de novo* mutations in autosomal genes required for synaptic plasticity may explain an important fraction of cases of non-syndromic intellectual deficiency. Using exome capture and genomic DNA sequencing technics, our laboratory reported for the first time pathogenic mutations in the autosomal dominant gene of *SYNGAP1*. Pathogenic mutations in *SYNGAP1* have been associated with behavioral abnormalities such as intellectual deficiency, inattention, mood problem, impulsivity, and physical aggression. In addition, a subset of these patients show acquired microcephaly, autism and/or specific forms of generalized epilepsy.

*Syngap1* germline *knockout* (*Syngap1*<sup>+/-</sup>) mice show several behavioral abnormalities, such as locomotor hyperactivity, decreased anxiety-like behavior, enhanced startle reactivity, lack of social memory, a propensity toward isolation, deficits in cued fear conditioning, and impaired reference and working memories. Thus, *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice might represent a reliable experimental model to study the pathological effects of Syngap1 haploinsufficiency on neuronal circuit development. On the other hand, it is important to first establish whether mutations in *Syngap1* found in human lead in fact to protein haploinsufficiency.

*SYNGAP1* codes for a Ras GTPase-activating protein. Its haploinsufficiency results in an increased level of Ras activity and ERK phosphorylation, abnormal dendritic spine morphogenesis, and an excess of postsynaptic AMPA receptors in excitatory neurons. Specifically, it has been suggested that prematurely increased insertion of AMPA receptors into excitatory synapses could explain some of the phenotypes observed in *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice. Conversely, the role of *Syngap1* haploinsufficiency in GABAergic circuits is unknown.

The aims of my thesis project are: 1), to identify the impact of human mutations on *SYNGAP1* function; 2) to determine whether *SYNGAP1* plays a role in GABAergic circuit

development and function, and 3) to reveal how Syngap1 haploinsufficiency specifically in GABAergic circuits affects cognitive behavior.

We reported the first missense mutations (c.1084T>C [p.W362R]; c.1685C>T [p.P562L]), as well as two novel truncating mutations (c.2212\_2213del [p.S738X]; c.283dupC [p.H95PfsX5]) in *SYNGAP1* in humans. These mutations are *de novo*, except c.283dupC, which was inherited from a mosaic parent. In this study, we confirmed that patients with these mutations in *SYNGAP1* showed, among other phenotypes, behavioral disorders associated with intellectual deficiency. Biolistic transfection of wild-type Syngap1 cDNA in pyramidal cells from cortical organotypic cultures significantly reduced neural activity-dependent pERK levels. In contrast, plasmid constructs expressing W362R, P562L or the previously described R579X mutations had no significant effect on pERK levels. These experiments suggest that these mutations in *SYNGAP1* result in a loss of function, most probably disrupting brain development via a mechanism of haploinsufficiency.

Several studies suggest that the cognitive deficits associated with *Syngap1* haploinsufficiency may arise from alterations in the developmental trajectory of glutamatergic excitatory neurons. Whether and to what extent *Syngap1* haploinsufficiency affects the synaptic network development of GABAergic cells, thus contributing to excitation/inhibition imbalance and cognitive abnormalities, remains elusive. Therefore, we examined the involvement of *Syngap1* in the development of GABAergic circuits. To this goal, we generated conditional knockout mice where one *Syngap1* allele was removed specifically in GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence (MGE) (*Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>lox/+</sup>* mice). In organotypic cultures, we found that reduction of *Syngap1* specifically in GABAergic interneurons resulted in alterations of their axonal arborisation and synapse density. Moreover, miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) and optogenetically-evoked IPSC (oIPSC) recordings in acute brain slices showed a significant reduction in cortical inhibitory neurotransmission in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>lox/+</sup>* mice. Furthermore, we compared the performance of young adult *Syngap1<sup>+/-</sup>*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>lox/+</sup>* mice and their respective control littermates in several behavioral tests. Contrary to *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>lox/+</sup>* mice were not hyperactive, and did not demonstrate any anxiety-like behavior. They, however, showed the same impairment in working and social recognition memory, indicating that *Syngap1* disruption in MGE-derived



GABAergic neurons recapitulate at least some of the cognitive deficits observed in *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice.

All together, my PhD work first, demonstrated that human mutations in the *SYNGAP1* gene associated with intellectual deficiency likely cause *Syngap1* haploinsufficiency, and second, revealed for the first time a significant role of SYNGAP1 in the regulation of the development and function of GABAergic interneurons.

**Keywords** : Non-syndromic intellectual deficiency, *SYNGAP1*, *de novo* truncating and missense mutations, medial ganglionic eminence derived GABAergic interneuron, parvalbumin, inhibitory perisomatic innervation, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mouse, GABAergic neurotransmission, behavior and cognition

# Table des matières

Résumé.....	I
Abstract.....	IV
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figure.....	XII
Liste des abréviations.....	XIV
Remerciements.....	XVIII
Chapitre I: Introduction.....	19
I - La déficience intellectuelle.....	19
I - 1. Définition et étiologie de la déficience intellectuelle.....	19
I - 2. Causes de la déficience intellectuelle.....	21
I - 3. Altérations de la synapse et déficience intellectuelle.....	27
II - L'haploinsuffisance de <i>SYNGAP1</i> .....	30
II - 1. SYNGAP1.....	30
II - 2. Les mutations dans le gène SYNGAP1 .....	34
II - 3. Voies intracellulaires associées à SYNGAP1.....	36
II - 4. Modèles murins d'haploinsuffisance de SYNGAP1 .....	41
II - 5. Rôles de SYNGAP1.....	44
II - 6. Autres Rasopathies.....	61
III - Les interneurones GABAergiques télencéphaliques .....	69
III - 1. Origines des interneurones .....	70
III - 2. Migration et intégration des interneurones GABAergiques télencéphaliques .....	88
III - 3. Diversité des interneurones GABAergiques télencéphaliques.....	88

III - 4. Rôle des interneurons GABAergiques télencéphaliques .....	88
III - 5. Interneuropathies .....	93
Hypothèses et objectifs .....	98
Chapitre II: Mutations in <i>SYNGAP1</i> cause intellectual disability, autism and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency. ....	99
Abstract .....	101
Introduction .....	102
Methods .....	104
Subjects .....	104
<i>SYNGAP1</i> targeted sequencing and TA cloning .....	104
Exome capture and sequencing .....	105
Paternity and maternity testing .....	105
Cell culture and transfection .....	106
<i>SYNGAP1</i> expression constructs .....	106
Western blot analysis .....	106
Cortical organotypic culture and biolistic transfection .....	107
pERK immunostaining and quantification .....	108
Statistical analysis .....	108
Results .....	109
Novel mutations in <i>SYNGAP1</i> in subjects with NSID .....	109
<i>SYNGAP1</i> mutant proteins are not stable in cell lines .....	111
Mutant forms of <i>SYNGAP1</i> are unable to suppress activity-mediated ERK activation in cortical pyramidal neurons .....	113
Clinical phenotype of patients with mutations in <i>SYNGAP1</i> .....	114
Discussion .....	116

Acknowledgements.....	119
Supporting Information.....	129
Supp. patient description.....	129
Patient-1 (c.283dupC [p.H95PfsX5]) .....	129
Patient-2 (c.1084T>C [p.W362R]) .....	130
Patient-3 (c.1685C>T [p.P562L]).....	131
Patient-4 (c.2212_2213del [p.S738X]).....	133
Patient-5 (c.2184del [p.N729TfsX31]).....	134
Chapitre III: Decrease of <i>Syngap1</i> in GABAergic cells impairs inhibitory synapse development, synaptic inhibition and cognitive function.....	136
Abstract.....	138
Introduction.....	139
Results.....	141
Single-cell cre-mediated inactivation of <i>Syngap1</i> reduced perisomatic innervation formed by GABAergic basket cells in cortical organotypic cultures.....	141
<i>Syngap1</i> haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons reduced basket cell connectivity.....	142
<i>Syngap1</i> haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons impairs inhibitory synaptic transmission in vivo.....	145
<i>Syngap1</i> haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons affects gamma oscillations during exploratory behavior in adulthood.....	146
<i>Syngap1</i> haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons causes cognitive and behavioral deficits that partially resemble those in <i>Syngap1</i> <sup>+/-</sup> mice.....	147
Discussion.....	150
Material and methods.....	154

Mice .....	154
Primary cortical neuron culture .....	154
Cortical organotypic culture and biolistic transfection.....	155
Immunohistochemistry, image acquisition and analysis of basket cells in cultures.....	155
Analysis of perisomatic innervation in vivo. ....	157
Viral vector and stereotaxic injections.....	158
Electrophysiology .....	158
mIPSC recordings .....	158
Optogenetics .....	159
EEG recordings and gamma oscillation analysis.....	160
Behavioral studies.....	161
Statistical analysis.....	162
Chapitre IV: Discussion.....	184
Précautions, Limites & Questions en suspens .....	185
Perspectives.....	190
Essais thérapeutiques .....	195
Conclusion .....	203
Bibliographie.....	204

## Liste des tableaux

**Table I:** Phenotype of patients with point mutations in *SYNGAPI* ..... 129

**Supp. Table S1.** Paternity and maternity testing for patients 2-5 done using 6 informative polymorphic unlinked microsatellite markers. .... 135

# Liste des figures

## Chapitre I

<b>Figure 1.</b> Exemples de mutations dans le gène SYNGAP1 identifiées jusqu'à présent, chez des patients atteints de déficience intellectuelle non-syndromique .....	32
<b>Figure 2.</b> Vocation de SYNGAP1 dans la LTP dépendante des récepteurs NMDA .....	40
<b>Figure 3.</b> Représentation d'un cerveau embryonnaire (vers E14) de souris, des zones progénitrices (à gauche) et des facteurs de transcription (à droite) assignés à la production des nombreuses sous population d'interneurones GABAergiques .....	73
<b>Figure 4.</b> Représentation stéréotypique des processus de formation de l'innervation de la synapse périsonomatique GABAergique .....	77
<b>Figure 5.</b> Illustration représentative de la spécificité de l'innervation synaptique GABAergique .....	83
<b>Figure 6.</b> Illustration de possibles intégrations des interneurones GABAergiques au sein des réseaux neuronaux .....	86

## Chapitre II

<b>Figure 1.</b> Pathogenic point mutations in <i>SYNGAP1</i> identified in patients with NSID .....	121
<b>Figure 2.</b> Potential impact of the p.W362R and p.P562L mutations on SYNGAP1 structure.. .....	122
<b>Figure 3.</b> SYNGAP1 mutant proteins are unstable in HEK293 and N7 cells.....	124
<b>Figure 4.</b> SYNGAP1 mutants are less efficient in inhibiting ERK phosphorylation induced by neuronal activity.....	127
<b>Figure 5.</b> Electroencephalographic features of patients with mutations in <i>SYNGAP1</i> .....	128

## Chapitre III

<b>Figure 1.</b> Single-cell Cre-mediated inactivation of <i>Syngap1</i> reduces the number of cortical GABAergic basket cell boutons and terminal branching.....	163
<b>Figure 2.</b> Both MGE-specific and germline <i>Syngap1</i> haploinsufficiency reduce PV+ perisomatic innervation in the cortex of young adult mice.....	165

<b>Figure 3.</b> <i>Syngap1</i> promotes terminal axonal branching and bouton formation in cortical MGE-derived basket cells.....	167
<b>Figure 4.</b> <i>Syngap1</i> haploinsufficiency in MGE-derived interneurons reduces mIPSC frequency.....	169
<b>Figure 5.</b> <i>Syngap1</i> haploinsufficiency in MGE-derived interneurons reduces their synaptic output to pyramidal cells.....	171
<b>Figure 6.</b> <i>Syngap1</i> haploinsufficiency in MGE-derived interneurons impairs cortical gamma oscillations during active exploration in awake mice.....	172
<b>Figure 7.</b> <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup></i> mice show cognitive deficits that partially recapitulate those observed in <i>Syngap1<sup>+/-</sup></i> mice.....	174
<b>Suppl. Figure 1.</b> GABAergic interneurons express <i>Syngap1</i> .....	176
<b>Suppl. Figure 2.</b> Cre-mediated inactivation of <i>Syngap1</i> from EP16 to EP24 reduces basket cell bouton density.....	177
<b>Suppl. Figure 3.</b> Cortical PV+ cells show Cre-mediated activation of GFP in <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>;RCE</i> mice.....	178
<b>Suppl. Figure 4.</b> mIPSC kinetics and charge transfer in mice carrying <i>Syngap1</i> haploinsufficiency in MGE-derived interneurons.....	179
<b>Suppl. Figure 5.</b> <i>Syngap1<sup>+/-</sup></i> and <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup></i> mice show normal social approach behavior.....	181
<b>Suppl. Figure 6.</b> <i>Tg(Nkx-Cre)</i> show normal locomotor, anxiety, spontaneous alternation and social behavior.....	182

*Chapitre IV*

<b>Figure 7.</b> L'haploinsuffisance de <i>Syngap1</i> ne résulte en aucun déficit dans l'apprentissage et la mémoire spatiale.....	195
<b>Figure 8.</b> La lovostatine ne rétablit pas l'hyperactivité ni les niveaux relatifs à l'anxiété chez la souris <i>Syngap1<sup>+/-</sup></i> .....	200



## Liste des abréviations

ADN, *DNA*: Acide désoxyribonucléique, *Deoxyribo-nucleic acid*

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

*ANOVA*: *Analysis of variance*

*APV*: *Amino-5-phosphonoaleric acid*

ARN, *RNA*: Acide ribonucléique, *ribonucleic acid*

ARNm, *mRNA*: ARN messenger, *messenger RNA*

ATP: Adénosine triphosphate

*A.U.*: *Arbitrary unit*

*BDNF*: *Brain derived neurotrophic factor*

*Bp*: *Base pair*

*BSA*: *Bovine serum albumin*

CA1, 2, 3: Corne d'Amon 1, 2, 3

*CaMKII*: *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*

*Cck*: *Cholecystokinin*

*cDNA*: *coding DNA*

dB: Décibel

*EEG*: *Electroencephalogram*

*EGTA*: *Ethylen glycol tetraacetic acid*

*EP*: *Equivalent postnatal day*

*ERK*: *Extracellular signal regulated kinase*

*FISH*: *Fluorescence in situ hybridization*

*FMR1*: *Fragile X mental retardation 1*

*GABA*:  $\gamma$ -aminobutyric acid

*GAD<sub>65, 67</sub>*: *Glutamate decarboxylase*

*GDP*: *Guanosine diphosphate*

*GEF*: *Guanine exchange factor*

*GFP*: *Green fluorescent protein*

*GTP: Guanosine triphosphate*  
*HDAC1,2: Histone deacetylase 1, 2*  
*HEK293: Human embryonic kidney 293*  
*H-Ras: Harvey rat sarcoma*  
*ID: Intellectual deficiency*  
*IEI: Inter event interval*  
*IRES: Internal ribosomal entry site*  
*KCC2: K<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> cotransporter 2*  
*Kb: Kilo base*  
*kDa: kilo Dalton*  
*K-Ras: Kirsten rat sarcoma*  
*K-S: Kolmogorov-Smirnov*  
*LTD: Long term depression*  
*LTP: Long term potentiation*  
*L2-3: Layer 2-3*  
*MeCP2: Methyl CpG binding protein 2*  
*mEPSC: Miniature excitatory post synaptic current*  
*mIPSC: Miniature inhibitory post synaptic current*  
*MGE: Medial ganglionic eminence*  
*MG-132: Z-Leu-Leu-Leu-al*  
*NF1: Neurofibromatosis type I*  
*NGS: Normal goat serum*  
*NKCC1: Na<sup>2+</sup> - K<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> cotransporter*  
*N-NOS: Neuronal nitric oxide synthase*  
*N-Ras: Neuroblastoma rat sarcoma*  
*NSID: Non syndromic intellectual deficiency*  
*N7: Neuroblastoma 7*  
*oIPSC: Optogenetically-evoked inhibitory post synaptic current*  
*PBS: Phosphate buffer saline*  
*PCR: Polymerase chain reaction*  
*P-CMV: Promotor of cytomegalovirus*

*PFA: Paraformaldehyde*

*PND: Postnatal day*

*Pv: Parvalbumin*

*Py: Pyramidal*

*Ras: Rat sarcoma*

*RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction*

*SD: Standard deviation*

*SDS-PAGE: Sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis*

*Sst: Somatostatin*

*SVZ: Subventricular zone*

*Syngap1: Synaptic GTPase activating protein*

*TrKB: Tropomyosin receptor kinase B*

*TSC: Tuberous Sclerosis Complex*

*TTX: Tetrodotoxin*

*VZ: Ventricular zone*

*VIP: Vasoactive intestinal peptide*

*WT: Wild type*

*A mes proches*

# Remerciements

Nulle oeuvre n'est exaltante que celle réalisée avec le soutien précieux de personnes stimulantes.

Je tiens à exprimer mes remerciements:

Particulièrement aux Dr Graziella Di Cristo et Dr Jacques Michaud

A travers eux, aux membres de leurs laboratoires

Ma plus profonde reconnaissance aux

Dr Elsa Rossignol, Dr Bidisha Chattopadhyaya, Dr Fadi Hamdan

Je dédie cette thèse à mes parents et frère: oeuvrant à ma réussite par leurs amours, soutiens, sacrifices consentis et conseils, pour toute l'assistance et leur présence dans ma vie. Veuillez trouver ici le résultat de vos nombreuses années consacrées à m'aider à avancer. Merci pour vos nobles valeurs, votre éducation. Vous êtes des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Puissez vous, par ce travail, recevoir la certitude de l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

# **Chapitre I: Introduction**

## **I - La déficience intellectuelle**

### **I - 1. Définition et étiologie de la déficience intellectuelle**

La déficience intellectuelle (trouble/affection intellectuel(le) développemental(e)) diagnostiquée avant l'âge de dix-huit ans, se caractérise par des déficits dans les aptitudes mentales générales comme les raisonnements, la résolution de problèmes, la planification, la pensée abstraite, le jugement, l'apprentissage académique ainsi que dans l'apprentissage par l'expérience (American Psychiatric Association DSM-5, 2013). Ces déficits résultent d'altérations dans les fonctions adaptatives telle que l'individu ne satisfait pas aux critères d'indépendance personnelle et de responsabilité socio-culturelle dans (au moins) un des aspects suivants: communication, participation sociale, performances académiques ou professionnelles, autonomie à la maison et/ou en communauté (American Psychiatric Association DSM-5, 2013).

La déficience intellectuelle est diagnostiquée par le praticien grâce à des tests psychométriques d'intelligence valides, compréhensifs et culturellement appropriés. L'échelle d'intelligence de Wechsler (WISC IV), référence internationale, permet l'évaluation du quotient intellectuel chez l'enfant. Classiquement la moyenne des scores obtenus par la population est de 100 avec un écart-type de 15 points. Les individus atteints de déficience intellectuelle atteignent des scores équivalents à, ou au delà de, deux fois l'écart-type à la moyenne de la population en incluant une marge d'erreur de 5 points: c'est à dire un score de  $75 \pm 5$  (American Psychiatric Association DSM-5, 2013). La déficience intellectuelle a une prévalence d'environ 1 cas pour

150 à 200 individus<sup>1</sup>, donnée variable en fonction de l'âge considéré, de l'environnement socio-économique, de l'accès à l'éducation ou aux soins, du niveau d'éducation parentale et du sexe<sup>1-9</sup>.

### **I - 1.1. Les déficiences intellectuelles syndromique & non-syndromique**

La déficience intellectuelle peut être classifiée en deux groupes. Traditionnellement, l'existence de signes morphologiques, radiologiques et/ou métaboliques définit la déficience intellectuelle syndromique; l'absence de manifestation clinique signe la déficience intellectuelle non-syndromique. Plus de 250 gènes sont associés à la déficience intellectuelle syndromique élucidant approximativement 50% des cas répertoriés. Pour autant de subtiles anomalies neurologiques et/ou désordres psychiatriques sont associés à la déficience intellectuelle non syndromique compliquant d'autant le diagnostic de ce trouble cognitif. Pour environ 40 gènes répertoriés éclaircissant seulement 10 à 15% des cas connus, la déficience intellectuelle non-syndromique représente cependant deux tiers de la population des enfants diagnostiqués. Nous laissant entrevoir l'étendue de notre ignorance !

### **I - 1.2. Différents degrés d'atteinte de déficience intellectuelle**

L'atteinte de la déficience intellectuelle est estimée sur la base de la fonction adaptative (domaines conceptuel, social et pratique). Quatre degrés de sévérité se distinguent:

- Légère: les individus ont des déficits d'apprentissage scolaire, de flexibilité cognitive, de mémoire à court terme, d'interactions sociales (communication, conversation et langage), dans la régulation de leurs émotions et requièrent une assistance personnelle dans les tâches quotidiennes complexes
- Modérée: les aptitudes scolaires, sociales, linguistiques, le jugement et la prise de décision sont limités; la possibilité d'un emploi exige un appui externe

- Sévère: les faibles performances dans l'écriture, le langage (limité à de simples phrases ou quelques mots), dans les concepts relatifs aux nombres, aux quantités, au temps amenuisent les capacités scolaires, sociales et pratiques de l'individu qui nécessitent une assistance permanente
- Profonde: l'individu s'exprime par la communication non-verbale, non-symbolique ou grâce aux émotions pour répondre aux interactions sociales et requière une aide de tous les instants.

### **I - 1.3. Comorbidité**

La déficience intellectuelle est fréquemment combinée à des conditions mentales, neurodéveloppementales, médicales ou physiques. Ainsi les troubles mentaux, les paralysies cérébrales et les épilepsies sont 3 à 4 fois plus répandus chez les individus atteints de déficience intellectuelle que dans la population générale. Outre des troubles d'attention et d'hyperactivité, des troubles dépressif et bipolaire, des troubles d'anxiété et d'impulsivité, des syndromes tel que l'autisme ainsi que d'autres troubles majeurs neurocognitifs sont également communément associés à la déficience intellectuelle. Certains individus souffrant de déficience intellectuelle sévère à profonde peuvent manifester par ailleurs d'importants troubles dépressifs, des épisodes d'agressivité, d'irritabilité (American Psychiatric Association, DSM-5) et d'automutilation<sup>10</sup>. Le diagnostic de la déficience intellectuelle peut donc être entravée par la présence de ces conditions comorbides.

## **I - 2. Causes de la déficience intellectuelle**

### **I - 2.1. Acquises**

La déficience intellectuelle est associée à des traumatismes cérébraux ou des tumeurs cérébrales aussi bien qu'à des facteurs de risques prénataux telles que les infections au cytomégalo virus, à la grippe, à la rubéole<sup>11</sup>, à la toxoplasmose, à l'herpès<sup>12</sup>. L'exposition



pendant la période prénatale à des anticonvulsivants, au plomb<sup>13,14</sup>, à l'alcool<sup>15-17</sup>, la carence maternelle en phénylcétonurie<sup>12</sup> ou l'insuffisance en iode<sup>18</sup>, en cuivre ou en zinc<sup>19,20</sup> ainsi que la prématurité et l'hypoxie périnatale peuvent également être liées à des cas de déficience intellectuelle<sup>21</sup>.

## **I - 2.2. Génétiques**

Les familles dans lesquelles la déficience intellectuelle est transmise sont rares en raison d'un taux de reproduction très inférieur à celui de la population générale. Or des mutations peuvent survenir *de novo* (spontanément ou non héritées). Celles-ci représentent les causes génétiques de la déficience intellectuelle les plus fréquemment identifiées. Ainsi l'étiologie génétique de la déficience intellectuelle est bien documentée et représente de 25 à 50% des cas identifiés<sup>2</sup>. Depuis la première découverte d'une anomalie chromosomique dans le syndrome de Down<sup>22,23</sup>, les recherches sur la déficience intellectuelle se sont concentrées sur l'identification de mutations héritées ou *de novo* de plus en plus spécifiques: du remaniement chromosomique à la mutation ponctuelle.

### **I – 2.2.1. Changements du nombre de copies de gènes**

Originellement le terme de maladies génétiques a été appliqué à des affections causées par des réarrangements de régions spécifiques du génome. L'étude de ces remaniements a montré qu'ils sont récurrents et fortement reliés à l'architecture locale du génome. La plupart des cas *de novo* sont attribués à des réarrangements de longs et spécifiques intervalles chromosomiques contenant un ou plusieurs gènes. Un changement du nombre de copies se traduit soit par une délétion du matériel génétique ou par sa duplication. Bien que la grande majorité des changements du nombre de copies retrouvée dans la population soit bénigne<sup>24-26</sup>, de rares exemples ont été associées à des troubles neuropsychiatriques telles que le déficit d'attention et l'hyperactivité<sup>27</sup>, la déficience intellectuelle<sup>28,29</sup>, la schizophrénie et l'autisme<sup>25,30,31</sup>.

Les délétions peuvent être hétérozygotes où un seul allèle est absent, homozygotes pour lesquelles il y a carence des deux allèles ou encore hémizygotiques lorsque localisées sur le chromosome X. Les duplications quant à elles, aboutissent à l'insertion d'un ou d'allèles supplémentaires jusqu'à la présence d'un chromosome surnuméraire. Des délétions/duplications subtélomériques dans le bras long du chromosome numéro 15 contenant notamment les gènes *UBE3A* (*ubiquitin protein ligase E3A*), *GABRA5* (*γ aminobutyric acid receptor α<sub>5</sub>*) et *GABRB3* (*γ aminobutyric acid receptor β<sub>3</sub>*) ont été authentifiées dans des syndromes tels celui de Prader-Willi<sup>32</sup> et celui d'Angelman<sup>33</sup>. Celles survenant sur le bras court du chromosome numéro 16 impliquant les gènes *DNASE1* (*deoxyribonuclease 1*), *TRAP1* (*tumor necrosis factor receptor associated protein 1*) et *CREBBP* (*cAMP responsive element binding protein*) sont associées au syndrome de Rubenstein-Taybi<sup>34</sup>. Des délétions dans le bras long du chromosome numéro 22 ont été liées au syndrome de DiGeorge<sup>35</sup>. D'autres insertion/délétion ont été détectées sur le chromosome X<sup>36,37</sup>. A noter que des délétions spécifiques du bras long du chromosome numéro 15 ont été impliquées dans l'épilepsie<sup>38</sup>, la déficience intellectuelle, la schizophrénie<sup>31</sup> et l'autisme<sup>39</sup> soulignant le trait entremêlé et extrêmement complexe de telles conditions. Pourtant les facteurs amenant et expliquant de telle variabilité et diversité phénotypique pour une condition génétique restent encore méconnus.

### I - 2.2.2. Les mutations ponctuelles

Récemment le séquençage du patrimoine génétique d'individus, en comparaison de celui de leurs parents, a mis en lumière l'importance des mutations ponctuelles héritées ou *de novo*, faux sens ou tronquantes dans la survenue de la déficience intellectuelle<sup>40-42</sup>.

#### ❖ Liées au chromosomes X

De nombreuses études se sont concentrées sur l'authentification de gènes du chromosome X. En effet les formes de déficiences intellectuelles liées au chromosome X peuvent être transmises par les femmes au sein de famille non-affectée, permettant relativement aisément l'analyse du pedigree génétique familiale. Ainsi 25% des cas de

déficiences intellectuelles sont attribués à des gènes localisés sur le chromosome X<sup>43</sup>; 10% des cas de déficience intellectuelle chez les garçons sont la cause de mutations sur le chromosome X<sup>44</sup>. Il est à noter qu'environ deux tiers des cas de déficience intellectuelle liée au chromosome X sont des formes non-syndromiques<sup>45</sup>.

La cause la plus fréquente de déficience intellectuelle syndromique et l'exemple certainement le plus connu de mutation ponctuelle liée au chromosome X est celui du syndrome du X Fragile. De façon remarquable chez les individus atteints du syndrome du X Fragile, l'affection des habiletés cognitives et la sévérité du phénotype physique (macroorchidisme, dysmorphie faciale, déficience intellectuelle syndromique) corrélat négativement avec l'expression de la protéine FMRP<sup>46</sup>. Chez les filles, l'expression clinique de la mutation est variable selon le profil d'inactivation de l'unique chromosome X fonctionnel.

Une autre importante cause de déficience intellectuelle syndromique et non-syndromique liée au chromosome X est due à des mutations dominantes tronquantes ou non sens dans le gène *MECP2* (*methyl CpG binding protein 2*)<sup>47</sup>. Ces dernières sous-tendent une grande variété de désordres neurodéveloppementaux dont le syndrome de Rett caractérisé par un arrêt précoce puis une régression du développement chez l'enfant, une ataxie, des mouvements stéréotypiques des mains et d'autres troubles neurologiques chez les filles. Chez les garçons les mutations dans le gène *MECP2* engendrent de multiples phénotypes tels que la déficience intellectuelle<sup>47</sup>, l'encéphalopathie<sup>48</sup>, les syndromes d'Angelman<sup>49</sup> et de Prader-Willi<sup>50</sup> ou également une spasticité progressive<sup>51</sup>.

Environ 90 gènes situés sur le chromosome X sont associées à la déficience intellectuelle<sup>52</sup>, dont les séquences codantes de *MAOA* (*monoamine oxidase A*)<sup>53</sup>, *OPHN1* (*oligophrenin 1*)<sup>54</sup> ou encore *SYN1* (*synapsin 1*)<sup>55</sup>. D'autres altérations alléliques dans les gènes *PAK3* (*p21 activated kinase 3*)<sup>56</sup>, *NLGN4* (*neuroligin 4*)<sup>57</sup> ou bien *DLG3* (*disk large protein 3*)<sup>58</sup> illustrent justement le lien causal entre une mutation génétique et la survenue de troubles phénotypiques comme la forme non syndromique de la déficience intellectuelle.

#### ❖ Autosomiques récessives

Les études des familles consanguines dans lesquelles plusieurs individus sont affectés ont permis l'identification de cause autosomique récessive de la déficience intellectuelle. Il est

certain que la descendance d'individus consanguins possèdera plus de séquences génétiques homozygotes qu'une personne née de parents de filiation éloignée. Ainsi pour un sujet atteint de déficience intellectuelle à transmission récessive, il est fort probable que le variant génétique causatif provienne de chacun des parents. Ce mécanisme est connu sous le terme d'autozygotie ou homozygotie par descendance où le rare variant allélique est transmis aux générations suivantes *via* un ancêtre éloigné mais commun aux branches maternelle et paternelle. A ce jour, environ 40 mutations récessives dans des gènes autosomiques sont associées à la déficience intellectuelle non-syndromique. Un variant allélique récessif altérant la séquence génétique du gène *PRSS12* (*neurotrypsin*) a été identifié chez des individus affectés de déficience intellectuelle non-syndromique issus de deux familles algériennes<sup>44</sup>. Plus récemment, chez des Amish et dans une famille Mennonite, une mutation homozygote récessive dans le gène *CRADD* codant pour une protéine impliquée dans l'apoptose neuronale a été authentifié et reliée à la survenue de la déficience intellectuelle<sup>59,60</sup>. D'autres exemples de mutations récessives dans le gène *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*) impliqué dans la N-glycosylation de protéines<sup>61</sup>, dans des gènes de la synthèse de créatine *AGAT* (*arginine/glycine amidinotransferase*) et *GAMT* (*guanidinoacetate N methyltransferase*)<sup>62</sup>, dans la production de neurotransmetteurs *AADC* (*aromatic amino acid decarboxylase*)<sup>63</sup> ou du transport vésiculaire comme *AP4* (*adaptor protein 4*)<sup>64</sup> sont également à la source de la survenue de la déficience intellectuelle.

#### ❖ Autosomiques dominantes

Lorsqu'au sein d'une famille la déficience intellectuelle est sévère, ceci signe le caractère probablement létal de la mutation à l'état homozygote<sup>40</sup>. Ainsi les pedigrees autosomiques dominants sont peu courants dans la population affectée. Plusieurs troubles autosomiques dominants tels la neurofibromatose (incidence environ 1 pour 4000 naissances)<sup>65</sup>, la sclérose tubéreuse (incidence environ 1 pour 6000 naissances)<sup>66</sup> ou la dystrophie myotonique (incidence environ 1 pour 8000 naissances)<sup>67</sup> sont régulièrement associés à la déficience intellectuelle. Et seulement quelques gènes sont associés à la déficience intellectuelle non-syndromique. Deux cohortes de patients atteints de déficience intellectuelle non syndromique idiopathiques ont révélé l'existence des premières mutations *de*

*de novo*, tronquantes, hétérozygotes dans les gènes *STXBPI* (*syntaxin binding protein 1*) et *SYNGAP1* (*synaptic GTPase activating protein*)<sup>68,69</sup>. *SYNGAP1* est notre gène d'intérêt. Peu après, le même groupe a identifié des variants génétiques tronquants dans le gène *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) et faux-sens dans le gène *KIF1A* (*kinesin family member 1A*) au sein d'une autre cohorte de patients atteints de déficience intellectuelle non-syndromique<sup>70</sup>. Plus récemment d'autres changements génétiques ponctuels *de novo* ont été découverts dans les gènes *SATB2* (*special AT rich sequence binding protein 2*), *SCN2A* et *SCN8A* (*sodium channel voltage gated type 2  $\alpha$  subunit* et *type 8  $\alpha$  subunit*), *SLC2A1* (*solute carrier family 2A member 1*) chez des patients allemands affectés de déficience intellectuelle non syndromique sévère<sup>71</sup>. Il est intéressant de constater que la plupart des mutations *de novo* décrites résultent en la perte de la fonction de la protéine.

Les bases génétiques de la déficience intellectuelle non syndromique sont encore mal comprises chez la plupart des enfants affectés. En particulier la survenue de modifications génétiques *de novo* dans un locus associé à la déficience intellectuelle sous-entend de le classer parmi les variants *de novo* bénins ou parmi les mutations *de novo* délétères. Ensuite, la probabilité de l'apparition d'une mutation *de novo* dans la lignée de cellules germinales affectant la séquence en acides aminés est faible (une par génome), réduisant presque à néant l'identification de la même mutation chez un autre individu atteint du même syndrome, compliquant d'autant la certitude de la relation mutation-phénotype. D'autre part nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse selon laquelle des mutations dans plusieurs gènes puissent contribuer au phénotype des patients. Même si peu d'évidence pour un tel phénomène existe et les effets combinés de plusieurs altérations génétiques sont peu connues et peu comprises. Par ailleurs, la difficulté d'établir ces bases génétiques réside dans l'handicap reproductif ainsi que dans l'hétérogénéité de telle condition résultant d'altérations de protéines diverses et variées. Néanmoins les gènes identifiés sont fréquemment impliqués dans les voies intracellulaires de signalisation (*PAK3*, *SYNGAP1*), sont associés au remodelage de la chromatine (*HDAC*, *MECP2*), sont des composants de vésicules synaptiques (*SYN1*, *NLGN4*), ou bien nécessaire à la synthèse de neurotransmetteur (*AGAT*, *MAOA*). D'autres mutations authentifiées et les études subséquentes sur des modèles transgéniques murins ont montré et/ou confirmé que ces molécules peuvent également intervenir dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, de modifications post transcriptionnelles, d'ubiquitination, dans le

transport du sodium, dans l'activité synaptique et plus largement dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

### **I - 3. Altérations de la synapse et déficience intellectuelle**

La communication entre les cellules cérébrales est assurée au niveau de complexes réseaux neuronaux par de très spécifiques éléments discontinus nommés synapses. Une modification du potentiel électrique membranaire conduit la cellule en amont (présynaptique) à libérer par exocytose des vésicules contenant des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. La cellule présynaptique traduit donc des signaux électriques en signaux chimiques par l'intermédiaire des vésicules. Le neurotransmetteur diffuse librement et rapidement dans l'espace intersynaptique puis se lie à des récepteurs spécifiques concentrés au niveau de sites hautement spécialisés de la membrane de la cellule postsynaptique. Cette interaction transitoire neurotransmetteur – récepteur provoque un changement du potentiel membranaire électrique de la cellule postsynaptique. La cellule postsynaptique convertit ainsi des signaux chimiques en signaux électriques grâce à ces récepteurs.

Dans le cas particulier des cellules postsynaptiques excitatrices (glutamatergiques), ces dernières reçoivent la plupart de l'information par l'intermédiaire d'une myriade de sites extrêmement spécialisés nommés épines dendritiques localisées tout au long de leur arbre dendritique.

A l'exception des facteurs de transcription et de remodelage de la chromatine, il est intéressant de souligner que plus de 50% des gènes associés à la déficience intellectuelle codent pour des protéines pré et/ou postsynaptiques<sup>43</sup>. L'intérêt particulier alloué par ces recherches aux protéines synaptiques contribue à biaiser ces données, ainsi désormais l'utilisation de technologies de « *whole exome sequencing* » révélera probablement des gènes inattendus, ou non considérés auparavant, pourvus de mutations chez des patients atteints de déficience intellectuelle non syndromique. Les déficits d'apprentissage sont une caractéristique fréquente chez les individus souffrant de déficience intellectuelle non syndromique, il est ainsi tentant d'attribuer ces traits comportementaux à l'altération de la fonction et/ou de la morphologie synaptique. Des mutations dans ces protéines peuvent affecter le nombre mais aussi la spécificité des synapses résultant en la formation de circuits synaptiques hyper ou hypo

connectés répondant anormalement à l'activité cérébrale<sup>72,73</sup>. Autrement dit, la perturbation du développement et/ou de la formation des réseaux synaptiques conduit à la fonction inadaptée de circuits cérébraux entravant le transfert approprié de l'information. Cette hypothèse est supportée par des données histologiques. L'analyse morphologique *post mortem* de cerveaux de patients atteints de déficience intellectuelle a révélé des modifications dans la forme et la densité des épines dendritiques des neurones glutamatergiques excitateurs<sup>74-76</sup>.

Considérons de nouveau les exemples cités précédemment des syndromes de Fragile X, de Rett et de la sclérose tubéreuse pour lesquels des altérations synaptiques ont été associées à la déficience intellectuelle.

Causée par l'expansion dynamique de triplets CGG dans la région 5' non transcrite du gène *FMRI*, la mutation induit la méthylation de la région promotrice aboutissant à la répression de la production de l'ARN messager de *FMRI*<sup>77,78</sup>. Il faut noter que la synthèse de la protéine FMRP est dépendante de l'activation de mGluR1/5<sup>79</sup> (*metabotropic glutamatergic receptor 1/5*)<sup>80</sup>, *id est* l'activité synaptique excitatrice glutamatergique promeut la production de FMRP1. Beaucoup d'ARN messagers interagissant avec la protéine FMRP1 restent à découvrir, néanmoins parmi les cibles identifiées mentionnons les acteurs synaptiques Arc (*activity regulated cytoskeleton associated protein*), CamKII $\alpha$  (*calcium/calmodulin dependent protein kinase*), eEF1A (*elongation factor 1a*), GluR1/2 (*AMPA glutamate receptor subunit 1/2*), SAPAP (*SAP90/PSD95 associated proteins*), RGS5 (*regulator of G protein signaling 5*), APP (*amyloid  $\beta$  (A4) precursor protein*), MAP1B (*microtubule associated protein 1B*), PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) ou encore Sema3F (*semaphorin 3F*)<sup>81</sup>. Ainsi FMRP1 joue un important rôle dans la fonction de la synapse à travers la régulation du transport des ARN messagers et l'inhibition de la synthèse locale de protéines synaptiques. Par ailleurs des études *in vivo* réalisées sur un modèle murin *knockout* pour *FMRI* ont révélé diverses altérations de la morphologie et de la fonction synaptique excitatrice<sup>82</sup>. De sévères déficits dans la transmission synaptique inhibitrice soulignent qu'en parallèle le réseau GABAergique est affecté par le *knock out* de *Fmr1* chez la souris<sup>83</sup>.

MeCP2 se lie sur les paires de dimères CpG méthylés de régions promotrices de l'ADN, recrutant notamment les déacétylases d'histones HDAC1 et HDAC2 ce qui aboutit à la condensation de la chromatine et à la répression de la transcription. Les régions promotrices

des gènes codant pour BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), Crh (*cortico releasing hormon*)<sup>84</sup>, *RELN (reelin)* ou *GAD1 (glutamic acid decarboxylase 1)*<sup>85</sup> sont des exemples de cibles nucléotidiques pour la protéine MeCP2. Des mutations dans *MECP2* entraînent une diminution de l'expression de mGluR5 (*metabotropic glutamate receptor 5*)<sup>86</sup>, renforçant la diversité des cibles nucléaires de MeCP2 et soulignant son implication dans le contrôle de l'activité synaptique. Pour preuve le BDNF participe activement dans le développement neuronal ainsi que dans la formation et la maturation des épines dendritiques au cours des stades post-nataux<sup>87</sup>. Ainsi une densité réduite et une morphologie atypique des épines dendritiques des neurones pyramidaux glutamatergiques excitateurs ont été reportées chez des individus affectés du syndrome de Rett<sup>88,89</sup>. Les modèles murins du syndrome de Rett récapitulent les problèmes anatomiques et fonctionnels de la synapse aussi bien que les troubles comportementaux associés à ces mutations chez l'être humain<sup>90,91</sup>. Pour preuve, le retrait de *MECP2* spécifiquement au sein des interneurons GABAergiques (cellules cérébrales inhibitrices) récapitule de nombreux phénotypes caractéristiques de l'autisme, du syndrome de Rett notamment les comportements répétitifs et compulsifs<sup>92</sup>.

La sclérose tubéreuse est un trouble génétique autosomique récessif affectant 1 individu sur 6000<sup>93</sup>. 80% des personnes atteintes, développent des complications neurologiques telles que l'épilepsie, des troubles cognitifs et comportementaux<sup>94</sup> ainsi que l'autisme<sup>95</sup>. La sclérose tubéreuse résulte de mutations inactivatrices dans le gène *TSC1 (tuberous sclerosis 1)* codant pour l'hamartine<sup>96</sup> ou dans *TSC2 (tuberous sclerosis 2)* codant pour la tubérine<sup>97</sup>. Ces protéines se lient formant un hétérodimère capable d'inhiber la petite protéine Rheb, protéine essentielle et primordiale à l'activation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*)<sup>98</sup>. Par conséquent des mutations apparaissant dans l'un de ces deux gènes résultent toutes en l'augmentation de l'activité de mTOR. Une étude réalisée il y a une dizaine d'année a montré que ces mutations provoquent des défauts dans la fonction de la synapse<sup>99</sup>. Des modèles murins ont également permis de confirmer l'association de mutations dans les gènes *TSC1* et *TSC2* avec des défauts de la synapse et des troubles cognitifs et du comportement<sup>100,101</sup>. En particulier les phénotypes épileptiques et autistiques observés chez la souris modélisant la sclérose tubéreuse, peuvent être expliqués par les altérations au niveau de la synapse inhibitrice<sup>102</sup>. Nous insisterons sur quelques déficits syndromiques conséquents à l'atteinte du réseau neuronal inhibiteur au point III – 5.



## II - L'haploinsuffisance de *SYNGAP1*

La plupart des gènes associés à la déficience intellectuelle non syndromique sont localisés sur le chromosome X ou sont autosomiques récessifs, tandis que peu présentent une transmission autosomique dominante. Une hypothèse a été formulée selon laquelle les mutations *de novo* dans les gènes autosomiques impliqués dans la plasticité synaptique sont à l'origine de nombreux cas de déficience intellectuelle non syndromique. La découverte de variants génétiques au sein des séquences génomiques de *SHANK3*, *SATB2*, *SLC2A1* ou encore *SYNGAP1* chez des individus affectés soutient ce postulat<sup>68,71,103</sup>. En effet l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* est une cause commune (en moyenne 3 à 4% des individus au sein d'une cohorte) de déficience intellectuelle non-syndromique et d'épilepsie chez l'être humain<sup>42</sup>.

### II - 1. SYNGAP1

Dans le but d'authentifier de nouveaux partenaires interagissant avec les domaines PDZ (*post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)*, and *zonula occludens 1 protein (zo-1)*) des protéines synaptiques PSD95 et SAP102, Kim et ses collaborateurs ont permis l'identification de SYNGAP1 (*synaptic rat sarcoma guanosine triphosphatase activating protein 1*)<sup>104</sup>. Quelques mois plus tard dans des cultures dissociées de neurones embryonnaires de rat, Chen et ses collaborateurs ont identifié SYNGAP1 parmi d'autres protéines du complexe post-synaptique PSD (*postsynaptic density*) étant phosphorylées par CamKII<sup>105</sup>. SYNGAP1 est une protéine principalement exprimée dans le cerveau<sup>106</sup>, exclusivement dans les neurones où elle représente 1 à 2% des protéines du complexe post-synaptique PSD<sup>105</sup>.

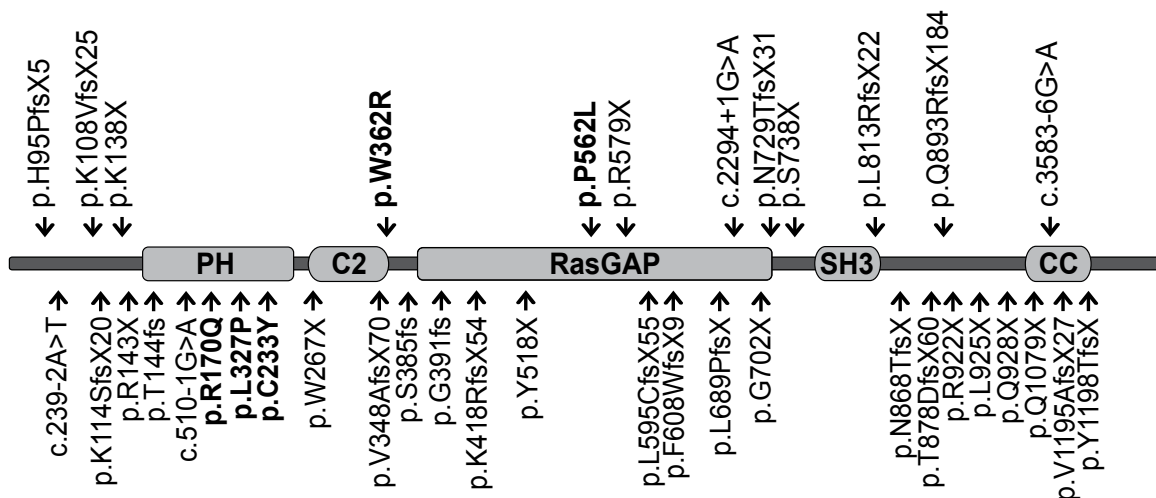
## II - 1.1. Structure de SYNGAP1

La séquence génétique de SYNGAP1 (*Gene ID 8831*) est connue chez de nombreuses espèces animales des batraciens aux mammifères en passant par les poissons. Chez l'être humain, ce gène nommé également *RASAI*, *RASA5* ou *MRD5* couvre 33619 paires de bases sur le bras court du chromosome 6 et comprend 19 exons (*NCBI reference sequence: NG\_016137.1*). La transcription de la séquence génomique de *SYNGAP1* mène à un ARN messager de 6001 paires de bases (*NCBI reference sequence: NM\_006772.2*).

L'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine SYNGAP1 indique qu'elle possède une masse moléculaire de 150 kDa et qu'elle est formée de plusieurs domaines fonctionnels. En parcourant les 1343 acides aminés de SYNGAP1, de sa partie N-terminale à sa partie C-terminale, la protéine contient:

- Une région PH (*pleckstrin homology*; position 150 à 251) permettant son éventuelle liaison à des phospholipides et son recrutement à la face intracellulaire de la membrane plasmique de la cellule
- Un domaine C2 (position 263 à 362) sensible au calcium et essentiel pour son activité<sup>107</sup>
- Un domaine RasGAP (*rat sarcoma guanosine triphosphatase activating protein*; position 392 à 729) permettant son interaction avec les petites protéines Ras et Rap<sup>107-109</sup>
- Un domaine SH3 (*sarcoma homology domain 3*; position 785 à 815) impliqué dans une probable liaison à des protéines riches en acide aminé proline
- Plusieurs potentiels sites de phosphorylation sur des sérine modulant son activité<sup>105,110-112</sup>
- Un domaine CC (*coiled coil*; position 1189 à 1262) essentiellement impliqué dans l'oligomérisation de protéines.

Il est à noter que les domaines PH, C2 et RasGAP de SYNGAP1 sont respectivement 23%, 33% et 47% identiques à ceux de la protéine p120RasGAP<sup>112</sup> (confère figure 1).



**Figure 1: Exemples de mutations dans le gène SYNGAP1 identifiées jusqu'à présent, chez des patients atteints de déficience intellectuelle non-syndromique.**

Les différents domaines fonctionnels (PH, C2, RasGAP, SH3, CC) de la protéine sont encadrés. Au dessus de la protéine, sont représentées les mutations découvertes par notre groupe. Les variants alléliques faux-sens sont représentés en gras.

## II - 1.2. Les isoformes de SYNGAP1

Les modifications de l'activité synaptique interviennent sur de nombreux mécanismes, la plupart aboutissant à la régulation de l'expression de protéines. Ce contrôle est notamment possible par l'utilisation de promoteurs alternatifs conduisant à la création de différents transcrits provenant d'un même locus, aussi bien que par l'épissage alternatif de l'ARN messenger produisant des isoformes protéiques de fonction distincte<sup>113,114</sup>.

L'analyse *in silico* permet de démontrer une grande similarité dans les séquences N terminales des isoformes de SYNGAP1 chez l'être humain, la souris et le rat (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>). L'existence de plusieurs sites pour l'initiation de la transcription de SYNGAP1 aboutit à la création de divers isoformes N terminaux. Initialement

un premier variant débutant par la séquence en acide aminé MSYAPF a été référé comme l'isoforme SYNGAP1 A1<sup>105</sup>. Puis l'identification d'un promoteur alternatif en aval de ce premier, conduit à la découverte de SYNGAP1 A2 comportant 14 acides aminés additionnels dans sa queue N terminale et commençant par la séquence MSRSRA. Enfin d'autres sites d'initiation de la transcription permettent la production d'au moins deux autres isoformes N terminaux: SYNGAP1 B et SYNGAP1 C<sup>115</sup>. A noter qu'à la différence des autres isoformes, SYNGAP1 C ne possède pas le domaine PH<sup>115</sup>.

L'épissage alternatif de l'ARN messenger conduit à des variations dans la séquence protéique C terminale de SYNGAP1. En effet jusqu'à présent quatre isoformes C terminaux ont été décrits. Le mieux caractérisé est SYNGAP1  $\alpha$ 1 car sa séquence 3' terminale QTRV est requise dans l'interaction avec d'autres protéines du complexe postsynaptique PSD<sup>116,117</sup>,  $\alpha$ 2 se termine par la séquence TADH,  $\beta$  dont le motif N terminal est PRHG se lie à la CamKII et finalement  $\gamma$  finissant par LLIR<sup>118</sup>.

La diversité des isoformes de SYNGAP1 suggère que ces variants ont différentes fonctions. Il est aisé d'envisager que les variations de séquences dans la partie N terminale peuvent exister en association avec celles de la partie C terminale, même si l'existence *in vivo* de toutes ces combinaisons d'isoformes n'a pas été certifiée. Toutefois tous les éventuels arrangements N et C terminaux de SYNGAP1 ont été transfectés dans des cultures dissociées de neurones de souris. Des études électrophysiologiques subséquentes ont démontré que les isoformes A1 *versus* B ainsi que  $\alpha$ 1 *versus*  $\alpha$ 2 ont des effets opposés sur la communication synaptique. En particulier l'isoforme SYNGAP1 A $\alpha$ 1 diminue la transmission synaptique excitatrice, l'isoforme B $\alpha$ 2 l'augmente tandis que A $\alpha$ 2 n'a aucun effet<sup>115</sup>. Ainsi selon la partie C terminale exprimée, SYNGAP1 mène au renforcement ou à l'affaiblissement de la transmission synaptique excitatrice. Dans tous les cas la magnitude de l'effet est attribuée à l'identité de la portion N-terminale de la protéine. Par ailleurs il est nécessaire de mentionner que les niveaux d'expression de l'ARNm et des isoformes protéiques de SYNGAP1 dépendent de l'activité synaptique et varient en fonction de l'âge<sup>115,118</sup>, des aires cérébrales ou des types de cellules neuronales<sup>119</sup>.

## II - 2. Les mutations dans le gène SYNGAP1

De récentes études indiquent que les mutations *de novo* dans le gène *SYNGAP1* sont une cause fréquente de survenue de la déficience intellectuelle, présentes chez environ 3% des individus atteints de déficience intellectuelle non syndromique<sup>42,70,120</sup>.

### II - 2.1. Les mutations humaines pathogéniques dans *SYNGAP1*

Plusieurs types de mutations peuvent survenir dans la séquence du gène *SYNGAP1*. Des méthodes cytogénétiques ont permis de mettre au jour des variants hétérozygotes *de novo* de type translocation, duplication et délétion. Jusqu'à présent environ 50 mutations ont été recensées dans le gène *SYNGAP1*. Qu'elles soient tronquantes ou faux sens, toutes sont *de novo* à l'exception d'une seule qui est héritée<sup>42,68,71,109,120-128</sup>. De nombreuses microdélétions *de novo* du bras court du chromosome 6 ont récemment été identifiées chez des individus<sup>129-132</sup>. Parmi celles ci, la plus grande répertoriée sur le chromosome 6p21 couvre un segment d'environ 800 Kb et englobe environ 20 gènes<sup>129</sup>. Parmi ces 20 gènes, 12 sont connus comme exprimés dans le cerveau, classant ces séquences génomiques comme candidates potentielles à la survenue des déficits cognitifs chez cet individu. En se basant sur les données fonctionnelles, seuls quelques gènes parmi lesquels *GMR4* (*metabotropic glutamate receptor 4*), *DAXX* (*death domain associated protein*) ou *SYNGAP1* pourraient expliquer le phénotype du patient. Un autre exemple de délétion répertoriée sur le bras court du chromosome numéro 6 s'étend sur 50 Kb et comprend 4 gènes: *KIF1C* (*kinesin family member 1C*), *PHF1* (*plant homeodomain finger 1*), *CUTA* (*cutA divalent cation tolerance homolog*) et *SYNGAP1*<sup>132</sup>. L'haploinsuffisance des gènes *CUTA* et *PHF1* n'a pas encore été décrite et le rôle de *KIF1C* dans la survenue de troubles cognitifs n'a pas été clairement élucidé. Ainsi le phénotype constaté pourrait être spécifique à l'haploinsuffisance de *SYNGAP1*. D'autres microdélétions identifiées dans le gène *SYNGAP1* ne concernent que quelques nucléotides. Chez un jeune patient, une mutation *de novo* supprimant la séquence GAAG des bases azotées en position 321 à 324 aboutit au remplacement de l'acide aminé lysine en valine et à un décalage du cadre de lecture menant à la troncation de la séquence peptidique (c.321\_324delCAAG)<sup>120</sup>. Un autre

sujet présente une mutation *de novo* ponctuelle de type microdélétion dans laquelle la suppression d'une seule base azotée en position 2184 engendre l'apparition d'un codon stop prématuré altérant la séquence peptidique de SYNGAP1 (c.2184del)<sup>109</sup>. Aucune mutation délétère n'a été détectée chez les sujets ou les parents sains admis au sein de ces cohortes, illustrant la responsabilité probable des variations génétiques découvertes dans la séquence de *SYNGAP1* comme cause de la survenue de ces symptômes particuliers.

Chez une patiente danoise, le séquençage spécifique de l'intégralité des séquences génomiques codantes ainsi que des jonctions introniques du gène *SYNGAP1* a révélé l'existence d'une duplication d'une seule base conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré. Cette duplication a été également détectée sous forme mosaïque chez le père de cet enfant. Cette mutation héritée est la seule décrite à ce jour dans le gène *SYNGAP1*<sup>109</sup>.

L'utilisation de l'hybridation *in situ* par fluorescence a permis la découverte d'une translocation *de novo* d'un segment chromosomique chez un individu possédant le caryotype 46,XY,t(6;22)(p21.32;q11.21)<sup>133</sup>. Les points de rupture se situent sur le chromosome 6 entre les exons 5 et 6 du gène *SYNGAP1* et dans une région dépourvue de gène identifié, du chromosome numéro 22. Bien que la contribution de cette dernière région ne puisse pas être exclue, l'occurrence des mutations dans la séquence génomique de *SYNGAP1* suggère qu'il est la cause probable des symptômes observés chez ce patient.

Enfin plusieurs variants faux sens dans le gène *SYNGAP1* ont été découverts chez de jeunes individus. Ceux-ci consistent au remplacement d'une base azotée par une autre conduisant à une modification de la séquence et de la structure peptidique mais également à la perte de la fonction de la protéine<sup>109,125-127</sup> (Figure 1).

Plusieurs observations suggèrent que ces mutations *de novo* sont pathogéniques. Premièrement la plupart des mutations *de novo* décrites sont prédites pour tronquer la partie C terminale de *SYNGAP1*, connue pour son action synaptique. Pourtant, surprenamment les mécanismes par lesquelles les mutations *de novo* affectent la fonction de SYNGAP1 n'ont (ou plutôt n'avaient, confère le premier article présenté ci-dessous) jusqu'à lors jamais été explorées. Les résultats révèlent que les mutations *de novo* faux-sens (p.W362R, p.P562L) et tronquante (p.R579X) dans le gène *SYNGAP1* conduisent à la perte de fonction de la protéine. Troisièmement, la perte d'un unique allèle de *SYNGAP1* conduit à des phénotypes particuliers soulignant le caractère pathologique de telles mutations. Finalement, aucune mutation délétère dans le gène

*SYNGAP1* n'a été découverte chez les individus sains provenant des différentes cohortes. Toutefois même si jamais répertoriées jusqu'à présent, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse de l'existence de mutations dans *SYNGAP1* conférant un gain de fonction à la protéine.

## **II - 2.2. Les phénotypes associés à l'haploinsuffisance de SYNGAP1**

L'examen clinique des patients recrutés possédant des mutations *de novo* dans le gène *SYNGAP1* révèle une déficience intellectuelle modérée à sévère chez tous les individus, associée à une microcéphalie pour certains d'entre eux. De plus environ deux tiers des enfants souffrent d'épilepsie caractérisée par une hyperactivité (activité épileptiforme) des régions occipitales survenant avant l'âge de 3 ans. Les crises myocloniques, tonique-cloniques ou les absences sont également des traits communs aux individus haploinsuffisants pour *SYNGAP1*. Bien que la plupart de ces épilepsies soient contrôlées par la prise de topiramate ou d'acide valproïque, certains patients restent pourtant réfractaires à cette médication. Approximativement un quart d'entre eux est également diagnostiqué pour autisme. D'autres perturbations cognitives telles que l'inattention, l'impulsivité, l'agressivité, des troubles prononcés de langage complètent le spectre hétérogène des phénotypes liés aux mutations dans la séquence de *SYNGAP1*<sup>42,103,109</sup>.

## **II - 3. Voies intracellulaires associées à SYNGAP1**

*SYNGAP1* est exprimé abondamment et de façon homogène dans diverses régions cérébrales notamment dans le cortex et l'hippocampe<sup>106,119,134</sup>. Au niveau cellulaire, de nombreuses études précisent la localisation de *SYNGAP1* à la face intracellulaire de la membrane plasmique des neurones excitateurs au niveau de sites très spécifiques: les épines dendritiques<sup>104,105,116</sup>. Même si controversés, d'autres travaux attestent de la présence de

SYNGAP1 dans certains types de neurones inhibiteurs<sup>119,135-137</sup>. L'éclaircissement de ce litige et l'investigation de l'éventuelle implication de SYNGAP1 chez les cellules neuronales GABAergiques inhibitrices semblent donc essentiels. Alors, il est tentant d'élucider cette controverse.

Une fonction importante et primordiale du cerveau est d'assurer l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition. La transmission de l'excitation dans le cerveau mammalien est principalement assurée par les récepteurs AMPA (*α amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazoleprionic acid*) et NMDA (*N methyl D aspartic*). Dans des conditions d'activité basale, les récepteurs AMPA assurent un influx ionique calcique et/ou sodique et/ou potassique. La concentration de ces récepteurs à la membrane plasmique est sujette à une régulation permanente permettant aux neurones d'ajuster rapidement l'influx ionique et la force synaptique en réponse aux changements dans l'activité du réseau neuronale. Au contraire les récepteurs NMDA sont restreints dans leurs habiletés à laisser passer l'influx ionique calcique et/ou sodique du fait de l'obstruction de ce canal par l'ion magnésium. Ainsi, la présence de ce dernier entrave la participation du récepteur-canal NMDA à la transmission synaptique au potentiel de membrane normal/basal. Or sous condition dépolarisante, cet ion est libéré autorisant l'activation des récepteurs NMDA. La subséquente augmentation intracellulaire en ion calcium est un évènement fondamental et primordial à la régulation de la transmission synaptique. Les récepteurs NMDA sont des complexes tétramériques composés d'autant de sous-unités GluN1 que GluN2. Dans l'hippocampe et le cortex adulte, les sous-unités GluN2A et GluN2B sont prédominantes et confèrent différentes propriétés pharmacologiques au canal hétérodimérique<sup>138</sup>. Il est intéressant de mentionner que la surexpression de la sous-unité GluN2B inhibe l'expression de la sous-unité GluA1 (sous unité des récepteurs AMPA) à la surface des neurones matures, alors que les antagonistes spécifiques à GluN2B en stimulent l'insertion<sup>139</sup>, assurant de la régulation constante des récepteurs AMPA en réponse à la stimulation des récepteurs NMDA et donc à l'activité synaptique.

Les stimuli induisant l'activation des récepteurs NMDA ont en effet pour finalité d'ajuster la concentration de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique des neurones excitateurs, un processus requis pour l'expression de la LTP (*long term potentiation*) autant que lors des phases d'apprentissage ou encore de mémorisation. Des études d'immunoprécipitation ont

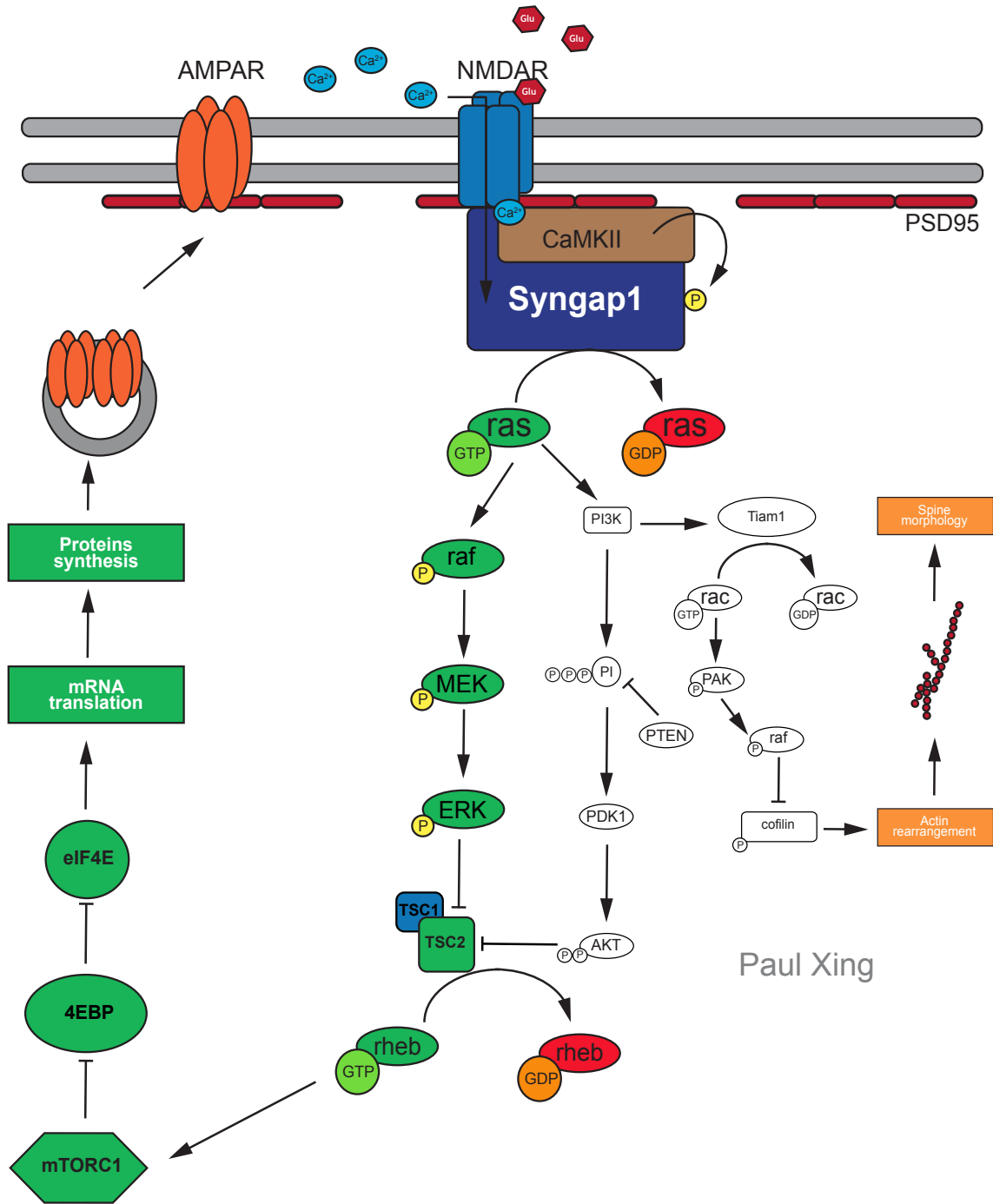


montré une forte et spécifique association de SYNGAP1 avec la sous unité GluN2B des récepteurs NMDA<sup>139</sup>. Sous condition dépolarisante, l'activation des récepteurs NMDA par la liaison du glutamate conduit à un influx d'ions calciques dans la cellule neuronale excitatrice, comme décrit précédemment. Dans des cultures neuronales hippocampiques, cet influx engendre entre autre l'activation de la CamKII (*calmodulin kinase II*). La stimulation de cette kinase recrute SYNGAP1 et provoque sa phosphorylation sur les sérine 1108 et 1138. En conséquence celles-ci maintiennent SYNGAP1 dans un haut état d'activation augmentant de 70 à 95% son activité de GTPase sur la petite GTPase Ras<sup>112,140,141</sup>, suggérant le rôle de SYNGAP1 à restreindre la durée pendant laquelle la petite GTPase Ras est active (confère figure 2). Le *knock-down* de SYNGAP1 dans des cultures hippocampales aussi bien que dans des neurones corticaux en culture conduit à l'activation et la phosphorylation soutenues de ERK et à l'inhibition de l'insertion de la sous unité GluA1 des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique des neurones excitateurs<sup>116,139</sup>, mettant en lumière l'importance de SYNGAP1 dans la régulation de la transmission synaptique excitatrice. Une étude plus récente a confirmé l'influence de SYNGAP1 dans la contribution synaptique des sous unités GluA1 des récepteurs AMPA à travers la voie intracellulaire impliquant ERK<sup>142</sup>. Ces mêmes auteurs ont révélé la présence de Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) et mTOR (*mammalian target of rapamycin*) comme acteurs intracellulaires dépendant de l'action de SYNGAP1<sup>142</sup> (confère figure 2). En effet, ERK peut activer Rheb lequel active mTOR. Par ailleurs l'inhibition de la fonction de mTOR limite l'insertion des récepteurs AMPA dans les réseaux neuronaux en développement. L'ensemble de ces études suggère que SYNGAP1 agit en aval de GluN2B pour restreindre l'activation de la voie intracellulaire spécifique à Ras, ERK, Rheb et mTOR, pS6 limitant l'insertion synaptique de la sous unité GluA1<sup>142,143</sup>. Ceci nous enseigne que SYNGAP1 joue un rôle de répresseur dans le développement de la transmission synaptique excitatrice.

SYNGAP1 est également impliqué dans les voies intracellulaires sous tendant le remodelage du cytosquelette d'actine et donc de la morphologie de l'épine dendritique. La stimulation des récepteurs NMDA provoque l'activité GTPase de Tiam1 (*T cell lymphoma invasion and metastasis 1*) sur Rac<sup>144</sup>. En effet il a été démontré que RasGTP peut se lier physiquement à Tiam1 afin de permettre à ce dernier d'exercer sa fonction GTPase sur Rac<sup>145</sup>. Alternativement RasGTP peut mener à l'activation de la PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*) elle

même connue pour stimuler des RacGEF telles Tiam1 et Kalirin7<sup>146,147</sup>. Suite à l'activation de Tiam1 la cascade de phosphorylation sur des protéines kinases comme PAK3 (*p21 activated kinase 3*) et LIMK (*lin11 isl1 mec3 kinase*) conduit à la phosphorylation de la cofiline, inhibant sa fonction essentielle liée au remodelage de l'architecture de l'actine<sup>148,149</sup> (confère figure 2). De plus, le *knock out* de SYNGAP1 dans des tranches hippocampales a révélé une augmentation de la petite protéine RacGTP, de PAK ainsi que de la cofiline phosphorylée<sup>116</sup>. De toutes ces études il résulte que Syngap1 agit en restreignant le nombre de récepteurs glutamatergiques fonctionnels de type AMPA à la membrane ainsi qu'en régulant l'activité des voies intracellulaires impliquées dans la morphogénèse du réseau d'actine assurant un impact sur la morphologie de la partie postsynaptique (confère figure 2).

Récemment le trafic permanent de SYNGAP1 au sein de l'épine dendritique a été mis en évidence. De mimer la dépolarisation synaptique artificiellement par l'addition de hautes concentrations en ions potassium dans des cultures primaires ou de tranches hippocampales, induit le retrait et le déplacement de SYNGAP1 du complexe PSD (*postsynaptic density complex*). Ce mouvement est un processus réversible<sup>150</sup>. Les sites d'interactions de SYNGAP1 avec les autres protéines du complexe PSD sont ainsi laissés vacants sous condition dépolarisante. Les protéines régulatrices du transport des récepteurs AMPA autre que notre protéine d'intérêt, pourraient ainsi interagir avec le complexe PSD. Ainsi il est envisageable que la redistribution de SYNGAP1 suite à son activation offre une fenêtre de temps pour un ajustement potentiel de la cellule neuronale à la transmission d'autres types de signaux synaptiques.



Paul Xing

**Figure 2: Vocation de SYNGAP1 dans la LTP dépendante des récepteurs NMDA.**

Au sein des neurones pyramidaux corticaux, SYNGAP1 inhibe la plasticité synaptique liée aux voies de signalisation en aval des récepteurs NMDA. Dans ce modèle, SYNGAP1 réprime l'activité des protéines Ras, MEK, ERK, Rheb et 4EBP aboutissant à réfréner l'insertion membranaire des récepteurs AMPA. L'action de SYNGAP1 sur Ras permet également la

régulation de la morphologie du cytosquelette d'actine et de la synapse *via* la restriction de la fonction des protéines PI3K, Tiam1 et Cofiline. Les flèches sont représentatives d'une stimulation; les flèches courbes d'une conversion; les autres d'une inhibition. Réalisation de Paul Xing.

## II - 4. Modèles murins d'haploinsuffisance de SYNGAP1

Les technologies de transfert génétique ont permis aux chercheurs de réaliser des modèles animaux dans le but d'étudier le développement, la survenue de maladies ou d'autres troubles cognitifs humains. Ainsi, désormais, il est possible de générer des souris transgéniques, des souris *knockout* et *knock-in* constitutives, ou des mutants conditionnels afin d'élucider les fonctions précises de gènes candidats impliqués dans le développement, la survenue de maladies ou de troubles cognitifs. Les mutants murins sont maintenant considérés comme un outil idéal dans le but de caractériser les mécanismes moléculaires des produits des gènes ainsi que pour l'étude de leurs interactions réciproques influençant les processus cellulaires à la base des systèmes physiologiques. Cette technique de transfert générant des souris génétiquement modifiées n'a de cesse de se perfectionner et est dorénavant utilisé dans de nombreux laboratoires autour du monde.

Chez la souris, SYNGAP1 (*Gene ID 240057*) est localisé sur le bras court du chromosome 17. Sa séquence génomique comprend 31026 acides désoxyribonucléotiques, 25 exons, son ARNm présente 5859 ribonucléotides et code pour une protéine de 1341 acides aminés.

### II - 4.1. Les mutants *Syngap1* constitutifs (*germline knockout mice*)

Les techniques de transfert génétique ont permis la délétion d'un allèle du gène SYNGAP1 afin d'en élucider les rôles physiologiques *in vivo*. En retirant les exons 8, 9 et 10 du gène qui code pour les domaines C2 et RasGAP de la protéine, l'équipe du Pr Seth Grant a généré la première souris transgénique *Syngap1* knockout constitutive<sup>151</sup>. Chez ces mutants hétérozygotes *Syngap1*, le niveau d'expression hippocampale de la protéine SYNGAP1 est

réduit de 50% en comparaison de leurs congénères contrôles. D'autre part, l'utilisation d'un anticorps N-terminal sur des extraits hippocampaux ne révèle aucun produit protéique résiduel<sup>151</sup> assurant de l'ablation de moitié de la production de la protéine. Les souris femelles et mâles *Syngap1*<sup>+/-</sup> sont fertiles et ne présentent aucun signe apparent de dysmorphie. Le génotypage à la naissance des individus résultant des croisements entre des souris *Syngap1* hétérozygotes (*Syngap1*<sup>+/-</sup>) dévoile une transmission mendélienne de la mutation et ne divulgue aucune létalité embryonnaire. Tous les nouveaux-nés *Syngap1* homozygotes (*Syngap1*<sup>-/-</sup>) se nourrissent, respirent normalement dans les premières heures; néanmoins tous meurent dès l'âge de deux jours, soulignant l'importance de SYNGAP1 dans le développement et la viabilité postnatales.

Afin d'affiner nos connaissances du rôle de la protéine SYNGAP1 une deuxième souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> a été générée. L'exon 7 contenant la première méthionine présente dans le plus court des isoformes de SYNGAP1 ainsi que l'exon 8 codant pour une partie du domaine C2 de la protéine ont été soustraits. De plus, la délétion de cette séquence d'ADN est prédite pour aboutir à la production de transcrits pourvus d'un codon stop prématuré<sup>152</sup>. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la partie GAP de la protéine révèle l'abolition de la majorité de la production de la protéine chez les souris *Syngap1*<sup>-/-</sup>. Cependant des produits protéiques issus de sites *start* cryptiques ont pu être détectées chez cette même souris<sup>152</sup>. Selon les auteurs ces fragments protéiques représentent seulement 2% du niveau attendu de SYNGAP1 par rapport aux individus contrôles. Aucune mortalité embryonnaire ni d'anormale ségrégation du gène *Syngap1* n'ont été constatées. Les individus hétérozygotes et homozygotes sont indistincts des souris contrôles en terme de taille et de poids jusqu'au deuxième jour postnatal. Les sujets *Syngap1*<sup>-/-</sup> par la suite déclinent. Ne se nourrissant pas et ne grandissant pas normalement, ils meurent à l'âge de 5 à 7 jours postnataux<sup>152</sup>. Les individus *Syngap1*<sup>+/-</sup> sont quant à eux viables et fertiles.

Pour identifier les voies intracellulaires dérégulées en son absence, une troisième souris *Syngap1* transgénique a été générée. Pour cette souris les auteurs ont excisé la séquence génomique complète codante pour les exons 4 à 9 dans le gène SYNGAP1 éliminant ainsi tous les isoformes connus de la protéine<sup>117</sup>. Des cultures de neurones hippocampiques provenant d'embryons de souris mutantes *Syngap1*<sup>+/-</sup>, *Syngap1*<sup>-/-</sup> et *Syngap1*<sup>+/+</sup> ont montré que ces neurones possèdent les niveaux respectivement attendus de la protéine SYNGAP1. Les

neurones provenant d'embryons hétérozygotes expriment approximativement la moitié du niveau contrôle de SYNGAP1, alors que dans les cultures issues d'embryons homozygotes SYNGAP1 est indétectable<sup>117</sup>. Dans ce modèle murin, la mutation homozygote de *Syngap1* résulte également en un phénotype postnatal léthal. A la naissance les individus *Syngap1*<sup>-/-</sup> sont similaires en poids et en taille en comparaison à leur congénère contrôle puis présentent un arrêt de croissance dès le premier ou deuxième jour postnatal et meurent ensuite<sup>117</sup>.

Deux autres modèles murins d'haploinsuffisance de *Syngap1* ont été créés par l'exposition de cellules souches embryonnaires à des radiations. Dans ces deux cas la mutation induite est une délétion d'un fragment de près de 25 Mb localisé sur le chromosome 17 couvrant 138 et 139 gènes outre *Syngap1*<sup>153-155</sup>.

## II – 4.2. Les mutants *Syngap1* conditionnels

Depuis une vingtaine d'année l'émergence de la technologie de recombinaison de sites spécifiques (Cre, Dre, Flp) a permis le développement de modèles murins. Ces méthodes rendent possible la modification du génome des souris en réalisant par exemple des mutations de perte de fonction<sup>156</sup> pouvant être restreinte spatialement et/ou temporellement<sup>157,158</sup>. Ainsi la fonction de gènes peut être perturbée lors d'une étape développementale précise et particulière ou dans un tissu ou un type cellulaire spécifique et préalablement déterminé. Les maladies humaines survenant tardivement ou dans certains tissus (neurodégénérescence, cancer) peuvent être ainsi étudiées par ces modèles murins expérimentaux.

Trois lignées de souris mutantes conditionnelles *Syngap1* ont été générées dans le but d'inspecter les fonctions précises de ce gène dans différentes populations de cellules neuronales et à travers différentes étapes du développement. Une de ces lignées de souris *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> est pourvue de deux séquences loxP encadrant les exons 4 à 9 des deux allèles de la séquence génomique de *Syngap1*<sup>117</sup>. L'excision par la recombinase CRE de la séquence contenue entre les sites loxP aboutit à l'élimination de la production de tous les isoformes de SYNGAP1<sup>117,134,136</sup>. Dans le but de confirmer l'efficacité de la recombinaison par CRE, les souris *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> ont reçu une injection stéréotaxique intra-hippocampale d'adénovirus AAV-EGFP ou AAV-Cre-EGFP. Les analyses histologiques de sections hippocampiques ont

révélé une réduction significative de l'immunoréactivité pour SYNGAP1 chez les souris injectées avec les particules virales AAV-Cre-EGFP comparé à celles injectées avec AAV-EGFP<sup>136</sup>.

La deuxième lignée de mutant conditionnel *Syngap1*<sup>flox/flox</sup> a été générée sur la même base que la souris mutante de Kim *et al.*, permettant ainsi de mimer le mutant constitutif *Syngap1*<sup>+/-</sup><sup>159</sup>. Le premier site loxP est localisé entre les exons 5 et 6 (intron 5) de la séquence génomique murine de SYNGAP1; le second se situe dans l'intron 7. Afin de confirmer l'efficace recombinaison, des particules virales AAV8-Synapsin-iCre-Venus ou bien AAV8-Synapsin-Venus ont été transfectées dans des cultures neuronales provenant de souris *Syngap1*<sup>flox/+</sup>. La réalisation d'*immunoblot* sur ces cultures a montré que l'expression de la recombinaison CRE réduit significativement la quantité de protéine SYNGAP1 dans les neurones en culture issus de souris *Syngap1*<sup>flox/+</sup><sup>159</sup>.

La troisième lignée de souris *Syngap1* conditionnelle, *Syngap1*<sup>flox-stop-flox/+</sup> permet de rétablir l'expression de la protéine sous le contrôle de la recombinaison CRE<sup>159</sup>. Un exon artificiel loxP-Stop-loxP a été intégré immédiatement en aval de l'exon 5 du gène murin *Syngap1*. Cette cassette entrave l'expression de la protéine SYNGAP1 mimant ainsi les souris *Syngap1* constitutives. La présence de la recombinaison CRE permet l'excision subséquente des codons Stop, assurant ainsi la restauration de l'expression de la protéine SYNGAP1. En effet dans des cultures cellulaires issues de souris *Syngap1*<sup>flox-stop-flox/+</sup>, l'expression de la recombinaison CRE augmente significativement la production de la protéine SYNGAP1<sup>159</sup>.

Ces modèles murins conduisant à l'haploinsuffisance de SYNGAP1 ont été largement utilisés par de nombreux laboratoires dans le but de perfectionner notre connaissance des rôles possibles de ce gène.

## II - 5. Rôles de SYNGAP1

De nombreuses études ont démontré que les stimuli qui élicitent la potentialisation à long terme (LTP) dépendante des récepteurs NMDA, un corrélat cellulaire de l'apprentissage et de la mémorisation résultent en l'insertion des récepteurs AMPA à la membrane des neurones postsynaptiques<sup>160,161</sup>. Ces études mènent à penser que le trafic et/ou la concentration

des récepteurs AMPA à la surface des neurones postsynaptiques sont des phénomènes extrêmement régulés, constamment ajustés et par cela extraordinairement dynamiques. Il est envisageable que le nombre de récepteurs AMPA à la synapse soit le déterminant principal du poids ou de la force de la synapse. Ainsi les molécules et les voies intracellulaires qui réglementent le trafic des récepteurs AMPA, affectent probablement la LTP et peuvent notamment être des effecteurs clés dans la plasticité des circuits neuronaux et dans le stockage de l'information.

## II - 5.1. Au cours du développement des circuits cérébraux

### II - 5.1.1. SYNGAP1 au fil du temps

De prime abord notons que la souris *Syngap1*<sup>+/-151</sup> possède un motif IRES (*internal ribosomal entry site*) localisé en amont du gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase inséré dans le locus de *Syngap1*. La traduction en protéine ne devrait pas être affectée par les séquences régulatrices non-transcrites situées en 5' et en 3' de l'ARN messager de *Syngap1* et l'expression de la X-Gal semble plus refléter la présence de l'ARN messager de *Syngap1* préférentiellement à celle de la protéine.

L'expression de SYNGAP1 débute dès les premiers stades du développement. La récolte d'embryons à l'âge embryonnaire 8.5 (E8.5) provenant de croisements entre souris *Syngap1*<sup>+/-151</sup> a dévoilé la détection de SYNGAP1 dans le tube neural, les somites, le cœur, les primordium des membres; à E10.5, SYNGAP1 est observé dans le prosencéphale, le mésencéphale aussi bien que le télencéphale; à E14.5 SYNGAP1 est présent dans le cortex, les ganglions de la base et le thalamus<sup>106</sup>. L'expression relativement précoce de SYNGAP1 a été confirmée par l'analyse de ses transcrits (ARN messager) pouvant être détectés dans des extraits cérébraux dès E15<sup>159</sup>. A E16.5 SYNGAP1 est retrouvé dans l'hippocampe et l'hypothalamus<sup>106</sup>. L'expression du galactoside a permis de certifier que dans le cortex le niveau de l'ARN messager de *Syngap1* est à son apogée au cours de la deuxième semaine postnatale puis décroît au cours de l'âge adulte<sup>106</sup>.



Au niveau cortical, l'expression de l'ARN messager de *Syngap1* apparaît localisé dans les neurones. A PND0 (naissance, *post natal day 0*), les zones sous-ventriculaires, ventriculaires, intermédiaires et les couches plus superficielles du cortex cérébral ne présentent pas ou une expression minimale de SYNGAP1. A PND4 le marquage X-Gal est détecté clairement dans les couches granulaire et supragranulaire du cortex alors que peu se retrouve au niveau de la couche infragranulaire. Durant la deuxième semaine postnatale, SYNGAP1, présent à travers le cortex notamment dans la couche IV est à l'apogée de sa production. A PND35, la densité des cellules marquées a diminué et chez la souris adulte, SYNGAP1 est exprimé spécifiquement dans les couches corticales II et IV<sup>162</sup>.

Des sections coronales de cerveaux de souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> 151 ont permis d'examiner le patron d'expression de cette protéine dans le développement de structures propres à l'hippocampe. SYNGAP1 est observé à PND4 dans les couches CA1, CA2 et CA3 ainsi que dans le gyrus dentelé puis dans toutes les structures de l'hippocampe à PND7. Dans les régions du prosencéphale et du diencephale, un pic d'expression est constaté dans la deuxième semaine postnatale pour décliner au fur et à mesure avec l'âge. Spécifiquement, au sein du diencephale, SYNGAP1 est produit faiblement dans les neurones du thalamus dorsal, du noyau caudé, du putamen et du bulbe olfactif à PND0 puis sa production s'intensifie dans la période PND7 – PND14, pour ensuite décroître au fil des années<sup>106</sup>.

Au niveau cellulaire, la présence de la X-Gal n'a pas été détectée dans la matière blanche cérébrale des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> suggérant l'absence de cette protéine dans les oligodendrocytes. Par ailleurs, un double immuno-marquage avec la GFAP n'a révélé aucune expression de SYNGAP1 dans les astrocytes<sup>136,162</sup>. Outre les nombreuses évidences confirmant la production de SYNGAP1 par les cellules neuronales excitatrices corticales, plusieurs études ont rapporté sa localisation dans certains types d'interneurones inhibiteurs GABAergiques dans des structures corticales et hippocampiques telles que le stratum oriens ou le stratum radiatum<sup>119,135,137</sup>. Pour autant, les nombreux travaux subséquents se sont focalisés sur le rôle de SYNGAP1 au sein des cellules excitatrices glutamatergiques, omettant et dépréciant son importance pour les cellules GABAergiques inhibitrices. Ce différend est éclairci par les résultats présentés dans le second article adjoint certifiant et clarifiant le rôle primordial de cette protéine au sein de cellules inhibitrices GABAergiques

Ainsi l'expression de SYNGAP1 est un processus dynamique impliqué dans diverses étapes et processus du développement cérébral dont l'apogée dans la deuxième semaine postnatale suggère une potentielle participation dans la synaptogenèse et la dendritogenèse.

## II - 5.1.2. Dans la synaptogenèse

Au stade précoce du développement, un très grand nombre de synapses ne possèdent pas encore la capacité de transmettre l'information neuronale au potentiel membranaire de repos et sont conservées « en réserve », attendant qu'un potentiel stimulus les sélectionne puis les renforce. Ces synapses sont dites silencieuses *id est* encore inefficaces dans certaine condition à la neurotransmission. Une synapse silencieuse se définit comme une synapse dépourvue d'EPSCs (*excitatory postsynaptic currents*) dans des conditions basales mais pouvant transmettre l'information lors de conditions dépolarisantes. Les synapses silencieuses reflètent la présence fonctionnelle des récepteurs NMDA et la carence en récepteurs AMPA. En effet, seuls les récepteurs AMPA peuvent être activés au potentiel membranaire de repos. Graduellement au cours du développement, l'activité synaptique « sélectionne » quelques synapses silencieuses qui acquièrent des récepteurs AMPA fonctionnels entraînant une augmentation de, et une facilitation dans l'excitation des circuits neuronaux. Chez les rongeurs ces événements se déroulent au cours des deux premières semaines postnatales. De façon intéressante, l'augmentation du ratio récepteurs AMPA / récepteurs NMDA est inversement proportionnelle à la capacité de l'expression de la plasticité synaptique<sup>163</sup> et reflète la conversion de synapses silencieuses en synapses matures. Depuis la découverte de ce phénomène d'*unsilencing* des synapses de l'hippocampe, de tels processus ont été décrits à travers différents réseaux neuronaux: les synapses thalamo-corticales, rétino-colliculaire, au niveau des cellules granulaires du cervelet ou encore des cellules pyramidales de la couche VI du cortex visuel<sup>164-167</sup>.

Plusieurs observations ont révélé la survenue précoce de ce processus d'*unsilencing* de la synapse chez la souris *Syngap1*<sup>-/-</sup> en comparaison de leurs congénères contrôles. Bien que les souris *Syngap1*<sup>-/-</sup> meurent avant que les synapses glutamatergiques ne soient fonctionnelles<sup>166,168,169</sup>, il est toutefois possible de réaliser des cultures de neurones hippocampiques et corticaux issus d'embryons mutants homozygotes afin d'élucider le rôle de

SYNGAP1 dans le processus de synaptogenèse<sup>117,152</sup>. Dans les cultures provenant d'embryons de souris *Syngap1*<sup>-/-</sup>, la colocalisation ou la proximité nanométrique des protéines synapsine (marqueur présynaptique) et PSD95 (marqueur postsynaptique) révèlent que les protrusions postsynaptiques sont associées à des terminaisons présynaptiques<sup>117</sup>. Par ailleurs, la surface occupée par les *punctae* marquées par l'anticorps anti-synapsine ne diffèrent pas entre les génotypes des neurones en culture<sup>117,152</sup>. Ainsi SYNGAP1 ne joue pas de rôle dans la formation de la synapse glutamatergique. L'excitabilité axonale autant que la libération de neurotransmetteurs n'étant pas affectées par l'haploinsuffisance de SYNGAP1<sup>137</sup>, ceci légitime l'hypothèse selon laquelle le *knockout* de SYNGAP1 n'altère pas la partie présynaptique. Une étude réalisée sur des neurones embryonnaires hippocampiques *Syngap1*<sup>-/-</sup> après 10 ou 21 jours de culture a démontré une augmentation de l'immuno-réactivité des sous unités NR1 (NMDAR), GluR1 (AMPA) et de la protéine PSD95 au niveau des protrusions (épines) dendritiques en comparaison de cultures de neurones issus d'embryons contrôles<sup>117</sup>. De même, les neurones corticaux pyramidaux *Syngap1*<sup>-/-</sup> en culture possèdent significativement plus de récepteurs AMPA que les neurones *Syngap1*<sup>+/-</sup> et *Syngap1*<sup>+/+</sup> illustrant la diminution du nombre de synapse silencieuse<sup>152</sup>, corroborant l'acquisition précoce de synapses matures et fonctionnelles chez les mutants. En accord avec ces observations, le gain de fonction de SYNGAP1 *via* sa surexpression résulte en une réduction significative de l'expression et de l'insertion des récepteurs AMPA à la surface des neurones corticaux en culture alors que son *knockout* engendre l'effet opposé<sup>116</sup>.

*Ex vivo*, des données électrophysiologiques ont permis de déterminer que le ratio récepteurs AMPA / récepteurs NMDA augmente au cours de la première semaine postnatale chez les souris contrôles alors que chez leurs congénères *Syngap1*<sup>+/-</sup> ce ratio n'évolue pas pendant ce laps de temps. Dans des tranches thalamo-corticales issus de souris hétérozygotes une étude a constaté une augmentation progressive du ratio des récepteurs AMPA / NMDA dans les neurones excitateurs des couches II et III du cortex préfrontal chez les souris contrôles entre PND 8 et PND 9. Chez les mutants *Syngap1* cette augmentation a précédemment eue lieu (à PND 4) soulignant l'acquisition précoce des récepteurs AMPA dans les neurones corticaux déficients pour SYNGAP1<sup>170</sup>. Ces données corroborent celles obtenues *in vitro* par les groupes précédents<sup>117,152</sup>. Dans les neurones du gyrus dentelé issus de souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>, le ratio des récepteurs AMPA / récepteurs NMDAR est significativement augmenté par rapport à celui des

individus contrôles spécifiquement à PND 14 – PND 16<sup>159</sup>, indiquant que SYNGAP1 régule la maturation synaptique des neurones pyramidaux du cortex et de l'hippocampe durant une période spécifique du développement cérébral. Ainsi la maturation de la synapse est sensible et peut être vulnérable à des niveaux réduits d'expression de la protéine SYNGAP1. Ces données démontrent la formation trop précoce des connections neuronales excitatrices dans le cerveau en développement des souris mutantes *Syngap1*.

Au niveau morphologique, SYNGAP1 agit en restreignant le volume des épines dendritiques en développement. La largeur de la tête et la surface des protrusions le long de l'arbre dendritique des neurones pyramidaux hippocampaux sont significativement augmentés par le *knockout* de SYNGAP1 après 10 jours de culture *in vitro*. De même, sans en affecter le nombre, l'absence de SYNGAP1 provoque une augmentation de la largeur de la tête et de la surface des épines dendritiques des neurones excitateurs hippocampaux ayant mûri 21 jours en culture<sup>117</sup>. Plus précisément, *in vivo*, chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> à PND9 la structure des épines dendritiques des neurones hippocampiques est comparable à celle des souris contrôles, cependant à PND14 les épines acquièrent un phénotype mature qui persiste au cours du temps les différenciant de celles issues des souris contrôles<sup>140,159</sup>. Les neurones pyramidaux des couches I, II/III et V du cortex somatosensoriel des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> présentent également un élargissement précoce et persistant de la taille des épines dendritiques indiquant que ces dernières sont incorporées prématurément dans les circuits neuronaux en développement<sup>143</sup>. La densité des épines dendritiques chez les souris hétérozygotes juvéniles et adultes ne diffèrent pas de celle de leurs congénères contrôles supportant l'idée selon laquelle SYNGAP1 influence les processus développementaux soutenant les processus de maturation des connections hippocampales et corticales préférentiellement à ceux sous-tendant leurs formations.

### II - 5.1.3. Dans le développement du cortex

L'examen des souris homozygotes révèle une diminution significative de la taille du cerveau suggérant que SYNGAP1 peut être crucial pour la prolifération, le développement des tissus cérébraux après la naissance<sup>117,152</sup>. Récemment il a été démontré que les mutations de *Syngap1* induisent une maturation structurelle précoce des neurones pyramidaux de la couche V du cortex somatosensoriel. En effet une réduction prémature de la densité des filopodes,

précurseurs éventuels des épines dendritiques et une augmentation du taux de conversion des filopodes en épines dendritiques chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> en comparaison de leurs congénères contrôles<sup>143</sup>. Après le processus d'élagage, le pic de densité des protrusions et la densité synaptique finale sont atteints une semaine plus précocement chez les souris *Syngap1* hétérozygotes que leurs congénères contrôles<sup>143</sup>.

Des marqueurs spécifiques de différentes couches du cortex somatosensoriel ont été utilisés afin de déterminer le rôle possible de SYNGAP1 dans la lamination corticale. Les données immunohistochimiques ont révélé le développement normal du cortex somatosensoriel primaire chez les souris hétérozygotes en comparaison de celui des individus contrôles âgées de 5 à 7 jours postnataux, bien que chez les souris homozygotes une légère réduction de l'épaisseur affecte toutes les couches corticales<sup>162</sup>. Ces résultats démontrent un léger problème dans le développement des structures corticales somatosensorielles causée par l'haploinsuffisance de SYNGAP1.

Afin d'approfondir l'implication de SYNGAP1 dans le développement du cortex somatosensoriel primaire, la distribution des axones thalamocorticaux au niveau de la couche IV du cortex a été inspectée. Pour tous les génotypes ces axones ségrégent correctement dans cette couche spécifique. Les représentations corticales caractéristiques du museau, de la lèvre inférieure, des pattes arrière et avant ainsi que les représentations corticales visuelles et auditives sont également toutes identifiables ne suggérant aucun défaut majeur dans le développement de ces aires corticales. Pourtant au niveau du *barrel* cortex une ségrégation incorrecte et spécifique des axones thalamocorticaux accédant à la couche IV, aboutit à une mauvaise organisation du cortex somatosensoriel primaire représentatif des moustaches chez les souris *Syngap1*<sup>-/-</sup>, *Syngap1*<sup>+/-</sup> en comparaison de leurs congénères contrôles<sup>162</sup>. Ces résultats montrent l'importance de SYNGAP1 dans la régulation spécifique du développement du *barrel* cortex.

Par ailleurs l'inspection d'un potentiel impact des mutations de *Syngap1* sur la structure de neurones en développement a dévoilé que la surface autant que le volume occupés par l'arbre dendritique des neurones du gyrus dentelé sont réduits chez les jeunes (PND 16) mutants *Syngap1*<sup>+/-</sup><sup>159</sup>. *A contrario*, à PND 21, les neurones excitateurs de la couche V du cortex somatosensoriel des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> quant à eux présentent une augmentation de la longueur totale des neurites, une plus grande complexité de l'arbre dendritique et occupent un plus

grand volume comparé aux cellules contrôles du même âge<sup>143</sup>. Bien que ces résultats divergent selon la structure cérébrale étudiée, ceci suggère une maturation anormale de l'arborisation dendritique des cellules pyramidales issues des souris *Syngap1* hétérozygotes.

L'organisation des circuits intracorticaux à longue distance a été établie grâce à l'injection dans l'aire prélimbique du cortex médial préfrontal, du virus de la rage modifié et tagué avec la GFP (*green fluorescent protein*). Ce virus est endocyté par les terminaisons synaptiques et transporté de façon rétrograde permettant le marquage aisément identifiable de neurones distants. L'analyse régionale subséquente à l'injection a révélé que des zones corticales dont l'aire associative frontale et le cortex primaire somatosensoriel sont hypoconnectés chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> adulte<sup>143</sup>.

Au cours du développement cérébral, SYNGAP1 est également associé à l'apoptose neuronale<sup>134</sup>. En effet chez les mutants *Syngap1*<sup>-/-</sup>, dès l'âge embryonnaire E 18 un nombre anormalement élevé de neurones de l'hippocampe présentent des noyaux pycnotiques. A PND 1, l'activation de la caspase 3 (révélateur de l'apoptose) devient détectable dans les neurones du cortex et du cervelet et s'intensifie dans l'hippocampe des souris *Syngap1*<sup>-/-</sup><sup>134</sup> correspondant approximativement au moment où celles ci commencent à décliner physiquement puis meurent. Des marquages immunohistochimiques utilisant un anticorps anti doublecortine (marqueur endogène de neurones nouveaux-nés) révèlent une diminution de la densité des cellules neuronales hippocampiques néoformées chez des souris *Syngap1*<sup>flx/flx</sup> ayant reçu une injection de virus AAV-Cre-EGFP à l'âge de 8 à 10 semaines. Par ailleurs, l'induction de l'haploinsuffisance de SYNGAP1 dans les mutants conditionnels induit une augmentation du nombre de cellules co-exprimant la protéine doublecortine et la caspase 3<sup>136</sup> suggérant l'implication de SYNGAP1 dans la survie des neurones hippocampaux nouveaux-nés.

#### II - 5.1.4. Dans la transmission synaptique

Les caractéristiques morphologiques des neurones *Syngap1*<sup>-/-</sup> suggèrent qu'ils possèdent plus de synapses matures et fonctionnelles que les neurones *Syngap1*<sup>+/+</sup> en culture au même âge. Cette hypothèse a été testée en comparant certains paramètres électrophysiologiques. La fréquence aussi bien que l'amplitude des mini-EPSCs (*mini-*

*excitatory postsynaptic currents*) des neurones hippocampaux en culture issus d'embryons *Syngap1*<sup>-/-</sup> sont significativement augmentés par rapport aux neurones provenant d'embryons contrôles du même âge (10 jours *in vitro*)<sup>117</sup>. Cette donnée est confirmée lors du *knock down* spécifique de SYNGAP1 dans des cultures corticales primaires de neurones. D'autre part, sa surexpression a abouti à la diminution de l'amplitude et de la fréquence des mEPSC dépendant de l'activité des récepteurs AMPA, et ceci sans affecter leurs propriétés cinétiques (*decay time, rising time, resistance*)<sup>171</sup>. Ces résultats suggèrent que les synapses des neurones *Syngap1*<sup>-/-</sup> présentent des caractéristiques physiologiques précoces, révélatrices de synapses matures. Ces changements sont restreints aux récepteurs AMPA puisque les courants postsynaptiques médiés par les récepteurs NMDA ne sont pas altérés chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> jeune et adulte<sup>151,159</sup>. Les neurones du gyrus dentelé présentent également une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs, spécifiquement à l'âge PND 14 comparé aux souris *Syngap1*<sup>+/+</sup><sup>159</sup>, assurant de la responsabilité des récepteurs fonctionnels AMPA dans l'augmentation de la transmission synaptique. Cette amplification de l'excitation postsynaptique hippocampale est restreinte à cette précise fenêtre de temps du développement car l'analyse des courants excitateurs à PND 9 et à PND 21 ne révèlent aucune altération dans la transmission synaptique chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup><sup>159</sup>. De façon intéressante de tels déficits ne surviennent, dans le cortex préfrontal médial de cette même souris, qu'à l'âge adulte<sup>137</sup>. Ceci laissant entrevoir la possibilité de rôles distincts de SYNGAP1 au sein des diverses aires cérébrales et/ou au cours de différentes périodes du développement.

L'hyperexcitabilité du réseau neuronal chez les souris mutantes peut avoir diverses causes cellulaires, comme l'altération de la fonction de différents types d'interneurones GABAergiques corticaux. De façon intéressante, une élévation de la fréquence et de l'amplitude des mIPSCs enregistrés sur les neurones pyramidaux en développement du gyrus dentelé et du cortex préfrontal de souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> adultes a été constatée en comparaison de ceux enregistrés sur les souris *Syngap1*<sup>+/+</sup> du même âge<sup>159,137</sup>. Par ailleurs, il a été démontré une réduction de la fréquence des réponses à une injection de courant ainsi qu'une diminution de l'amplitude des mEPSC enregistrées sur les interneurones GABAergiques à parvalbumine de la couche II/III du cortex préfrontal des souris *Syngap1* hétérozygotes<sup>137</sup>. Pourtant les auteurs attribuent les bouleversements électrophysiologiques de certains interneurones GABAergiques à une réponse homéostatique compensatrice subséquente à l'augmentation de

l'excitation causée par l'excès de récepteurs AMPA fonctionnels à la membrane postsynaptique des neurones corticaux glutamatergiques. Pour preuve, l'haploinsuffisance de SYNGAP1 restreinte aux neurones pyramidaux excitateurs (souris possédant le génotype *Emx1-Cre;Syngap1<sup>flox/+</sup>*) est suffisante pour récapituler les déficits d'amplitude et de fréquence des mEPSC dont sont sujettes les souris *Syngap1* hétérozygotes constitutives. De plus la restauration de l'expression biallélique de SYNGAP1 cantonnée à ces mêmes neurones excitateurs (individus *Emx1-Cre;Syngap1<sup>flox-stop-flox/+</sup>*) en rétablit les déficits électrophysiologiques. *A contrario*, la réduction de l'expression de SYNGAP1 limitée aux interneurones GABAergiques inhibiteurs (souris possédant le génotype *GAD2-Cre;Syngap1<sup>flox/+</sup>*) ne mime pas les déficits retrouvés dans les propriétés électrophysiologiques (mEPSCs ni mIPSCs) des neurones excitateurs de la couche II/III du cortex préfrontal des souris *Syngap1<sup>+/-</sup>*. La réactivation de l'expression biallélique de SYNGAP1 exclusivement dans les interneurones GABAergiques inhibiteurs (souris *GAD2-Cre;Syngap1<sup>flox-stop-flox/+</sup>*) n'en restaure pas non plus les défaillances<sup>137</sup>. Faisant fi des défaillances dans le réseau GABAergique, les auteurs de cette étude suggère que les altérations dans la fonction de la synapse excitatrice émergent comme étant une cause suffisante à l'explication des dommages électrophysiologiques retrouvées chez la souris *Syngap1* hétérozygote.

Quel est l'impact de SYNGAP1 dans la diffusion du signal neuronal à travers les complexes et spécifiques circuits de cellules neuronales ? SYNGAP1 est impliqué dans la régulation de la propagation synaptique au niveau du réseau neuronale. La transmission du signal neuronal au cours du développement du circuit hippocampal a été évaluée par l'enregistrement des fEPSCs (*field excitatory postsynaptic currents*). Des électrodes stimulatrices placées soit sur les axones de la voie médiale perforante soit installées sur la voie commissurale collatérale de Schaffer ont permis d'évaluer la transmission synaptique respectivement au niveau des neurones du gyrus dentelé et des neurones pyramidaux du stratum radiatum de la couche CA1. Chez la souris *Syngap1<sup>+/-</sup>*, la fonction synaptique des neurones du gyrus dentelé et pyramidaux de la couche CA1, initialement comparable aux souris contrôles à PND 7 – PND 9, s'accroît dramatiquement à l'âge de PND 14 – PND 16 pour enfin devenir de nouveau équivalente aux contrôles après PND 21<sup>159</sup>. La physiologie synaptique dépendante des récepteurs AMPA et NMDA révélée par l'enregistrement des fEPSCs des neurones pyramidaux de CA1 provenant de tranches hippocampales issues de souris *Syngap1<sup>+/-</sup>* âgées de 14 à 20 semaines postnatales



souligne l'intégrité dans les différents aspects de la transmission synaptique des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> <sup>151</sup>. Ceci suggère que les récepteurs excitateurs glutamatergiques postsynaptiques des neurones pyramidaux hippocampiques sont matures et fonctionnels chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> adultes. D'autre part, des techniques ingénieuses couplant la libération par photostimulation de glutamate emprisonné (*glutamate uncaging*) à des marqueurs sensibles au voltage (*voltage dye*) ont permis de visualiser la propagation du signal évoqué par le glutamate à travers le circuit trisynaptique hippocampique. Dans les tranches hippocampique issues de souris *Syngap1*<sup>+/+</sup> âgées de 16 jours postnataux, les signaux évoqués par la photostimulation au niveau du gyrus dentelé s'atténuent au fur et à mesure de leur propagation dans ce réseau trisynaptique, alors que chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> du même âge ceux-ci sont dramatiquement amplifiés<sup>159</sup>, renforçant l'hypothèse de la régulation de la propagation de l'information synaptique dans l'hippocampe par SYNGAP1. L'hyperactivité du réseau cortical a également été démontrée sur des tranches corticales provenant de souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> âgées de 8 à 10 semaines<sup>137</sup>. Enfin, l'altération du développement cérébral chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> affecte la fonction du système nerveux central chez la souris adulte. En effet des enregistrements électroencéphalographiques réalisées sur les souris hétérozygotes révèlent de fréquentes activités de décharges corticales de hautes amplitudes<sup>137</sup>, coïncidant et concordant avec les activités épileptiformes diagnostiquées chez certains patients atteints de mutation dans le gène *SYNGAP1*.

## II - 5.2. Dans la plasticité synaptique/période critique

La synapse est malléable, labile, tonique et dynamique adaptant et corrélant la réponse dépolarisante postsynaptique à l'intensité de l'information présynaptique. Ce mécanisme est connu sous le nom de plasticité hebbienne. Non seulement la synapse évolue morphologiquement au cours du temps<sup>172</sup> mais également elles peuvent se former ou être éliminées en fonction de l'activité neuronale<sup>173</sup>. La grande dynamique de l'organisation morphologique est la caractéristique première et particulière des épines dendritiques. Ces dernières sont les plus petites unités structurelles et fonctionnelles de l'arbre dendritique des cellules glutamatergiques excitatrices. Les épines étant peu volumineuses, elles autorisent de

rapides variations dans les concentrations des molécules assurant ainsi une réponse adaptée immédiate et efficace à tout input. De majeurs bouleversements peuvent affecter le volume, la longueur de l'épine, sa configuration, son contenu en organelles telles que les ribosomes, l'endosome ou encore sa concentration en récepteurs. Cette très grande versatilité reflète les différentes propriétés fonctionnelles des synapses excitatrices. Les périodes critiques du développement synaptique contribuent aux raffinements des connections neuronales et configurent plus largement le développement des réseaux cérébraux. Ces fenêtres temporelles de plasticité sont particulièrement importantes dans la maturation de la perception, du langage, de la vision ou encore de la cognition. Les propriétés synaptiques des régions corticales sous-tendant les périodes critiques influencent l'ouverture autant que la persistance de ces fenêtres de temps. Cependant les mécanismes du développement synaptique qui altèrent les caractéristiques de la période critique sont encore méconnus.

L'expression de SYNGAP1 atteint son apogée autour du quatorzième jour postnatal<sup>106</sup>, suggérant qu'à cette période précise le développement des circuits neuronaux peut être particulièrement réactif ou sensible au niveau réduit de SYNGAP1 exprimé par les souris hétérozygotes<sup>159</sup>. La nette augmentation de la force synaptique glutamatergique créée par l'haploinsuffisance de SYNGAP1 n'a été observée que lors d'une période précoce du développement néocortical. En effet, l'activité synaptique hippocampique des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> durant la deuxième semaine de vie postnatale mime précocement la fonction synaptique adulte indiquant que les synapses *Syngap1*<sup>+/-</sup> acquièrent prématurément les caractéristiques morphologique et fonctionnelle des protrusions dendritiques excitatrices adultes. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle les épines dendritiques en développement sont particulièrement sensibles aux mutations de SYNGAP1.

L'utilisation de souris conditionnelles permet l'induction contrôlée de l'haploinsuffisance de SYNGAP1. L'injection unilatérale de virus rAAV-Synapsin-iCre-Venus dans l'hippocampe de souris *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> à PND1 résulte en une robuste augmentation du ratio des récepteurs AMPA / NMDA à PND14 dans les neurones du gyrus dentelé en comparaison de leurs contrôles, récapitulant les données obtenues sur les souris hétérozygotes constitutives. Au contraire, subséquent à l'expression de Cre, un effet minimal sur le ratio des récepteurs AMPA / NMDA a été constaté chez les souris *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> et *Syngap1*<sup>+/+</sup> lorsque les injections hippocampales ont été réalisées à l'âge de 6 à 8 semaines de vie postnatale<sup>159</sup>. Le

déclenchement de l'haploinsuffisance de SYNGAP1 à l'âge adulte affecte néanmoins un paramètre intrinsèque de l'excitabilité des neurones du gyrus dentelé: le nombre de réponses synaptiques à un stimulus évoqué est plus élevé chez les mutants conditionnels exprimant Cre<sup>159</sup>. La fonction de la protéine SYNGAP1 semble ainsi posséder une période critique bornée aux deux premières semaines de vie postnatale, lorsque la protéine joue un rôle primordial dans la détermination du développement des synapses glutamatergiques des épines dendritiques hippocampiques.

Cette fenêtre d'extrême flexibilité de la synapse survient à différents stades au cours du développement des aires corticales. Pour le cortex somatosensoriel murin (*barrel cortex*) celle-ci se déroule autour du cinquième jour de vie postnatale<sup>170</sup> et vers le quatorzième jour de vie post natale concernant le cortex préfrontal médial<sup>137</sup>. Notons toutefois que cette période très précoce est cependant caractérisée par l'absence d'épines qui ne se développeront que quelques jours plus tard le long de l'arbre dendritique des neurones excitateurs de ces deux structures cérébrales<sup>169</sup>. SYNGAP1 imprime donc son action répressive sur la maturation et le développement de la synapse excitatrice avant que la morphogenèse de la synapse dendritique ne prenne fin. Les particularités et conséquences du développement neuronal anormal restreignent l'efficacité de ces périodes critiques promouvant l'altération de la fonction des systèmes neuronaux. Dans le cortex préfrontal médial, les mutations de Syngap1 dérèglent également une période critique de croissance dendritique neuronale, de différenciation de l'arbre dendritique et de maturation de la synapse<sup>143</sup>. L'accumulation précoce et l'élagage ultérieur des structures dendritiques aussi bien que l'émergence anticipée de synapses anormalement élargies sont indicatifs de l'accélération du développement normale des structures neuronales et des circuits corticaux<sup>143</sup>. La fenêtre critique d'action de SYNGAP1 dans le développement des circuits neuronaux du cortex préfrontal médial englobe une période comprise entre la première et la troisième semaine de vie postnatale, ce qui diffère des résultats obtenus pour l'hippocampe et le cortex somatosensoriel. Ceci nous amène à penser que les structures cérébrales puissent être sujettes à des formes distinctes de dommages neurodéveloppementaux. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de la régulation de la plasticité du cortex visuel chez le chat. Dans cette aire corticale, la production de SYNGAP1 augmente graduellement en parallèle de la synaptogenèse, pour atteindre un pic chez les animaux âgés de 3 semaines et décroît enfin au fil du temps<sup>174</sup> suggérant un rôle de cette

protéine dans la régulation du développement du cortex visuel. La privation monoculaire de stimulus durant la période critique du cortex visuel perturbe l'expression de notre protéine d'intérêt. L'absence totale de stimulus pour les deux yeux dès la naissance et ce sur 5 semaines n'a cependant aucun impact, indiquant que la fenêtre d'action critique de SYNGAP1 dans le développement du cortex visuel se situe entre la quatrième et la cinquième semaine de vie postnatale chez le chat<sup>174</sup>. Ces auteurs nous dévoilent également que différentes formes d'expériences visuelles comme le *dark rearing* et la *monocular deprivation* gouvernent sélectivement l'expression de cette protéine synaptique.

Chez les rongeurs, l'expérience tactile engendre un robuste remaniement plastique dans le cortex somatosensoriel primaire<sup>175</sup> notamment dans la région cérébrale dédiée aux moustaches. Ces dernières sont des détecteurs tactiles actifs dont la représentation « anatomique » cérébrale est le *barrel cortex*: regroupement de cellules au sein de la couche corticale IV. Ainsi il existe une carte emblématique dans le cortex somatosensoriel primaire: à chaque moustache correspond un champs cortical de réception précis. Autrement dit, les neurones de chaque *barrel* répondent à l'activation d'une moustache précise. Au même titre que d'autres aires corticales sensorielles, les efférences des moustaches en provenance du thalamus atteignent les cellules pyramidales corticales de la couche IV, qui à leur tour projettent leurs axones dans les couches II-III puis dans la couche V restituant et disséminant respectivement l'information au niveau cortico-corticale et sous-corticale<sup>176</sup>. Afin d'évaluer la réponse cellulaire médiée par l'expérience, les moustaches des souris ont été sectionnées durant la période de synaptogenèse *id est* dès l'âge de PND 7 et ce pendant 2 semaines. Cette privation sensorielle résulte en une réduction du pic de densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux de la couche V du cortex somatosensoriel et ce quelque soit le génotype de l'animal. Par ailleurs suite à la section des vibrisses, une drastique augmentation de la densité des filopodes à PND 21 chez les souris contrôles a été constatée<sup>143</sup>. Au même âge, cet effet sur les filopodes est absent, suggérant une réduction de la capacité de réorganisation des circuits corticaux chez les souris *Syngap1* hétérozygotes<sup>143</sup>.

Cependant, au delà de ces fenêtres précoces de hautes flexibilités du développement néocortical, une étude suggère que la réduction de la production de la protéine à l'âge adulte récapitulent certains phénotypes synaptiques retrouvés chez les souris *Syngap1* hétérozygotes. L'injection hippocampique d'un virus recombinant dans les souris adultes *Syngap1<sup>flox/flox</sup>*<sup>134,177</sup>

provoque l'augmentation de la fréquence des mEPSCs des cellules neuronales du gyrus dentelé accompagnée d'une augmentation prononcée du nombre de récepteurs excitateurs glutamatergiques en comparaison de souris conditionnelles injectées avec un vecteur viral contrôle<sup>136</sup>. Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur l'hippocampe adulte de souris *Syngap1* hétérozygotes constitutives<sup>151,178,179</sup> indiquant que les changements associés à l'haploinsuffisance de *Syngap1* ne peuvent pas seulement être attribués et restreints à son impact au cours du développement des circuits neuronaux excitateurs.

L'importance de la cascade intracellulaire de Ras Erk dans la plasticité synaptique a été démontrée dans de nombreux systèmes incluant *Drosophila* et *Aplysia* autant que dans le système nerveux mammalien<sup>180-182</sup>. Cette succession de réactions intracellulaires est impliquée dans l'induction et le maintien de la LTP (*long term potentiation*) et de la LTD (*long term depression*), des modèles de plasticité synaptique néocorticale<sup>183-188</sup>. SYNGAP1 est impliquée dans la régulation fine de l'induction et de la magnitude de la LTP dépendante des récepteurs NMDA dans les neurones excitateurs de la couche CA1 de l'hippocampe. Bien que les stimulations présynaptiques induisent une potentialisation dans les tranches hippocampales issues des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup><sup>151</sup> âgées de 14 à 20 semaines de vie postnatale, les réponses postsynaptiques évoqués sont considérablement réduites par rapport à celles de leurs congénères contrôles<sup>137,151,152</sup>. Par ailleurs plusieurs études réalisées sur des cultures dissociées de neurones hippocampaux ont constaté la dispersion de SYNGAP1 lors de différentes formes de LTP<sup>141,150,189</sup>. Notons que la LTD dépendante des récepteurs NMDA n'est pas affectée par l'haploinsuffisance de *Syngap1*<sup>152</sup>.

Ainsi les synapses des épines dendritiques sont profondément affectées par l'haploinsuffisance de SYNGAP1 lors d'une période particulière et précoce du développement postnatale. Cette période critique de robuste synaptogenèse et de maturation des synapses fonctionnelles est marquée par un renforcement de l'excitabilité neuronale dont un phénomène majeur aboutit au « *synapse unsilencing* ». Une fonction essentielle de SYNGAP1 lors des phases précoces du développement est de réguler la force des synapses excitatrices en restreignant l'accumulation de récepteurs AMPA apposés aux sites présynaptiques d'exocytose du glutamate. Ceci requiert l'intégrité de la protéine particulièrement lors de la phase de développement où les synapses glutamatergiques acquièrent graduellement les récepteurs AMPA. Les effets de l'haploinsuffisance de

SYNGAP1 sur la maturation de la synapse se traduisent par de saisissants changements dans la balance entre l'excitation et l'inhibition et dans la propagation de l'information synaptique au cours de périodes précoces de développement. Ces données supportent l'idée selon laquelle la maturation accélérée et prémature des synapses glutamatergiques conduit le circuit neuronal à une aberrante excitation. Les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> possèdent significativement plus de synapses de type « *mushroom* » que leurs congénères contrôles. La fonction précise des épines dendritiques de type « *mushroom* » n'est pas encore bien élucidée bien que de nombreuses et robustes évidences montrent qu'elles sont le symbole et la marque d'un réseau neuronal mature *id est* des synapses stables moins sujettes à malléabilité ou à être éliminées *in vivo*<sup>173</sup>. Ainsi des mutations causant une accélération de la maturation du développement neuronal, des connections synaptiques plus efficaces, plus fortes ou plus opérantes traduisent un réseau neuronal initialement mal élaboré et résistant au phase critique de raffinement de la synapse par l'expérience. Un réseau détenant de telles caractéristiques menace l'intégrité du développement cortical en altérant les phases cruciales de période critique résultant en des troubles comportementaux. Ces résultats évoquent le rôle crucial de SYNGAP1 dans la régulation du développement synaptique ayant pour dessein la maturation du comportement et de la cognition.

### **II - 5.3. Au niveau comportemental**

Comment les détériorations synaptiques altérant la fonction des circuits neuronaux découlent en la dénaturation du comportement et de la cognition ? Les effets drastiques de l'haploinsuffisance de SYNGAP1 sur la maturation synaptique se traduisent par des bouleversements dans la balance entre l'excitation et l'inhibition dégradant les processus de transmission de l'information télencéphalique. Le déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition au cours du développement cérébral précoce influence la durée et l'efficacité des fenêtres temporelles critiques de haute plasticité synaptique<sup>190</sup>, gouvernant le raffinement des connections synaptiques qui soutiennent le comportement et la cognition. De plus, la pharmacopée ainsi que les manipulations génétiques ont permis de supporter l'hypothèse selon laquelle les récepteurs NMDA de l'hippocampe sont impliqués dans de nombreuses fonctions mnésiques<sup>191-193</sup>.

Dans le but d'entreprendre une description affinée du caractère comportemental, quelques paradigmes non cognitifs pouvant potentiellement interférer avec les performances mnésiques et cognitives des souris *Syngap1* hétérozygotes ont été évalués à travers différents tests comportementaux. La force musculaire évaluée par le test du fil horizontal suspendu (*hanging wire test*), la coordination motrice estimée par l'utilisation du rotarod (*accelerating rotarod test*), ainsi que la nociception appréciée par le test de sensation à la douleur thermique (*thermal nociception test*) ne sont affectées d'aucun déficit sévère chez les souris mutantes adultes *Syngap1*<sup>+/-</sup> comparées à leurs congénères contrôles<sup>179</sup>. Ceci indique qu'aucun problème physique ou neurologique ne contribue au phénotype hétérogène engendré par l'haploinsuffisance de SYNGAP1 chez la souris. Il faut cependant noter qu'un effet du sexe a été constaté dans certains des tests évoqués ci-dessus<sup>179</sup>.

De faibles doses d'antagonistes spécifiques aux récepteurs NMDA induisent l'hyperactivité chez l'être humain aussi bien que chez le rongeur. Des souris mutantes produisant un niveau réduit de récepteurs NMDA ne répondent pas à ces agents pharmacologiques<sup>194</sup>. Dans le paradigme comportemental de l'aire ouverte (*openfield*), l'exploration est sujette à différents facteurs dont la cognition spatiale<sup>195</sup>; l'hyperactivité quant à elle est associée à des troubles du développement de l'hippocampe<sup>196</sup>. L'activité locomotrice des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> a été évaluée par le test de l'openfield. Quelque soit l'âge de l'individu testé et la durée du test, les souris mutantes démontrent une élévation consistante de l'activité locomotrice au regard des souris contrôles<sup>159,179,197</sup>, statuant de l'absence de problème majeur de locomotion mais divulguant l'hyperactivité des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. Au contraire des souris mutantes, les souris contrôles s'isolent davantage dans les coins du dispositif<sup>197</sup>, indiquant une probable affection du comportement associé à l'anxiété (*spontaneous anxiety-like behavior*) chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. Afin d'affiner cet axiome, l'expression de celle-ci a été estimée à l'aide du test du labyrinthe élevé en croix (*elevated plus maze*). Les individus mutants demeurent plus longtemps et plus fréquemment dans les bras ouverts de ce dispositif<sup>179</sup>, confirmant la réduction du comportement lié à l'anxiété chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. De même, l'induction de l'haploinsuffisance de SYNGAP1 dans l'hippocampe de souris adulte induit également un comportement locomoteur d'hyperactivité<sup>136</sup>. Or, de façon intéressante la restauration ubiquitaire de l'expression biallélique de SYNGAP1 ne rétablit ni l'élévation de l'activité locomotrice, ni les troubles relatifs à l'anxiété de la souris conditionnelle adulte *Syngap1*<sup>fllox-</sup>

*stop-flox/+*<sup>159</sup>. Ceci supportant l'idée qu'un rétablissement des mutations pathogéniques de *Syngap1* chez l'individu adulte n'améliore pas les anomalies du comportement répertoriées chez la souris mutantes *Syngap1* hétérozygotes. En plus de ces troubles, les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> présentent des déficits dans la relation sensori-motrice (*sensory motor gating*). Un stimulus auditif de 120 dB (*startle reactivity*) provoque un sursaut amplifié par rapport aux individus contrôles démontrant que l'inhibition générale des circuits neuronaux préfrontaux est probablement affectée par l'haploinsuffisance de SYNGAP1 chez la souris<sup>197</sup>. L'augmentation de l'amplitude du réflexe de sursaut reflète la capacité des circuits neuronaux préfrontaux à s'adapter temporairement lorsqu'un stimulus de forte intensité est précédé d'un plus faible (*prepulse inhibition*); autrement dit l'aptitude à filtrer les informations inutiles. A l'inverse du réflexe de sursaut, les auteurs ont constaté une réduction de la réponse au *prepulse inhibition* en comparaison de leurs congénères contrôles<sup>197</sup> suggérant que divers circuits neuronaux altérés bouleversent la transmission de l'information auditive et le *sensory motor gating* chez la souris *Syngap1* hétérozygotes.

Les déficits dans le développement des circuits hippocampiques résultent en des troubles persistants de la fonction cérébrale s'agissant notamment des capacités d'apprentissage autant que dans les processus mnésiques. Le test comportemental du conditionnement à la peur (*fear conditioning*) évalue la capacité d'apprentissage d'un individu à prédire les événements aversifs et dépend, entre autre, de l'intégrité des circuits amygdalien et trisynaptique hippocampal<sup>198</sup>. Que ce soit les souris contrôles ou les individus mutants, les deux groupes démontrent une augmentation significative et équivalente du temps de tétanie provoquée par des sessions répétées de conditionnement contextuel à la peur (*contextual fear conditioning*)<sup>159,197</sup>. Pour autant la nouvelle exposition au contexte aversif, trente jours après une unique session de conditionnement révèle une réduction de la réponse aux stimuli chez les souris *Syngap1* hétérozygotes en comparaison de leurs congénères contrôles<sup>137</sup>. La réduction de l'expression de SYNGAP1 spécifiquement dans les interneurons GABAergiques ne récapitule pas le phénotype de la souris *Syngap1* hétérozygote. La restauration de l'expression de cette protéine dans cette même population neuronale ne rétablit pas les problèmes à long terme du conditionnement à la peur. En revanche, de réaliser les mêmes opérations au sein des cellules excitatrices corticales reproduit le comportement des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et permet la restitution normale de la réponse à ce conditionnement spécifique<sup>137</sup>, suggérant de nouveau



que la fonction synaptique excitatrice peut prédire certaines inaptitudes cognitives de la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. Suite au conditionnement contextuel, de placer l'individu dans un décor inconnu non aversif démontre l'incapacité des souris *Syngap1* hétérozygotes à discriminer deux environnements différents<sup>159</sup>. Les changements des dimensions de la chambre de test aussi bien que des signes visuels, odorants ou tactiles après l'apprentissage permettent de varier l'environnement et d'estimer le conditionnement à la peur par indice (*cue fear conditioning*). Les souris *Syngap1* hétérozygotes présentent une réponse significativement réduites par rapport aux individus contrôles pour cette version du test mettant en lumière les troubles de *cue fear conditioning*<sup>197</sup>, soulignant que l'expression réduite de SYNGAP1 cause des défauts dans les circuits des émotions et résulte en la diminution des réponses à des indices environnementaux élicitant la peur.

L'étude de mutations apparues dans les protéines composantes du complexe des récepteurs NMDA a montré le rôle crucial de ces voies de signalisation dans de nombreux types d'apprentissage et de mémorisation. Afin d'apprécier les potentielles conséquences de l'haploinsuffisance de SYNGAP1 dans les processus liés à la mémoire de référence spatiale, les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> ont été soumises au test de la piscine de Morris (*Morris water maze*). La performance dans ce test a été évaluée par la latence à rejoindre la plateforme. Quelque soit le génotype de l'individu, les souris adultes réduisent significativement le temps nécessaire à atteindre la plateforme émergée (*cue task*, indépendante de l'intégrité de la fonction des récepteurs NMDA) ou immergée (*spatial task*, dépendante de l'intégrité de la fonction des récepteurs NMDA) au fur et à mesure des sessions d'entraînement<sup>151,179</sup>, éliminant toutes possibilités de déficits de motivation, de problème visuel et/ou de nage. Bien qu'une préférence pour le quadrant cible (*target quadrant* contenant la plateforme) se manifeste dans les deux génotypes, les souris *Syngap1* mutantes nagent cependant légèrement plus pour se réfugier sur la plateforme<sup>151</sup>, suggérant que les processus menant à l'acquisition de cette tâche sont affectés chez les souris *Syngap1* hétérozygotes. La représentation spatiale assimilée par les souris au cours de la phase d'acquisition a été évaluée en retirant la plateforme de la piscine de Morris (*probe test* ou *transfer test*). Lors de *probe test* effectués 10 minutes ou 2 jours après la dernière session d'apprentissage, les souris mutantes hétérozygotes passent significativement moins de temps que leurs congénères contrôles dans le quadrant cible de la piscine ayant contenu préalablement la plateforme<sup>151,179</sup>, traduisant un déficit dans la capacité

de rétention ou dans la récupération de la mémoire spatiale. Néanmoins après 7 ou 40 jours de rétention, le temps passé dans le quadrant cible à rechercher la plateforme est similaire dans les deux groupes de souris<sup>151</sup>, indiquant que les souris *Syngap1* hétérozygotes bien qu'initialement affectées de légers problèmes d'apprentissage (encodage de la mémoire) possèdent une mémoire de référence spatiale à long terme intacte. Ces résultats illustrent également le tribut de SYNGAP1 dans l'induction de la machinerie de mémorisation autant que dans la récupération de l'information mémorisée et non dans sa rétention. L'injection intra-hippocampique de virus recombinant (rAAV-EGFP-Cre) dans les souris *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> âgées de 10 à 12 semaines reproduit les résultats obtenus avec les souris hétérozygotes conventionnelles<sup>136</sup>. Un déclin progressif du temps nécessaire à trouver la plateforme dans la version par indice (*cue*) de ce test aussi bien que dans sa version spatiale exonère les souris exprimant Cre de tout problème d'acquisition dans la mémoire de référence. La réalisation d'un *probe test* 24 heures après la dernière session d'apprentissage révèle un défaut minime chez les souris injectées avec rAAV-EGFP-Cre comparé à leurs congénères contrôles, renforçant l'idée de légers troubles dans la récupération du répertoire mnésique retenu par les individus mutants. Pour investiguer la malléabilité ou flexibilité de la mémoire de référence spatiale, ces mêmes souris ont été soumises à un test de *reversal learning* où la plateforme est localisée dans le quadrant opposé à celui précédemment choisi. Ce test élucide la capacité d'un individu à comprendre le nouvel objectif en oblitérant les possibles interférences propres à l'ancienne trace mnésique. Quelque soit le virus injecté, les souris adultes atteignent des performances similaires en terme de temps requis pour se réfugier sur la plateforme relocalisée<sup>136</sup>. Un *probe test* effectué 24 heures après le *reversal learning* révèle que les souris *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> injectées avec rAAV-EGFP-Cre ont une tendance prononcée dans la recherche de la plateforme à la première localisation<sup>136</sup>, soulignant des anomalies dans la flexibilité de la cognition chez la souris dont l'haploinsuffisance pour SYNGAP1 est induite à l'âge adulte. Ces différents troubles dans la reconnaissance spatiale ont été également appréhendés grâce au test du labyrinthe radial (*radial arm maze*), plus sensible dans la détection de potentiels déficits dans l'apprentissage et la mémoire spatiale. Ce test permet de discriminer la mémoire de référence (*spatial reference memory*) de la mémoire de travail (*spatial working memory*) incriminant diverses aires cérébrales telles que l'hippocampe, le cortex préfrontal aussi bien que le striatum<sup>199</sup>. Dans ce paradigme, l'apprentissage est défini comme la réduction du

nombre d'erreurs d'entrée dans un bras qui ne fut jamais « appâté » (mémoire de référence spatiale) et comme la diminution du nombre de retour dans un bras préalablement visité (mémoire de travail spatiale). Au fil des essais, les souris adultes *Syngap1*<sup>+/-</sup> ne démontrent aucune amélioration dans le nombre d'erreurs de mémoires spatiales de référence et de travail comparées à leurs congénères contrôles<sup>136</sup>, suggérant l'impact de SYNGAP1 dans ces deux processus/composants de la mémoire spatiale.

Une autre potentielle investigation de la mémoire spatiale de travail utilise le labyrinthe en T (*T maze*). Ce test est basé sur la tendance des rongeurs à explorer de nouveaux environnements<sup>200</sup> et implique notamment le système septo-hippocampal<sup>201</sup>. L'individu alterne si à chaque essai un bras différent du dispositif est visité. Alors que les souris contrôles sélectionnent dans approximativement 70% des cas le bras précédemment inexploré, les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> n'y manifeste aucune préférence<sup>137,159,179</sup>. La restauration de la production de SYNGAP1 à l'âge adulte ne permet pas le rétablissement du phénotype associé à ces déficits de mémoire de travail<sup>159</sup>. Seule la réduction de l'expression de SYNGAP1 restreinte aux neurones pyramidaux produisant la protéine EMX1 (souris ayant le génotype *Emx1-cre;Syngap1*<sup>fllox/+</sup>) mime les problèmes d'alternance chez la souris adulte *Syngap1*<sup>+/-</sup><sup>137</sup>, indiquant de nouveau que les dérégulations des neurones glutamatergiques sont une cause des manifestations phénotypiques exprimées par les souris *Syngap1* hétérozygotes.

Les compétences et aptitudes de ces mutants dans la mémoire de reconnaissance d'objets ont été également examinées. La distinction entre un nouvel objet et un objet précédemment inspecté requiert un adéquat jugement de familiarité et implique des structures cérébrales telles que l'hippocampe ou encore le cortex préfrontal. Quelque soit le délai imposé entre les phases d'habituation et de choix/distinction, les deux génotypes révèlent une préférence dans l'analyse de l'inconnu n'indiquant aucune affection de la mémoire de reconnaissance d'objets chez la souris adulte *Syngap1* hétérozygotes<sup>179</sup>. Une autre composante de la mémoire de reconnaissance concerne l'identification sociale. Les habiletés de discrimination d'un individu envers un congénère devenu familier vis à vis d'un second conspécifique inconnu sont mises à l'épreuve. La mémoire de reconnaissance sociale est ainsi quantifiée par le temps d'exploration du nouvel animal *versus* l'individu familier. Les souris contrôles interagissent significativement plus avec les nouveaux conspécifiques. En revanche les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>

adultes ne distinguent pas le sujet nouveau du familier<sup>197</sup>, démontrant leurs inaptitudes à former et exprimer une mémoire de discrimination/reconnaissance sociale.

Enfin chez les souris jeunes et les adultes *Syngap1*<sup>+/-</sup> et les souris adultes *Syngap1*<sup>flox-stop-flox</sup>, l'induction de crises épileptiques par le fluorothyl révèle un seuil d'émergence des différentes manifestations (premier clonus, tonique-clonique et extension totale des 4 membres) significativement réduit en comparaison de leurs contrôles respectifs<sup>137,159</sup>, soulignant aussi bien l'hyperexcitabilité des circuits neuronaux, que la prédisposition des souris mutantes à l'amorce de crises épileptiques. Ces données corrélient avec le phénotype épileptique retrouvé chez les individus haploinsuffisants pour *SYNGAP1*<sup>109</sup>.

Ainsi, la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> représente un modèle approprié pour l'étude des effets délétères causés par l'haploinsuffisance de SYNGAP1 sur le développement de circuits neuronaux.

## II - 6. Autres Rasopathies

La voie Ras-MEK est impliquée dans la réponse de l'environnement intracellulaire aux stimuli extracellulaires tels que les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs et autres petites molécules. Les gènes *RAS* (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) codent pour de petites protéines qui sont activées *via* des récepteurs à tyrosine kinase, des récepteurs couplés aux protéines G, des récepteurs spécifiques aux cytokines ou dédiés aux composants de la matrice extracellulaire. Les petites protéines Ras oscillent entre un état actif *id est* lié au guanosine triphosphate (GTP) et une condition inerte lorsqu'attachée au guanosine diphosphate (GDP). Intrinsèquement Ras possède une faible capacité à se convertir d'un statut à l'autre.

La liaison d'un stimulus à un récepteur à tyrosine kinase provoque le recrutement d'une protéine adaptatrice telle Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*). Cette dernière s'allie aux protéines SOS (*son of sevenless*) et engendre leurs mobilisations à la face interne de la membrane plasmique cellulaire. Les protéines SOS sont des facteurs d'échange du nucléotide guanosine (GEF: *guanosine nucleotide exchange factor*) qui accroissent la proportion totale de Ras lié au GDP. Telle Grb2, la neurofibromine, p120GAP ou encore SYNGAP1 participent à l'entretien d'un fin équilibre dans la régulation de l'activité des petites protéines Ras. La phosphorylation subséquente de la protéine Raf (*ARAF*, *BRAF*, *CRAF*: *A*, *B*, *C rapidly*

*accelerated fibrosarcoma*) entraîne l'entrée en action des MEKKs (*mitogen activated protein and Erk kinase kinase*) qui à leur tour phosphorylent et activent ERK. Cet effecteur détient la capacité d'intervenir sur de nombreuses molécules qu'elles soient cytosoliques ou nucléaires. Parmi les substrats de ERK d'aucuns sont des composants nucléaires, d'autres des facteurs de transcription, ou encore des protéines transmembranaires intervenant dans des fonctions cellulaires vitales tels le cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le contrôle de la croissance cellulaire<sup>202</sup>. Il est ainsi aisé d'envisager que la survenue d'une mutation dans l'un des contributeurs de cette voie puisse concourir à des conséquences développementales dramatiques. Qu'elles soient de perte de fonction ou de gain de fonction, toutes les altérations répertoriées des séquences dans les gènes mentionnés ci dessus aboutissent à une augmentation de l'activité de Ras et par conséquent de la voie intracellulaire Ras-MEK.

Le syndrome de Noonan est un trouble autosomique dominant affectant approximativement 1:1000 à 2500 naissances. Résultant de mutations hétérozygotes somatiques dans les gènes *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1* ou *RAF*, ce syndrome se caractérise par une morphologie cranio-faciale distinctive, une petite stature, des anomalies cardiaques accompagnées de différents degrés de désordres neurocognitifs<sup>203-208</sup>. Chez les souris mutantes pour le gène *Ptpn11* des évidences ont démontré une augmentation de l'activation de la voie Ras-Erk, du nombre de synapses excitatrices possédant les sous unités GluA1 des récepteurs AMPA résultant en une perturbation de l'équilibre entre l'inhibition et l'excitation qui dérégule la LTP au niveau hippocampique et contribue aux déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale<sup>209</sup>. Dans cette même étude les auteurs ont utilisé la lovostatine (une statine, inhibant la farnétylation et par la même l'activation de Ras) afin de rétablir la LTP ainsi que les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale chez la souris hétérozygotes *Ptpn11*<sup>+/-</sup> adulte<sup>209</sup>.

Le syndrome de Costello est un trouble associé à des substitutions hétérozygotes germinales dans le gène *HRAS*. Ces mutations affectent la force de la cohésion entre le nucléotide guanidique et Ras favorisant son maintien en condition active<sup>210</sup>. Cette affection se manifeste par des troubles neurodéveloppementaux, des dysmorphies crânio-faciales, des anomalies musculo-squelettiques, ectodermiques et cardiaques<sup>211</sup>.

Le syndrome de LEOPARD (acronyme de *Lentigines, EKG abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary valve stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth and Deafness*) est un trouble autosomique dominant dont les sujets sont affectés d'un phénotype

plus ou moins similaire à ceux souffrant du syndrome de Noonan. Les mutations hétérozygotes faux sens dans les gènes *PTPN11* aboutissent au syndrome de LEOPARD<sup>212,213</sup>. Il est intéressant de constater que la position du variant dans le locus du gène *PTPN11* détermine le phénotype syndromique. Néanmoins toutes mutations dans ce gène aboutissent au gain de fonction de *PTPN11* et à l'hyperactivation de la petite protéine Ras<sup>214</sup>.

Le syndrome de Legius est un trouble autosomique dominant dont les sujets présentent des *maculae* café-au-lait, une macrocéphalie, des déficits neurocognitifs. Les mutations hétérozygotes tronquantes dans le gène *SPRED1* résulte en sa perte de fonction réprimant l'inhibition de la phosphorylation de Raf<sup>215</sup>. Ces variants alléliques aboutissent également à l'augmentation dans l'activité de la protéine Ras.

La dérégulation de la voie intracellulaire Ras-Erk a également été associée à des causes génétiques dans d'autres syndromes. En effet les mutations dans les gènes *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1* et *MAP2K2*<sup>216,217</sup> aboutissent au syndrome cardio-facio-cutané (*cardio-facio-cutaneous*); la fibromatose gingivale héréditaire (*hereditary gingival fibromatosis*) est causée par des altérations dans la séquence génomique du gène *SOS1*<sup>218</sup>. D'autre part une substitution d'acides aminés dans le gène *NRAS* est à l'origine du syndrome lympho-prolifératif autoimmun (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*)<sup>219</sup> alors que le syndrome des malformations capillaires et artério-veineuses (*capillary malformation-arteriovenous malformation*) est le fruit de variations génétiques dans *RASA1*<sup>220</sup>.

Enfin la neurofibromatose de type 1 (*neurofibromatosis type 1*) est un désordre autosomique dominant dont le diagnostic clinique est basé sur la présence de *maculae* café-au-lait, de neurofibromes, de nodules de Lisch dans l'iris, une dysplasie osseuse, des déficits neurocognitifs et une prédisposition au développement de certains cancers. La neurofibromatose de type 1 est due à une mutation dans le gène *NFI* résultant en la perte de fonction de la neurofibromine ce qui entraîne la diminution de son activité de RasGTPase et par conséquent une augmentation de la quantité de Ras lié au GTP contribuant à l'hyperactivité de la voie intracellulaire Ras-Erk. Il a été démontré que chez les souris hétérozygotes pour le gène *Nfi*, un modèle murin pour la neurofibromatose, l'augmentation de l'activité de la voie Ras-Erk accroît la relâche du neurotransmetteur inhibiteur GABA alors que les paramètres de l'excitation ne sont pas affectés. Ceci contribue à des déficits dans la LTP et conséquemment à des troubles dans l'apprentissage et dans la mémorisation<sup>221-223</sup>. En

injectant de la lovostatine, les problèmes d'apprentissage spatial, les déficits d'attention et de *sensorymotor gating* ont été restaurés chez les souris adultes *Nf1*<sup>+/-</sup> 224.

L'ensemble de ces données démontre que des phénotypes comportementaux similaires (déficit dans l'apprentissage spatial) autant que des phénotypes électrophysiologiques analogues (problèmes dans la LTP) peuvent découler de divers mécanismes cellulaires: une augmentation du nombre de récepteurs AMPA chez un modèle murin de syndrome de Noonan et un surcroît de la relâche de GABA chez la souris *Nf1*<sup>+/-</sup>. Par ailleurs la délétion postnatale homozygote de *Nf1* dans les neurones excitateurs n'affecte pas la transmission synaptique ni l'apprentissage<sup>222</sup>, alors qu'un allèle surnuméraire muté de *Ptpn11* exprimé par les neurones excitateurs de l'hippocampe induit des perturbations dans la transmission synaptique autant que dans l'apprentissage<sup>209</sup>, soulignant les rôles distincts de ces deux modulateurs de Ras. L'étude de ces protéines peut être particulièrement instructive: l'activité excessive de SHP2 est associée au syndrome de Noonan alors que la perte de son activité catalytique induit le syndrome LEOPARD, nous renseignant dans la compréhension des rôles de SHP2 dans la régulation de la destinée cellulaire.

Tel que présenté tout au long de ce chapitre, la fonction de SYNGAP1 dans la maturation de la synapse glutamatergique excitatrice ne peut certainement être ni contestée, ni réfutée. Toutefois, malgré quelques évidences quant à son expression dans le réseau inhibiteur, son mandat dans le développement des circuits GABAergiques télencéphaliques reste source de controverse.

### III - Les interneurons GABAergiques télencéphaliques

L'acide gamma aminobutyrique ou GABA est le neurotransmetteur inhibiteur majeur du cortex cérébral adulte. Substrat du glutamate, le GABA est synthétisé par les interneurons inhibiteurs grâce aux décarboxylases de l'acide glutamique GAD<sub>65</sub> et GAD<sub>67</sub> codées respectivement par les gènes *GAD2* et *GAD1*. Stocké dans des vésicules présynaptiques par les protéines de transport vGAT (*vesicular GABA transporter*), le GABA est libéré dans la fente synaptique sous la conduite d'un potentiel d'action et dès lors peut exercer son effet sur des récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>C</sub> ou encore à travers les récepteurs métabotropiques GABA<sub>B</sub>. Afin de restreindre son action, des protéines GAT (*GABA transporter*) localisées au niveau des terminaisons synaptiques et des astrocytes, le capture et l'endocyte, permettant soit son recyclage ou son catabolisme par les enzymes GABA-T (*GABA-transaminase*) et SSADH (*succinate semialdehyde deshydrogenase*).

Bien que représentant un faible pourcentage (environ 20 %) de la population totale de cellules du cortex cérébral, les interneurons GABAergiques sont des modulateurs critiques et des éléments assimilateurs fondamentaux du développement, du maintien ou encore de la synchronisation des réseaux neuronaux<sup>225-230</sup>. La compréhension de leurs fonctions s'est révélée extrêmement difficile du fait qu'ils constituent le groupe de cellules le plus diverse du système nerveux central. Les sous-types d'interneurons GABAergiques télencéphaliques ou corticaux sont particulièrement hétérogènes en terme d'origine, de morphologie, de profil d'expression protéique, de propriétés électrophysiologiques et par conséquent de responsabilités dans la régulation du développement et de la fonction du cortex cérébral<sup>231</sup>. Pourtant les interneurons GABAergiques partagent des traits communs: ils sont inhibiteurs dans le cortex cérébral adulte, leurs afférences sont majoritairement dépourvus d'épines dendritiques et généralement leurs efférences projettent sur des régions particulières et précises des neurones de leur environnement local immédiat *id est* au sein d'une même colonne corticale ou ciblant les neurones des colonnes adjacentes.



### III - 1. Origines des interneurones

De nombreuses données sur la neurogenèse des interneurones dans le télencéphale en développement proviennent d'études et d'analyses réalisées sur des souris pourvues de mutations dans certains gènes. Celles-ci ont notamment divulgué différents principes fondamentaux dans le développement des interneurones durant l'embryogenèse. Au sein de zones prolifératives la neurogenèse des interneurones GABAergiques corticaux débute approximativement à l'âge embryonnaire E12.5 et s'étale jusqu'à la naissance. La multiplicité de ces aires de génération est révélatrice de l'hétérogénéité des interneurones GABAergiques du cortex cérébral. Il existe trois éminences ganglionnaires qui basées sur leur localisation anatomique dans l'axe rostro-caudal du télencéphale ont été définies comme caudale, latérale et médiale. Au fur et à mesure du développement cérébral, les éminences s'élargissent jusqu'à fusionner et devenir indistinctes dans le cerveau postnatal. Issus de ces zones du télencéphale dorsal, les interneurones migrent et s'éparpillent avant d'atteindre leur position finale dans le cortex cérébral. Ainsi, ces trois éminences ganglionnaires embryonnaires contribuent à la production de différents types cellulaires assignés à des structures cérébrales spécifiques.

#### III -1.1. Eminence ganglionnaire caudale

De nombreuses études ont démontré qu'après l'éminence ganglionnaire médiale, l'éminence ganglionnaire caudale est la structure sous corticale générant le plus d'interneurones GABAergiques<sup>232</sup>. Morphologiquement et moléculairement, cette éminence est essentiellement un hybride des autres éminences fusionnées au niveau du thalamus. Au niveau ventral, l'éminence ganglionnaire caudale exprime le facteur de transcription Pax6, alors que dans sa partie dorsale les protéines GSH2 (*glutathione synthase human 2*) et ER81 sont très fortement produites (Figure 3). Il est à prendre en considération que GSH2 et ER81 sont deux facteurs de transcription également requis pour la spécification des interneurones issus de l'éminence ganglionnaire latérale<sup>233</sup>. Les domaines dorsal et ventral de l'éminence ganglionnaire caudale ont des propriétés neurogéniques distinctes de celles des autres éminences ganglionnaires. Les progéniteurs originaires de l'éminence ganglionnaire caudale

prélevés à l'âge embryonnaire E15.5 ou E16.5 mis en culture ou transplantés génèrent principalement des interneurons bipolaires à calrétinine<sup>234,235</sup>, à VIP (*vasoactif intestinal peptide*)<sup>236</sup> (se référer à la section III - 3 pour leur présentation) et des interneurons corticaux exprimant le récepteur 5HT3a<sup>237</sup>. Les interneurons GABAergiques originaires de l'éminence ganglionnaire caudale se propagent et s'établissent dans le néocortex postérieur, dans la partie postérieure du noyau accumbens, l'hippocampe, certains noyaux de l'amygdale, le striatum postérieur et la partie postérieure du globus pallidus (Figure 3).

### III - 1.2. Eminence ganglionnaire médiale

L'éminence ganglionnaire médiale est le foyer majeur et essentiel de neurogenèse générant approximativement 60% des interneurons GABAergiques corticaux<sup>236,238</sup>. Des études *in vitro* ainsi qu'*in vivo* ont démontré que les facteurs de transcription tels que les gènes à homéoboxes *Dlx*, *Lhx6* et *Sox6* sont cruciaux pour la spécification des sous-types d'interneurons à Pv (*parvalbumin*) et à Sst (*somatostatin*; se référer à la section III - 3 pour leur présentation) provenant de l'éminence ganglionnaire médiale. Cependant le facteur de transcription primordial pour la détermination de ces interneurons GABAergiques est Nkx2.1 dont l'expression est quasiment exclusivement confinée à l'éminence ganglionnaire médiale<sup>239-242</sup> (Figure 3). Il faut noter que les interneurons GABAergiques à Sst dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale peuvent être subdivisés en tenant compte de leurs morphologies, de leurs propriétés électrophysiologiques et de l'expression de reelin, NPY ou encore de calrétinine<sup>243,244</sup>. L'éminence ganglionnaire médiale est la source d'interneurons GABAergiques hippocampaux, striataux ou encore corticaux (Figure 3).

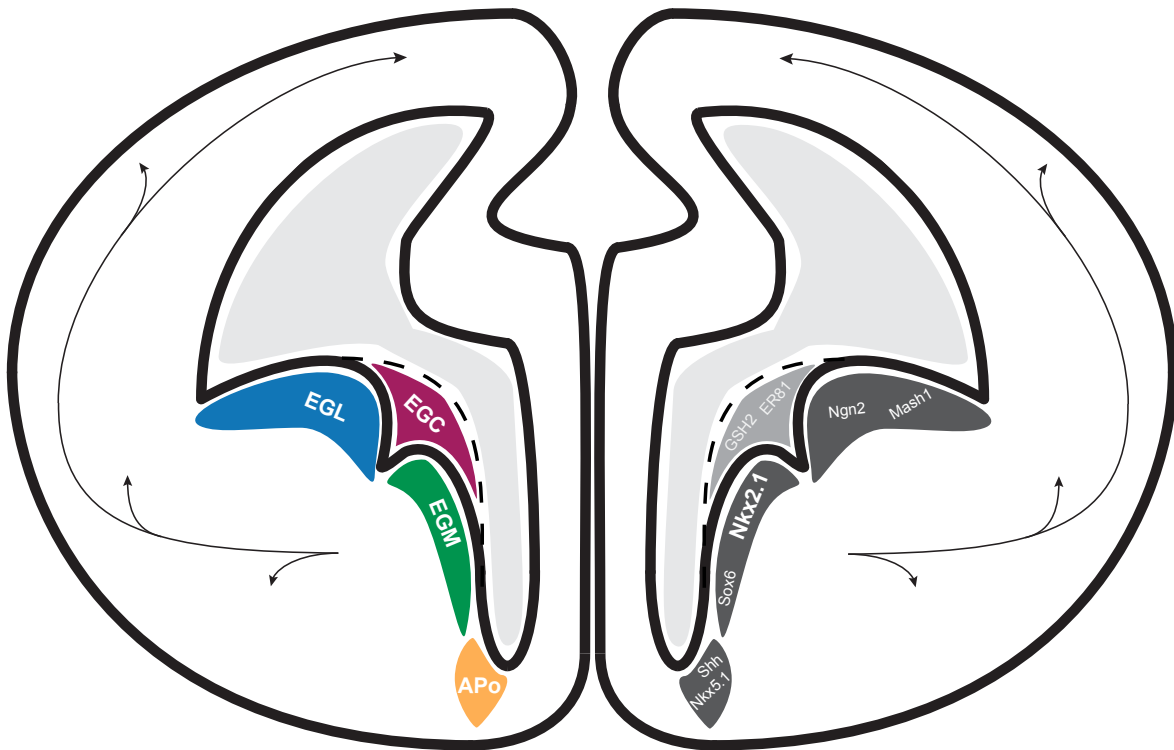
### III - 1.3. Eminence ganglionnaire latérale

Bien qu'il soit assuré que les éminences ganglionnaires médiale et caudale soient les sources primordiales et essentielles des interneurons corticaux dans le cortex cérébral murin en développement, la possibilité selon laquelle l'éminence ganglionnaire latérale soit la

troisième origine a été longtemps débattue. Les résultats de plusieurs expériences ont permis de conclure que l'éminence ganglionnaire latérale est une contributrice mineure au pool d'interneurones GABAergiques corticaux<sup>245,246</sup>. Pourtant d'autres études rapportent une réduction de plus de 50% du nombre d'interneurones GABAergiques chez les souris mutantes pour Nkx2.1<sup>247</sup>. Or si l'éminence ganglionnaire médiale est à l'origine d'une grande majorité des interneurones corticaux, une réduction de 50% implique l'existence d'autres aires cérébrales responsable de la génération d'interneurones. D'autre part l'ablation de l'éminence ganglionnaire médiale sur des explants d'embryons de rat, ne perturbe pas la migration des interneurones de l'éminence ganglionnaire latérale suggérant que ces cellules migratrices ne sont pas des neurones provenant de l'éminence ganglionnaire médiale la traversant mais sont issus de l'éminence ganglionnaire latérale<sup>248</sup> (confère figure 3).

### III - 1.4. Aire préoptique

L'aire préoptique est la région télencéphalique ventrale à l'éminence ganglionnaire médiale et exprime également les facteurs de transcription Shh et Nkx2.1 dans les cellules progénitrices<sup>249</sup>. Les interneurones originaires de l'aire préoptique n'élaborent pas le facteur de transcription Lhx6. Ce dernier est pourtant en aval de Nkx2.1 dans la génération des interneurones GABAergiques provenant de l'éminence ganglionnaire médiale. L'utilisation de l'électroporation *in utero* et de techniques de cartographies génétiques ciblant les cellules produisant Nkx5.1 a montré que l'aire préoptique génère un petit nombre d'interneurones GABAergiques<sup>250</sup> (confère figure 3). Ces derniers sont majoritairement établis dans les couches superficielles du cortex cérébral et expriment en particulier le peptide NPY (confère figure 3).



**Figure 3: Représentation d'un cerveau embryonnaire (vers E14) de souris, des zones progénitrices (à gauche) et des facteurs de transcription (à droite) assignés à la production des nombreuses sous population d'interneurones GABAergiques.**

EGL, EGC et EGM: Eminence Ganglionnaire Latérale, Caudale et Médiale respectivement. APo: Aire Préoptique. Les flèches schématisent les routes migratoires des interneurones GABAergiques.

### **III - 2. Migration et intégration des interneurones GABAergiques télencéphaliques**

Les nombreuses études sur le développement du cortex cérébral ont clairement établi que la neurogenèse des deux principaux types de neurones se déroulent dans deux domaines séparés: le compartiment subpallial où les interneurones GABAergiques sont générés et le pallium dans lequel les neurones excitateurs prolifèrent. Dans le but de concevoir un réseau

complexe de haut niveau de diversité cellulaire, les neurones doivent quelquefois être exportés loin de leurs points d'origine.

### III - 2.1. La migration

Spécifiés dans les éminences ganglionnaires les interneurons migrent à travers, ou en direction de structures télencéphaliques telles le cortex cérébral, l'amygdale, l'hippocampe, le striatum ou encore le bulbe olfactif. Les premiers interneurons émigrent des éminences ganglionnaires vers l'âge embryonnaire E12.5 chez les rongeurs, coïncidant avec les phases précoces de la neurogenèse. Bien que l'arrêt de la migration des interneurons puisse différer selon les différentes routes de migration, la grande majorité de cet exode survient en période prénatale<sup>251</sup>. Cependant une exception notable concerne la route migratoire rostrale (*rostral migratory stream*) qui se perpétue jusqu'à l'âge adulte<sup>252</sup>. Ainsi dans le télencéphale embryonnaire, de nombreuses populations de cellules évoluent dans des directions variées, complexes autant qu'élaborées, naviguent dans un environnement en trois dimensions afin d'atteindre leurs destinations finales précises.

Les interneurons GABAergiques, encore immatures, destinés au cortex cérébral migrent principalement suivant un parcours dorsal et tangentiel<sup>251</sup>. Après leurs exodes des éminences ganglionnaires, ces cellules suivent deux courants migratoires distincts: soit une route externe le long de la zone marginale ou un trajet plus interne longeant les zones sous ventriculaire (*subventricular zone*) et intermédiaire (*intermediate zone*). Au cours de ce parcours de migration le comportement de ces cellules est très complexe. Comme le cône de croissance s'allongeant ou se rétractant durant le processus de développement de l'axone, chacun des interneurons s'étend ou se recroqueville tout au long du processus de migration jusqu'à leur destination. Une fois dans le cortex cérébral, les interneurons GABAergiques entrent dans une seconde vague migratoire tangentielle avant d'atteindre leurs positions adéquats et d'intégrer les complexes réseaux neuronaux<sup>253,254</sup>.

Si toutefois tous les mécanismes nécessaires à la réussite de cette entreprise ne sont pas dévoilés, différents travaux ont démontré le rôle crucial de 4 types de facteurs sécrétés: les motogènes, les chemo-répulsifs, les chemo-attractifs et les neurotransmetteurs<sup>255</sup>. Le GABA

lui même peut être un important signal d'arrêt pour les interneurons corticaux<sup>256</sup>. A travers tout le système nerveux central une grande majorité de ces facteurs est également enrôlée pour garantir la régulation de différents processus dont la prolifération, la survie et la migration neuronale. Les processus par lesquels les interneurons GABAergiques corticaux déterminent leurs positions finales sont encore sujets à controverse. Néanmoins nous savons que les interneurons dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale répondent à des agents sécrétés par les neurones corticaux excitateurs<sup>257,258</sup>. Par ailleurs il a été démontré que la suppression de l'excitabilité neuronale par l'électroporation de Kir2.1 (*inward rectifying potassium channel*) dans les cellules inhibitrices provenant de l'éminence ganglionnaire caudale résulte en l'arrêt de leur migration<sup>259</sup>. Les conséquences de ces différents effets sur le processus migratoire en terme de signalisation intracellulaire ou encore concernant la dynamique mitochondriale sont la source de recherches actuelles.

### III - 2.2. L'intégration dans des réseaux neuronaux locaux

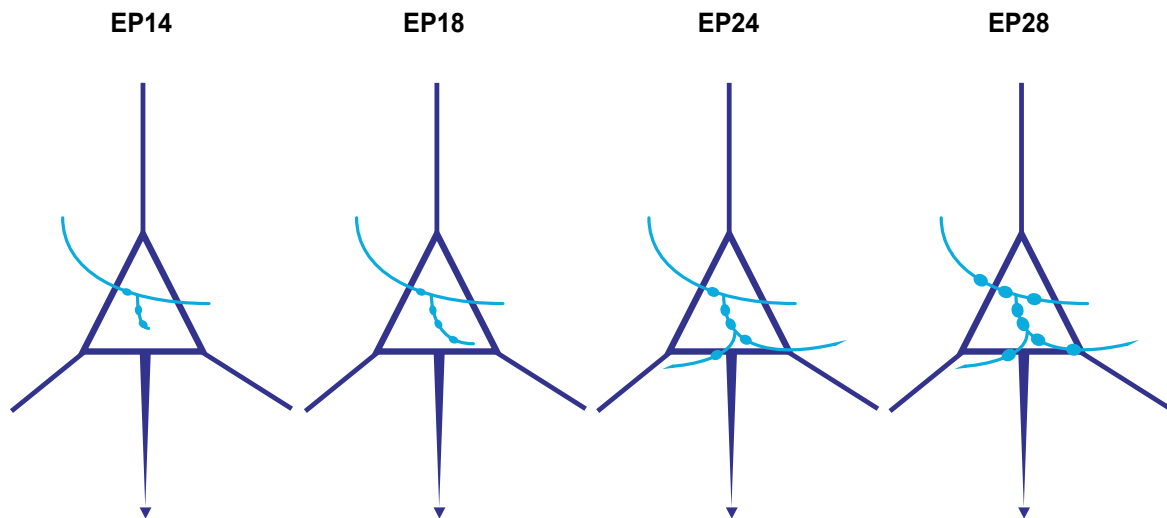
L'étape finale de la maturation des interneurons GABAergiques implique le dénouement de la différenciation post-migratoire dans le cortex majoritairement composé de clones de neurones pyramidaux excitateurs. Ces cellules inhibitrices sont fondamentales à de nombreux égards à la maturation du circuit cortical, phénomène débutant dès les premiers stades postnataux et se perpétuant jusqu'à la fin de l'adolescence. Par exemple un pic d'expression de la parvalbumine au niveau des terminaisons axonales des interneurons Chandelier (se référer à la section suivante pour leur présentation) précède l'initiation de l'élagage des axones excitateurs dans le cortex préfrontal de singe<sup>260</sup>, suggérant que la maturation des interneurons GABAergiques corticaux régule le raffinement des réseaux neuronaux.

Ainsi de s'introduire dans un environnement inédit nécessite quelques aptitudes cruciales: (i) la capacité d'interprétation et d'interaction aux indices locaux instructifs comme les facteurs de transcription<sup>261,262</sup>, des neurotransmetteurs<sup>263</sup>, des neurotrophines<sup>230,264,265</sup> ou encore des molécules d'adhésion cellulaire<sup>266,267</sup>; (ii) les interneurons GABAergiques nécessitent d'acquérir leurs caractéristiques de maturité par l'élaboration de leurs neurochimies, leurs

propriétés d'activité électrique, de leurs connectivités synaptiques sur des cellules cibles identifiées et appropriées; (iii) la capacité d'assimilation des informations afférentes excitatrices et inhibitrices afin de prévenir tout déséquilibre dans le circuit synaptique.

De parvenir à un circuit neuronal raffinée et efficace requiert l'intégration d'inputs présynaptiques au niveau de compartiments membranaires particuliers des cellules postsynaptiques. Dans le néocortex la grande majorité des projections des cellules excitatrices ciblent les épines dendritiques d'autres cellules glutamatergiques. Que ce soit *in vivo* (*acute slices*) ou *in vitro* (dans des cultures organotypiques), la distribution des boutons synaptiques axonaux est en revanche propre à chaque type d'interneurones GABAergiques et restreinte à un domaine particulier du neurone postsynaptique<sup>268</sup> (Figure 5).

La transfection biolistique de la construction pGAD<sub>67</sub>-GFP dans des cultures organotypiques restreint majoritairement l'expression de la GFP à une population particulière d'interneurones GABAergiques produisant la parvalbumine<sup>227</sup> (se référer à la section suivante pour leur présentation). Ceci confère un outil idéal pour l'évaluation de l'intégration des axones des interneurones GABAergiques dans les réseaux neuronaux locaux et dans le but d'étudier la maturation postnatale de l'innervation GABAergique. En culture organotypique la séquence « normale » du développement de la maturation est la suivante: à EP 14 (*equivalent postnatal day 14*), les axones provenant des interneurones GABAergiques sont simples contactant pauvrement quelques somata environnants; à EP 18, l'innervation de l'axone se complexifie projetant sur un nombre croissant de cellules postsynaptiques; à EP 24 le soma de chacune des cellules ciblées est enlacé de multiples branches axonales GABAergiques plus complexes, la concentration et la taille des boutons synaptiques inhibiteurs augmentent également<sup>227</sup> (confère figure 4).



**Figure 4: Représentation stéréotypique des processus de formation de l'innervation de la synapse périsonatique GABAergique.**

A EP 14, la plupart des axones des interneurons à parvalbumine (bleu clair) contactent des cibles postsynaptiques mais ne contiennent que peu de boutons synaptiques (ovales bleu clair); à EP 18, plus de cellules sont contactées; à EP 24, l'innervation périsonatique se complexifie, les boutons synaptiques s'élargissent; EP 28, accroissement de la taille des boutons synaptiques. Une cellule pyramidale est schématisée en bleu foncé.

Bien que ces phases de maturation de l'innervation inhibitrice semblent prédéterminées génétiquement *id est* soient intrinsèques à la cellule, l'activité neuronale et l'expérience sensorielle participent également à l'élaboration de l'architecture de l'axone émergent de l'interneurone GABAergique. Dans des cultures organotypiques de cortex de souris, de réduire l'excitation des interneurons GABAergiques pendant la phase de prolifération et/ou de formation des synapses inhibitrices affecte le nombre de cellules innervées par les synapses périsonatiques GABAergiques<sup>227,230,265,267</sup>. De plus la suppression de la relâche de neurotransmetteur par les interneurons GABAergiques corticaux exprimant la parvalbumine,



résulte quant à elle en des effets opposés sur l'arborisation axonale, la densité et la taille des boutons périsonmatiques selon le stade de développement<sup>265</sup>.

L'activité neuronale est à la base de la maturation de l'innervation GABAergique périsonmatique corticale. Les inputs de l'œil gouverne l'activation du cortex visuel contralatéral. L'injection monoculaire de tétrodotoxine (TTX), empêchant la génération de la production de potentiels d'action, permet ainsi de réduire considérablement l'activité corticale de l'aire visuelle contralatérale. L'examen de l'innervation GABAergique dans l'aire binoculaire du cortex visuel privé d'activité de PND 20 à PND 24 montre des changements drastiques dans la densité des boutons inhibiteurs périsonmatiques, ce qui n'est pas constaté dans l'aire visuelle binoculaire ipsilatérale. En revanche la même opération réalisée de PND 24 à PND 28 ou de PND 32 à PND 36 n'entraîne aucun effet significatif sur l'arborisation axonale des interneurons GABAergiques inhibiteurs corticaux<sup>227</sup>. Ces résultats suggèrent l'existence pour la maturation des interneurons GABAergiques d'une fenêtre temporelle postnatale d'extrême sensibilité à l'expérience sensorielle. Il est intéressant de relever que dans le cas des études réalisées sur des cultures corticales organotypiques, bien que privé d'afférences thalamiques, le développement de l'innervation GABAergique récapitule les caractéristiques observées *in vivo*<sup>268</sup>, indiquant que les processus sous tendant la détermination ou le choix de la cible cellulaire des axones GABAergiques suivent quant à eux un programme de maturation intrinsèque indépendant de l'activité neuronale.

### **III - 3. Diversité des interneurons GABAergiques télencéphaliques**

Différents paramètres ont été utilisés afin de classier les interneurons corticaux en différents sous-types en tenant compte de leurs morphologies, de leurs connectivités, de leurs profils moléculaires, de leurs caractéristiques immunohistochimiques et de leurs propriétés électrophysiologiques. Bien qu'incomplète, cette classification se révèle salutaire dans la distinction des divers groupes d'interneurons corticaux. L'analyse de l'expression de protéines de liaison à l'ion calcique telle que la parvalbumine, la calbindine ou la calrétinine, ainsi que la production de neuropeptides comme la somatostatine, le peptide intestinal

vasoactif ou la cholecystokinine ont permis de définir les classes distinctes d'interneurones hippocampiques et corticaux. Les synapses GABAergiques recouvrent presque l'intégralité de la surface membranaire des neurones pyramidaux de l'extrémité de la plus petite section de dendrites, au soma, en passant par le segment axonal initial jusqu'à innover l'axone. Ces synapses contactant différents domaines de la membrane des cellules excitatrices proviennent de types distincts d'interneurones GABAergiques assurant des rôles spécifiques dans la régulation de l'activité des cellules pyramidales excitatrices.

### III - 3.1. Interneurones à parvalbumine

La parvalbumine est une protéine de liaison au calcium exprimée dans environ 45% des interneurones GABAergiques du cortex somato-sensoriel<sup>237,269</sup>. La plupart des interneurones produisant la parvalbumine est également nommée cellules à panier (*basket cells*) pouvant être classifiées de large, étroit ou en nid en fonction de la taille de leurs somas, de leurs projections dendritiques ou encore axonales<sup>270,271</sup>. Les interneurones à parvalbumine sont souvent à haut niveau d'activité (*fast spiking*), *id est* caractérisés par la génération de trains de potentiels d'action à haute fréquence<sup>272</sup> et innervent le soma ainsi que les dendrites proximales des neurones pyramidaux excitateurs<sup>273</sup> (Figure 5). Ceux-ci garantissent une forte inhibition sur l'initiation des potentiels d'action générés par les cellules excitatrices. Par ailleurs au sein de réseaux neuronaux thalamocorticaux, trans-laminaires ou encore inter-régionaux, les interneurones à parvalbumine sont dotés de la capacité de rétrocontrôle<sup>274-276</sup>. Il a été démontré qu'un interneurone à parvalbumine et qu'un neurone pyramidal excitateur recevant des afférences excitatrices communes ont de fortes probabilités d'être réciproquement connectés<sup>277</sup>. Ces connections suggèrent un rôle crucial de ces interneurones dans la régulation du laps de temps précis au cours desquels le neurone excitateur a la possibilité de générer des potentiels d'action en réponse aux stimuli. En d'autres termes ces cellules à panier ont une fonction de synchronisateur de l'excitation des réseaux corticaux. Les interneurones à parvalbumine innervent aussi d'autres interneurones incluant d'autres cellules à panier et sont électriquement couplés par des jonctions de type gap<sup>278,279</sup>. Ainsi les interneurones à parvalbumine sont de toutes premières importances au regard de la génération,

du maintien de la synchronisation et des oscillations des réseaux neuronaux corticaux. En effet les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine ont un rôle majeur dans les oscillations cérébrales de type gamma<sup>280,281</sup>.

### III - 3.2. Interneurones Chandelier

Les interneurons Chandelier ont traditionnellement été classifiés dans la catégorie des cellules exprimant la parvalbumine bien que de récentes évidences tendent à montrer que la majorité des interneurons Chandelier n'exprime peu à pas de parvalbumine<sup>282</sup>. Ces interneurons sont également qualifiés de *fast spiking* bien que leurs propriétés électrophysiologiques diffèrent des cellules à parvalbumine à panier<sup>283</sup>. Ciblant par leurs efférences la partie la plus proximale de l'axone des neurones pyramidaux excitateurs<sup>282</sup> (Figure 5), il semble probable que les interneurons Chandelier soient impliqués dans la régulation de l'initiation du potentiel d'action et ainsi synchronise l'activité des ensembles neuronaux.

### III - 3.3. Interneurones à somatostatine

La somatostatine est un neuropeptide exprimée par approximativement 30% de la totalité des interneurons du cortex somato-sensoriel<sup>237,269</sup>. Au contraire des interneurons à parvalbumine, ces interneurons ciblent l'arbre dendritique des cellules pyramidales excitatrices<sup>284,285</sup>. Parmi les cellules exprimant la somatostatine, les plus abondantes sont les cellules de Martinotti du néocortex localisées majoritairement dans la couche V corticale. Leurs axones, ascendants vers la couche I du cortex, y bifurquent horizontalement et ciblent l'extrémité des terminaisons dendritiques des cellules pyramidales<sup>286</sup> (Figure 5). D'un point de vue électrophysiologique, ces interneurons sont classifiés en tant que cellules non pyramidales à brefs trains de potentiels d'actions (*burst spiking*). A l'inverse des cellules exprimant la parvalbumine, les interneurons de Martinotti reçoivent des afférences excitatrices fortement facilitatrices. C'est ainsi que le rétrocontrôle inhibiteur exercé par ces

interneurones est dépendant de l'activité<sup>287,288</sup>. Autrement dit, l'inhibition par les cellules de Martinotti est plus efficace lorsque l'activité est accrue<sup>289</sup>. Il est donc concevable qu'il existe des différences dans le type d'inhibition assujetti à l'activité synaptique: d'une inhibition somatique par les interneurones à parvalbumine à une inhibition dendritique par les cellules de Martinotti.

Il existe 3 sous types d'interneurones à somatostatine. Anatomiquement et physiologiquement distinctes des cellules de Martinotti, les cellules X94 sont localisées dans les couches corticales IV et V et innervent les neurones de la couche IV<sup>290</sup>. Les interneurones à somatostatine peuvent être divisés en 2 autres sous classes définies par leur expression ou non de la calrétinine, leurs différences dans l'organisation de l'arbre dendritique et de leurs connectivités<sup>243,289</sup>.

### **III - 3.4. Interneurones à cholécystokinine**

Avec les cellules exprimant la parvalbumine, les neurones produisant la cholécystokinine sont la seconde classe de cellules à panier et semblent également réguler la synchronisation des ensembles neuronaux grâce à leur innervation périsomatique<sup>291</sup> (Figure 5). Néanmoins les interneurones à cholécystokinine ont d'uniques propriétés moléculaires et physiologiques les différenciant des interneurones à parvalbumine notamment dans la composition des récepteurs GABA à travers lesquels ils médient la neurotransmission. Par ailleurs ce type d'interneurones principalement étudié au sein des structures hippocampiques, répond fortement et efficacement aux endocannabinoïdes et autres neuromodulateurs<sup>292,293</sup>.

### **III - 3.5. Interneurones au peptide intestinal vasoactif**

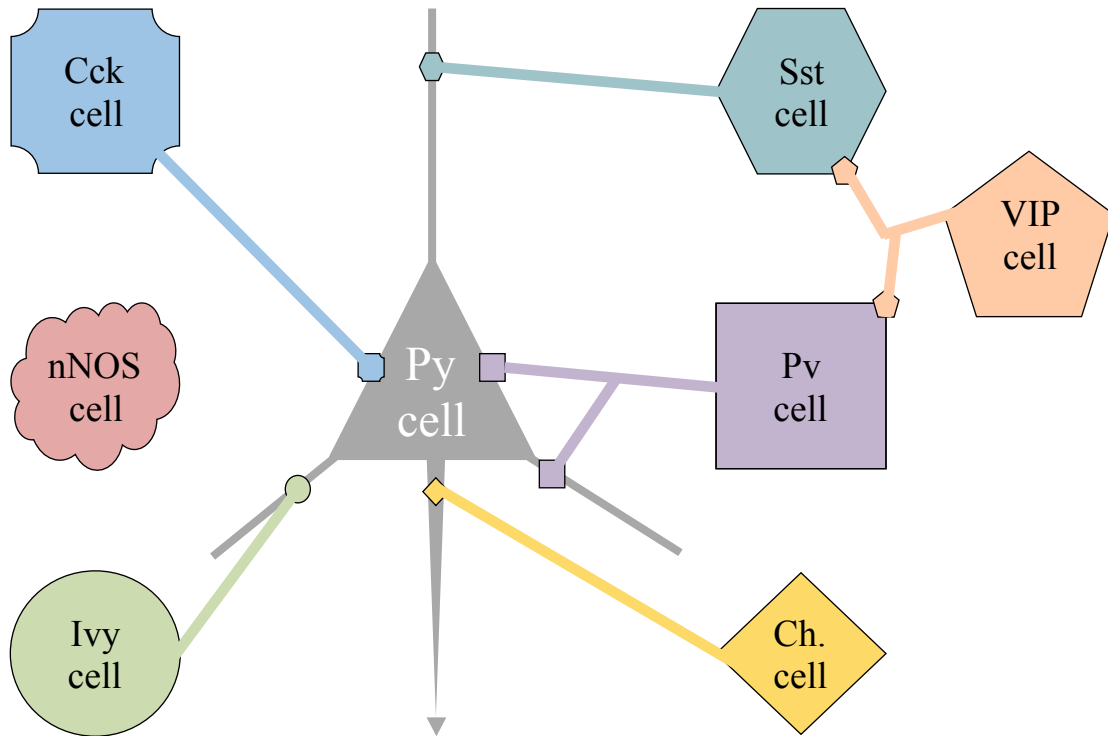
Comme décrit précédemment, le neuropeptide intestinal vasoactif est exprimé dans une certaine catégorie d'interneurones ne produisant ni somatostatine ni parvalbumine, cependant une grande partie de ceux-ci coexpriment la calrétinine et possèdent une morphologie bipolaire<sup>237,244</sup>. La caractérisation physiologique a permis de démontrer l'irrégularité des trains

de potentiels d'action générée par ces interneurons produisant le peptide intestinal vasoactif et la calrétinine<sup>244</sup>. Le second type d'interneurones au peptide intestinal vasoactif n'exprime pas la calrétinine et présente une morphologie multipolaire<sup>237</sup>. Ces derniers sont capable d'adaptation rapide au changement d'activité imposé par les cellules pyramidales excitatrices<sup>244</sup>. Qu'ils expriment la calrétinine ou non, les interneurons produisant le peptide intestinal vasoactif forment des synapses sur les protrusions dendritiques ou sur la dendrite des neurones corticaux excitateurs<sup>273</sup> alors que d'autres apparaissent comme inhibant préférentiellement les autres types d'interneurones<sup>294</sup> (Figure 5). De récentes évidences supportent le fait que les interneurons au peptide intestinal vasoactif n'inhibent que peu les neurones pyramidaux mais exercent leurs effets maximaux sélectivement sur les cellules productrices de somatostatine<sup>295</sup> (Figure 5), suggérant que les interneurons au peptide intestinal vasoactif désinhibent, ou encore contribuent à la stimulation des cellules pyramidales excitatrices. Par ailleurs certains interneurons à somatostatine inhibent les interneurons à parvalbumine, ainsi l'activation des cellules productrices du peptide intestinal vasoactif peut résulter dans la dépression de l'inhibition des neurones à parvalbumine et parvenir à l'excitation des neurones excitateurs corticaux<sup>295-298</sup>.

### III - 3.6. Interneurones produisant nNOS (*neuronal isoform of nitric oxide synthase*)

L'oxyde nitrique est une molécule de signalisation rétrograde connue pour moduler la neurotransmission. Largement exprimé dans le néocortex tout au long du développement, sa production est confinée à une sous population d'interneurones GABAergiques<sup>299</sup> (Figure 5). En particulier au sein de la structure hippocampique, cette classe de neurones inclut les cellules ivy et neurogliales<sup>300</sup>. Dans le cortex cérébral les interneurons GABAergiques exprimant nNOS peuvent être distingués en deux sous populations. Le type I se caractérise par de longues projections axonales atteignant des aires corticales ipsi autant que contralatérales et sont principalement actifs lorsque la plupart des neurones corticaux sont silencieux *id est* lors des périodes de sommeil<sup>301,302</sup>. Ceci est révélateur de leurs rôles importants dans la synchronisation des ondes électroencéphalographiques, coordinant l'activité cérébrale entre

différentes aires corticales. Le type II exprime la protéine REELIN et le récepteur sérotoninergique 5-HT3a<sup>237</sup>.



**Figure 5: Illustration représentative de la spécificité de l'innervation synaptique GABAergique.**

Chaque sous population d'interneurones GABAergiques cible une région précise et particulière de la cellule postsynaptique, hormis les interneurones exprimant nNOS diffusant le neurotransmetteur inhibiteur dans le milieu intercellulaire. Cck: *Cholecystokinine*; nNOS: *neuronal nitric oxid synthase*; Sst: *Somatostatin*; VIP: *Vasoactive intestinal peptid*; Pv: *Parvalbumin*; Ch: *Chandelier*; Py: *Pyramidal*.

### III - 4. Rôle des interneurones GABAergiques télencéphaliques

L'inhibition synaptique assumée par une grande variété d'interneurones, contrecarre les effets de l'excitation, en modulant la durée, l'intensité, la force et les propriétés

d'activation des potentiels d'action des cellules excitatrices pyramidales, exerçant ainsi un filtre sur l'excitation synaptique. Sous forme d'oscillations électriques, ces interneurons permettent de coordonner des interactions transitoires ou routinières à travers le réseau de cellules pyramidales dans le but de former des ensembles coopérant à une transmission efficace de l'information. De récentes techniques basées sur l'expression ciblée de modulateurs de l'activité neuronale (grâce à l'optogénétique) ont permis l'identification physiologique ainsi que la perturbation de certaine sous population spécifique d'interneurons au sein d'encéphale intact. Combinée aux techniques d'enregistrement et d'imagerie, la compréhension des multiples rôles des interneurons dans l'établissement des fonctions cérébrales tend à être révélée.

### **III - 4.1. Rôle dans le développement précoce des circuits neuronaux**

A l'âge adulte, la fonction majeure des interneurons GABAergiques corticaux est d'organiser dans l'espace et le temps la génération de la plupart des oscillations électriques associées aux fonctions cérébrales du comportement et de la cognition. Cette tâche centrale des interneurons GABAergiques est élaborée lors des différentes étapes du développement néocortical. En effet chez les rongeurs, la genèse de la population d'interneurons débutant vers le jour embryonnaire E10, précède de quelques jours celle des neurones pyramidaux excitateurs<sup>303</sup>. Constituant une population cellulaire plus âgée, il est probable que, notamment, les propriétés morphologiques, physiologiques ainsi que l'activité des interneurons GABAergiques soient globalement acquises avant et soient plus développées que celles des neurones excitateurs pour un même stade de développement. *In utero* dans la région CA1 de l'hippocampe le réseau GABAergique est déjà opérant alors que les cellules glutamatergiques sont en développement et ne reçoivent pas encore d'afférences synaptiques<sup>304,305</sup>. De plus au niveau postsynaptique, les synapses GABAergiques corticales murissent plus rapidement que les connections glutamatergiques et ce pour la plupart des populations cellulaires<sup>306,307</sup>, indiquant l'existence d'une certaine séquence concernant la maturation des récepteurs.

Aux prémices du développement des réseaux neuronaux corticaux, due à une concentration intracellulaire élevée en ions chlore, la transmission des interneurons corticaux

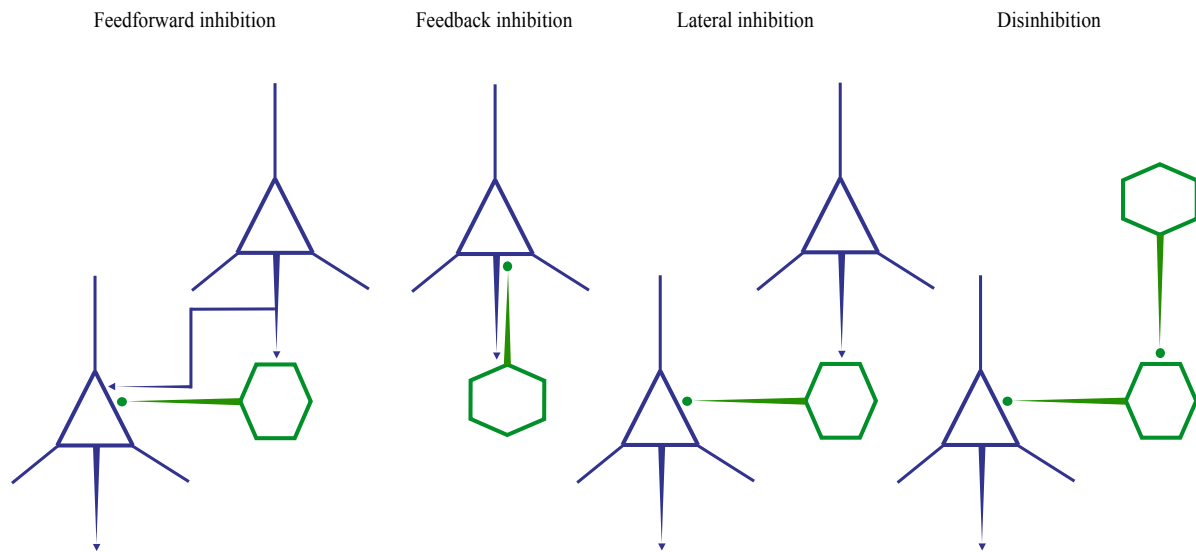
GABAergique est dépolarisante, et excite par le fait certains des neurones ciblés<sup>308</sup>. Cependant il est important de noter qu'en fonction de la charge intracellulaire en ions chlore, certains neurones au sein d'une même structure cérébrale peuvent être excités tandis que d'autres inhibés par la transmission synaptique GABAergique. Vérifiée à travers différentes structures en développement, cette observation est le résultat d'un délai dans la maturation des protéines d'export du chlore telles que KCC2 (*K-Cl cotransporter 2*) en comparaison des protéines dédiées à son influx telles les peptides NKCC<sup>308-310</sup>.

Le rôle central des microcircuits GABAergiques au cours du développement est appuyé par une récente étude démontrant que certains interneurons GABAergiques dont les dendrites et l'arborisation axonale sont fortement et précocement connectées, centralisent les informations et orchestrent la synchronisation précoce de l'activité neuronale<sup>311</sup>. Ainsi en manipulant l'activité d'un seul ou d'une population de ces interneurons, il est possible de synchroniser ou désynchroniser la dynamique d'un réseau neuronal.

### **III - 4.2. Rôle dans le contrôle de l'activité des circuits neuronaux**

Les interneurons inhibiteurs peuvent assurer la régulation de l'activité des populations de cellules pyramidales selon quatre différents processus: *feedforward*, *feedback*, latérale ou par désinhibition (confère figure 6).





**Figure 6: Illustration de possibles intégrations des interneurons GABAergiques au sein des réseaux neuronaux.**

Les neurones pyramidaux sont schématisés par des triangles bleus; les cellules inhibitrices GABAergiques sont les hexagones verts. Concernant la *feedforward inhibition*, les afférences axonales d'un neurone pyramidal projettent sur un second neurone pyramidal et sur un interneurone GABAergique qui, lui même, contacte le second neurone pyramidal. Pour la *feedback inhibition*, les neurones pyramidaux et inhibiteurs se contactent réciproquement. Dans le cas de la *lateral inhibition*, les afférences d'un neurone pyramidal excite un interneurone GABAergique qui inhibe un second neurone pyramidal. La *disinhibition* quant à elle se définit par l'inhibition de l'inhibition.

Chacun des différents domaines dendritiques, somatiques ou axonales des cellules pyramidales possèdent leurs propres classes d'afférences inhibitrices provenant de population d'interneurones spécifiques (confère figure 4). Ces interneurones ciblent les mêmes domaines que les afférences qu'ils reçoivent assurant ainsi une inhibition de type *feedforward* (confère figure 6). Les cellules exprimant la parvalbumine ainsi que les interneurones Chandelier assurant respectivement une inhibition circonscrite à la région périsonomatique et au segment

initial de l'axone ont la capacité de former des circuits d'inhibition de type *feedforward*. En compétition avec l'excitation dendritique, ce type d'inhibition peut ainsi restreindre, contrôler les réponses électrophysiologiques des neurones pyramidaux. Ceci se traduit par leurs actions au niveau du segment axonal par la réduction de la fréquence ou de l'intensité des potentiels d'action générés. En particulier au sein de la région CA1 de l'hippocampe, les interneurons producteurs de cholecystokinine sont principalement dédiés à l'inhibition de type *feedforward*<sup>312</sup>. Dans ce circuit «*feedforward*» bien que l'inhibition soit disynaptique, de nombreux autres mécanismes encouragent l'action inhibitrice. Ceux-ci peuvent inclure une réduction du seuil nécessaire à la genèse des potentiels d'action ou encore un renforcement et une efficacité accrue des synapses excitatrices contactant les cellules inhibitrices<sup>313,314</sup>. Conceptuellement cette inhibition *feedforward* peut parvenir à la cellule cible avant que la membrane de cette dernière n'atteigne le seuil nécessaire à la genèse de potentiels d'action restreignant efficacement la fenêtre de temps à l'intérieur de laquelle la cellule cible est autorisée à répondre. Cette exceptionnelle maîtrise temporelle par l'inhibition de type «*feedforward*» a été démontrée dans les cortex visuel, auditif ou dans la région CA1 de l'hippocampe<sup>315-317</sup>.

L'inhibition de type *feedback* quant à elle requiert qu'un neurone exciteur active et recrute un neurone inhibiteur postsynaptique dont des efférences rétrogrades ciblent le neurone exciteur présynaptique (confère figure 6). Ces connections réciproques excitatrices – inhibitrices ont été démontrées dans de multiples circuits<sup>295,318-320</sup>.

Lorsqu'un neurone inhibiteur excité atténue l'activité de neurones postsynaptiques distincts du neurone qui l'excite il s'agit de l'inhibition de type latérale<sup>321</sup> (confère figure 6). Il est important de mentionner que les inhibitions de type *feedback*, *feedforward* et latérale ne sont pas mutuellement exclusives pour un même interneurone.

En plus de leurs actions sur les cellules excitatrices pyramidales, et comme brièvement évoqué précédemment, les interneurons GABAergiques ciblent également d'autres interneurons inhibiteurs<sup>286,322,323</sup> (confère figure 6). En particulier certains interneurons notamment ceux producteurs du neuropeptide VIP contactent spécifiquement un sous type d'interneurones exprimant la parvalbumine ou encore la somatostatine<sup>294,324</sup>. L'ensemble de ces interactions sont à la base des processus de synchronisation et sont impliquées dans la désinhibition des complexes circuits neuronaux<sup>322-325</sup>.

Ainsi ciblant de spécifiques domaines cellulaires des neurones pyramidaux excitateurs, l'inhibition effectuée dans une fenêtre de temps appropriée détient alors la capacité de filtrer l'excitation synaptique et de contrôler les propriétés d'activité des cellules pyramidales.

### III - 4.3. Rôle dans la régulation des périodes critiques

Rappelons nous, le néocortex est doté d'une propriété fondamentale: la plasticité ou cette capacité d'adaptation à toutes modifications ou changements en réponse à l'expérience, l'entraînement ou l'utilité. La plasticité est à la base de l'apprentissage et de la mémorisation, de l'acclimatation au monde environnant, responsable d'affiner et d'ajuster les mouvements, de prédire et d'obtenir une récompense ou encore du rétablissement fonctionnel après un préjudice. De comprendre les mécanismes de la plasticité synaptique et cellulaire éluciderait les bases de l'apprentissage, de la mémorisation ainsi que des comportements adaptatifs. Preuves de cette incroyable flexibilité, en mimant par des procédures d'induction artificielles ou en effectuant des tâches cognitives, sensorielles ou motrices, le néocortex démontre une haute disposition à l'acquisition. Bien après l'établissement des contacts synaptiques et du développement des oscillations électroencéphalographiques, les circuits neuronaux continuent d'être sujets à de remarquables formes de plasticité notamment au cours des périodes critiques du développement postnatal. La fenêtre temporelle de haute malléabilité la plus étudiée est certainement le phénomène de dominance oculaire (*ocular dominance plasticity*) du cortex visuel. L'absence de stimuli visuels pendant l'enfance résulte en l'amblyopie, perte définitive de l'acuité visuelle d'un œil. Les corrélats cellulaires de l'amblyopie soutiennent que la privation de stimuli visuels d'un œil aboutit, au renforcement des afférences ainsi que l'accroissement du territoire couvert par l'arborisation axonale des neurones thalamiques dans le cortex visuel propre au second œil<sup>326</sup>. Depuis, de nombreuses études ont révélé le rôle crucial des interneurons GABAergiques dans le contrôle de l'ouverture et de la fermeture de période critique. Chez des souris déficientes pour GAD<sub>65</sub>, l'absence de stimuli à PND 25 – PND 27 (pic de la période critique du cortex visuel murin) ne provoque pas de changement dans la dominance oculaire. L'injection de benzodiazépines compense cet effet en augmentant l'activité des récepteurs GABA<sub>A</sub><sup>327,328</sup>, indiquant qu'un certain niveau minimal de GABA

synaptique est nécessaire à l'initiation de la plasticité et au développement des périodes critiques. Les souris *knock-out* pour GAD<sub>65</sub> sont capable de dominance oculaire à tout âge lorsque la privation de stimuli visuel est associée à l'infusion de diazepam<sup>329</sup>, suggérant que lors du développement du cortex visuel, le début de la période critique est décalé indéfiniment en absence du neurotransmetteur GABA et qu'une activation suffisante des récepteurs GABA<sub>A</sub> permet d'enclencher les périodes critiques.

L'activité cérébrale contrôle également l'ouverture des périodes critiques. Il a été démontré qu'après l'ouverture des yeux, l'activité cérébrale du cortex visuel augmente l'expression du BDNF (*brain derived neurotrophic factor*)<sup>330</sup>. En effet la surexpression du BDNF dans les cellules pyramidales résulte en une maturation plus précoce des interneurons produisant la parvalbumine refermant d'autant la période critique du cortex visuel<sup>264</sup>. Par ailleurs la dominance oculaire a été réactivée chez la souris adulte en altérant le réseau périneuronal entourant les interneurons producteurs de parvalbumine<sup>331</sup> ou encore en infusant dans le cortex visuel des antagonistes du récepteur GABA<sub>A</sub><sup>332</sup>. Il semble ainsi qu'en effet un certain niveau de GABA est nécessaire et suffisant au déclenchement des périodes critiques. Or il apparaît que l'atteinte d'un certain seuil, d'une certaine concentration de GABA entrave la plasticité des circuits corticaux. De façon plus probante, la greffe de précurseurs GABAergiques provenant de l'éminence ganglionnaire médiale au sein du cortex visuel provoque la réouverture de la période critique chez la souris adulte, exactement dans les temps où les cellules greffées atteignent leur propre stade de maturation correspondant à la période critique<sup>333</sup>. Basé sur ces résultats, il est probable que le contrôle du ratio entre l'excitation et l'inhibition soit un élément fondamental pour la plasticité dans le cortex visuel. En effet les ajustements homéostatiques équilibrant l'excitation et l'inhibition permettent aux réseaux neuronaux de s'adapter à des variations des stimuli sensoriels<sup>334</sup>. A travers ces nombreuses études, il ressort que les interneurons GABAergiques corticaux sont des éléments majeurs et cruciaux dans la régulation des périodes critiques postnatales.

Ainsi les interneurons participent à la genèse de l'activité synaptique des réseaux neuronaux, étape cruciale pour la maturation et la plasticité des circuits corticaux.

### III - 4.4. Rôle dans les fonctions cognitives

Ainsi que mentionné plus haut, la maturation des circuits inhibiteurs est fortement influencée par l'expérience sensorielle. Des manipulations génétiques permanentes de sous-population spécifique d'interneurones associées aux techniques d'optogénétiques ou pharmacogénétiques couplés à des enregistrements électrophysiologiques ou à des outils d'imagerie sont des approches utiles dans le but d'investiguer la fonction des interneurones GABAergiques corticaux.

Le niveau d'activité d'un neurone croît en réponse à l'augmentation des inputs excitateurs ou à la réduction des inputs inhibiteurs. La pente liant les stimuli à la réponse (*input – output*) est nommée gain et représente la propriété d'un neurone à intégrer des signaux afférents. Cette relation n'est certainement pas fixe et varie, un phénomène connu sous le nom de contrôle du gain<sup>335</sup>. Les changements de gain sont souvent multiplicatifs (ou divisible) car pour la moindre variation dans la relation input-output, la probabilité du neurone de générer un potentiel d'action est affectée par le même facteur et ce quelque soit l'input. Les exemples classiques de modulation du gain sont les neurones du cortex visuel où deux propriétés indépendantes d'un même stimulus visuel (le contraste et l'orientation) interagissent au sein d'un potentiel d'action<sup>336</sup>. Spécifiquement, d'accroître le contraste du stimulus augmente la fréquence des potentiels d'action générés par un neurone du cortex visuel, et ce de façon indépendante de l'orientation de ce stimulus. Ainsi la réponse au stimulus spécifique à une orientation sera conservée quelque soit le contraste. De nombreuses études réalisées ont indiqué l'implication des interneurones producteurs de parvalbumine et de somatostatine dans le contrôle du gain des cellules pyramidales excitatrices du cortex visuel<sup>337,338</sup>. En particulier les cellules exprimant la somatostatine induisent le raffinement dans l'orientation du stimulus pour les cellules excitatrices alors que les neurones producteurs de parvalbumine semblent restreindre le nombre de cellules pyramidales ciblées et impliquées dans la réponse propre à ce stimulus<sup>337,339</sup>.

Les interneurones du cortex visuel ont également été inspectés pour leurs fonctions dans la plasticité des circuits cérébraux (ainsi que développé au point précédent III – 4.3). La suppression pharmacogénétique des cellules à parvalbumine autorise le réseau neuronal de

l'aire corticale visuelle à établir une nouvelle fenêtre temporelle de plasticité de dominance oculaire chez la souris adulte, et ce au delà de la période critique naturelle<sup>340</sup>. Une élégante et récente publication a révélé (i) une relation inverse entre le niveau d'expression de la protéine parvalbumine dans le cortex moteur primaire et les capacités d'apprentissage motrice évaluées par le rotarod; (ii) une faible production hippocampale de la protéine parvalbumine au cours des phases d'apprentissage du test de la piscine de Morris, une fois la tâche acquise les auteurs ont constaté l'émergence d'une expression accrue de la parvalbumine<sup>341</sup>. Ces résultats suggèrent que chez le rongeur adulte, par la modification de l'état de différenciation des interneurons à parvalbumine, l'expérience peut moduler l'apprentissage.

Les oscillations corticales correspondent à des fluctuations rythmées et synchrones de l'activité neuronale et peuvent être recueillies lors d'électroencéphalogrammes de surface ou intracrâniale, de potentiels de champs locaux, d'enregistrements multi-unitaire, ou unitaire. Fréquentes lors de tâches cognitives, de stimulations sensorielles ou de phases de repos, les oscillations corticales sont classifiées selon la fréquence, en delta (0.5 – 4 Hz), thêta (4 – 10 Hz), alpha (8 – 12 Hz), beta (10 – 30 Hz) et gamma (30 – 100 Hz). Plusieurs observations ont mené à l'hypothèse de l'implication des interneurons à parvalbumine dans les ondulations cérébrales de type gamma. Bien que les neurones pyramidaux excitateurs et certains interneurons soient actifs lors des cycles d'oscillations gamma, seuls les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine génèrent des potentiels d'action synchrones et rythmés lors de ces spécifiques fluctuations<sup>342,343</sup>. Par ailleurs la suppression de l'inhibition par ces synapses inhibitrices perturbent la genèse et la synchronisation des oscillations gamma<sup>344</sup> et la modification génétique des synapses excitatrices spécifiquement au niveau des interneurons GABAergiques producteurs de parvalbumine supprime les oscillations gamma<sup>345</sup>. D'autres travaux utilisant des techniques d'optogénétique ont vérifié l'implication des interneurons exprimant la parvalbumine dans les oscillations gamma du cortex somatosensoriel<sup>346,347</sup>.

Les structures de l'hippocampe et du cortex entorhinal encodent entre autre des informations relatives à la représentation du monde extérieur notamment grâce à différents types de cellules dénommées « *place cells* », « *head-direction cells* » et « *grid cells* »<sup>348,349</sup>. La particularité de ces neurones réside dans le fait qu'ils répondent à des stimuli spécifiques provenant de l'environnement spatial<sup>350</sup>. Les innovations technologiques de l'optogénétique ont permis

d'étudier le rôle de certains interneurons GABAergiques dans ces représentations extrêmement complexes. Ainsi il a été démontré que les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine et la somatostatine régulent la fréquence des potentiels d'action générés par les *place cells* de la région CA1 de l'hippocampe<sup>351</sup>. Une action similaire des interneurons à parvalbumine a été révélée sur les *grid cells* de la structure entorhinale<sup>352</sup>.

Le rôle d'interneurons spécifiques a également été étudié dans l'amygdale dans le contexte du conditionnement à la peur. L'activation optogénétique des cellules de l'amygdale exprimant la somatostatine provoque le sursaut chez des animaux non conditionnés alors que leur inhibition atténue le conditionnement à la peur<sup>353</sup>. De même lors de phase d'apprentissage, l'activation optogénétique des cellules exprimant la parvalbumine dans les structures de l'hippocampe et du cortex préfrontal perturbe le conditionnement à la peur<sup>351,354</sup>.

Les interneurons produisant le VIP résident et fonctionnent au sein d'un réseau de cellules très interconnectées. En tant que neurones présynaptiques ils peuvent être considérés comme disciplinant l'activité de la cellule en aval, en position postsynaptique perçus tels des recruteurs d'autres neurones. En terme d'impact, les interneurons producteurs de VIP sont impliqués dans la désinhibition ciblant les interneurons exprimant la somatostatine et la parvalbumine. Ces interneurons à VIP régulent ainsi le gain des cellules excitatrices notamment dans les cortex auditif et préfrontal médial<sup>324</sup>. Ceux ci sont également responsable d'inhibition directe sur les cellules pyramidales. Etant donné ces indications, il n'est pas surprenant qu'au sein du cortex ce type particulier d'interneurons ai été étudié dans le contexte de l'acquisition des mémoires associatives liées à la peur<sup>322</sup>.

Des enregistrements électrophysiologiques réalisées dans le cortex somatosensoriel primaire ont démontré que seules les cellules produisant de la somatostatine sont hyperpolarisées et réduisent la genèse de leurs potentiels d'action en réponse à l'inflexion des vibrisses, *a contrario* des neurones pyramidaux environnants<sup>355</sup>. D'autres études révèlent l'importance des interneurons à parvalbumine et exprimant le peptide intestinal vasoactif dans les voies corticales sensibles<sup>296,356</sup>.

Le bulbe olfactif est une structure particulière puisque de nouveaux neurones excitateurs ainsi que des interneurons GABAergiques s'incorporent dans ses réseaux tout au long de la vie. Des manipulations optogénétiques sur ces cellules ont montré leurs implications dans

l'inhibition des cellules mitrales et dans l'apprentissage de la discrimination et la mémorisation face à de nouvelles odeurs<sup>357</sup>.

A la vue de ces données soulignant l'importance des nombreux rôles attribués aux interneurones GABAergiques, il est particulièrement aisé d'entrevoir les conséquences dramatiques de leurs affections.

### **III - 5. Interneuropathies**

Les interneurones GABAergiques jouent ainsi un rôle prépondérant dans la mise en place des réseaux neuronaux corticaux et ce lors de différentes étapes du développement du cerveau. Au cours de la maturation des circuits, les interneurones exercent de multiples fonctions: par la relâche de GABA ils promeuvent la prolifération et la migration, favorisent la maturation synaptique, instaurent la synchronisation des réseaux immatures. Par la complexité et la diversité de leurs rôles, les interneurones GABAergiques sont d'une importance cruciale dans le développement des fonctions cognitives.

#### **III - 5.1. Interneurones et schizophrénie**

Les circuits GABAergiques sont affectés par de nombreux déficits chez les patients humains atteints de schizophrénie<sup>358</sup>. Sans que le nombre d'interneurones ne soit affecté, des réductions sélectives de l'enzyme GAD<sub>67</sub> et de la protéine parvalbumine ont été constatées dans les cellules de la couche III à V du cortex préfrontal de patients schizophrènes<sup>359</sup>. Par ailleurs chez ces patients, l'expression de la sous-unité alpha 1 du récepteur GABA<sub>A</sub> est réduite dans les neurones pyramidaux excitateurs corticaux au niveau des sites postsynaptiques faisant face aux neurones producteurs de parvalbumine<sup>360</sup>. D'autre part, les altérations dans l'activité oscillatoire enregistrée sur le cortex d'individus schizophrènes, en particulier les changements constatés dans le profil des oscillations gamma reflètent probablement l'affection des interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine dans le spectre de ce désordre neurodéveloppemental<sup>361</sup>. Toutefois, la réduction de l'expression de la



parvalbumine et de GAD<sub>67</sub> dans les interneurons peut tout aussi bien être secondaire *id est* être le fruit de la réduction de l'activité des cellules excitatrices pyramidales et ainsi altérer les profils d'oscillations cérébrales.

Il existe de nombreuses évidences certifiant l'implication des interneurons dans la survenue de la schizophrénie. Des variants génétiques dans le gène *DTNBP1* codant pour la dysbindine prédisposent à la schizophrénie<sup>362</sup> et il a été démontré que son expression est réduite dans le cortex préfrontal de patients schizophrènes<sup>363</sup>. Les polymorphismes, les variants génétiques ou les délétions dans les gènes *NRG1* (*neuregulin*) et de son récepteur à tyrosine kinase *ErbB4* sont associés avec des risques accrus de schizophrénie et d'aberrations dans le développement des interneurons<sup>364</sup>. Dernièrement il a été démontré que la protéine ErbB4 est exprimée exclusivement dans les cellules inhibitrices en particulier les interneurons produisant la parvalbumine; ErbB4 est également impliquée dans la formation de synapses provenant des interneurons Chandelier sur les axones des cellules pyramidales et dans la formation des synapses glutamatergiques sur les interneurons parvalbumine<sup>365</sup>. D'autres évidences suggèrent l'implication de la voie de signalisation NRG1-ErbB4 dans la migration des interneurons immatures.

S'ajoutant à la diminution des afférences excitatrices corticales, il est aussi probable que les interneurons dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale et en particulier les cellules productrices de parvalbumine établissent un réseau neuronal inadéquat à la transmission de l'information synaptique chez les patients schizophrènes. Etant donné le rôle du facteur circulant BDNF dans la maturation des interneurons à parvalbumine, il est probable que la voie de signalisation de BDNF et d'un de ces récepteurs TrkB (*tropomyosin receptor kinase B*) contribue à l'étiologie de la schizophrénie. Chez une souris démunie de TrkB spécifiquement dans les interneurons à parvalbumine, il a été démontré une réduction des afférences excitatrices glutamatergiques sur les cellules productrices de parvalbumine mais également une diminution des fibres axonales inhibitrices GABAergiques sur les cellules excitatrices<sup>366</sup>. Finalement une preuve importante est apportée par la découverte de polymorphismes dans le gène *GADI* associé à des formes juvéniles de schizophrénie<sup>367</sup>.

### III - 5.2. Interneurones et autisme/déficience intellectuelle

Les déficits dans la signalisation GABAergique sont aussi impliqués dans l'autisme, un autre désordre dans le développement neuronal. De nombreuses études ont révélé un déséquilibre dans l'excitation glutamatergique et l'inhibition GABAergique chez des patients autistiques. L'autisme est fortement corrélé à l'hyperexcitabilité des réseaux neuronaux, 30% des enfants souffrant d'autisme sont atteints de crises d'épilepsie<sup>368</sup>. L'expression des enzymes GAD<sub>65</sub> et GAD<sub>67</sub><sup>369,370</sup> ainsi que la production des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub><sup>371,372</sup> sont réduits dans le cortex des patients autistiques. Par ailleurs l'utilisation de modèles animaux de l'autisme a permis de mettre en évidence des altérations spécifiques aux cellules exprimant la parvalbumine. Les souris détentrices d'une mutation dans le gène *uPAR* (*urokinase plasminogen activator receptor*), gène associé à l'autisme<sup>373</sup>, présentent une diminution de 50% du nombre d'interneurones GABAergiques corticaux dont une absence totale des cellules exprimant la parvalbumine corrélée à un phénotype épileptique et modélisant les traits autistiques<sup>374</sup>.

Des études génétiques ont révélé que des mutations *de novo* ou des polymorphismes dans des gènes codant pour des protéines essentielles pour la signalisation GABAergique sont également associées à la déficience intellectuelle non-syndromique. Par exemple des mutations ou des variants génétiques impliqués dans des formes d'autisme ont été découverts dans les gènes *NRXN* (*neurexin*) et *NLG* (*neuroligin*) codant pour des protéines d'adhésion cellulaire exprimées autant à la surface des synapses excitatrices que des synapses inhibitrices<sup>375</sup>. Néanmoins il existe au moins une évidence dans laquelle une mutation ponctuelle dans le gène *NLG* associé à l'autisme augmente la transmission GABAergique sans affecter la fonction de la synapse excitatrice<sup>376</sup> provoquant une perte des interneurones GABAergiques producteurs de parvalbumine<sup>377</sup>. De plus, un risque accru d'atteinte de l'autisme est associé à des polymorphismes dans les gènes *DLX1/2* (*distal less X*) gouvernant la migration et la différenciation des interneurones GABAergiques<sup>378,379</sup>.

Le syndrome de Rett est majoritairement causé par des mutations dans le gène *MeCP2* (*methyl CpG binding protein 2*) localisé sur le chromosome X. MeCP2 est un facteur de régulation de la transcription notamment pour les gènes *UBE3A*, *GABRB3* et *DLX5* pour lesquels les

mutations sont associées à un risque élevé d'autisme et/ou d'épilepsie<sup>380-382</sup>. Bien que MeCP2 soit ubiquitaire, son expression est plus importante dans les interneurons GABAergiques. Ainsi, la souris déficiente pour MeCP2 exclusivement dans les interneurons récapitule le phénotype du syndrome de Rett<sup>92</sup>.

Le syndrome du X fragile recèle également d'évidents déficits dans la signalisation GABAergique. Les souris mutantes pour le gène *FMRI* sont enclines à déclencher des crises d'épilepsie, preuve d'un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition. Des altérations dans la voie de signalisation du récepteur métabotrope sensible au glutamate mGluR5<sup>383</sup>, une réduction de la densité ainsi qu'une mauvaise distribution des cellules productrices de parvalbumine<sup>384</sup>, une diminution de l'expression corticale de différentes sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub><sup>385</sup> contribuent à l'hyperexcitabilité neuronale et à exacerber le phénotype modélisant l'autisme chez la souris *knockout* pour *FMRI*.

Même si la majorité des travaux présentés ci-dessus révèlent une réduction de la transmission synaptique inhibitrice dans des troubles du développement neuronal associés à l'autisme, quelques études réalisées sur des modèles animaux mettent l'évidence sur l'augmentation de la signalisation GABAergique dans des troubles relatifs à l'autisme<sup>376</sup>.

### III - 5.3. Interneurones et épilepsie

Comme discuté précédemment, le développement et la fonction des réseaux neuronaux dépendent d'une modulation appropriée de l'excitation par l'inhibition. L'épilepsie survient à la suite d'un grand nombre de troubles cérébraux. Le processus d'épileptogenèse peut se déclencher après un trauma, un accident vasculaire cérébral, une hypoxie – ischémie encéphalopathique, une fièvre néonatale, une malformation corticale ou être d'origine génétique<sup>386-391</sup>.

Les atteintes traumatiques du cerveau résultent souvent en des changements neuronaux et peuvent éventuellement mener à long terme à la réorganisation des circuits neuronaux. L'épilepsie post-traumatique démontre des signes pathophysiologiques relatifs à une atteinte du système GABAergique. Pour preuve, des évidences existent quant à la perte de cellules GABAergiques inhibitrices suite à des injures cérébrales expérimentales effectuées sur des

modèles animaux<sup>392</sup>. Chez l'être humain souffrant d'épilepsie du lobe temporal, l'analyse *post-mortem* du gyrus dentelé révèle une perte conséquente de la population d'interneurons de l'hilus. Cet appauvrissement est accompagné d'une réduction de l'inhibition synaptique des cellules granulaires<sup>392</sup>.

Il est également probable que des altérations dans le patrimoine génétique des interneurons puissent contribuer à l'émergence d'épilepsies. En effet, ces défauts dans l'inhibition sont parfois la conséquence de mutations génétiques dont les répercussions perturbent la genèse ou/et la fonction des interneurons. Par exemple l'épilepsie généralisée associée à des crises fébriles est une condition génétique consistant en des attaques fébriles conjuguées à un autre type de crise (absence, myoclonique, atonique ou crise généralisée tonique-clonique non-fébrile)<sup>393</sup>. L'analyse du pedigree de certaines familles a suggéré une transmission mendélienne de type autosomique dominante de ce trouble qui concerne le chromosome 19. Dans cette condition, une mutation dans le gène *SCN1B* (*voltage-gated sodium channel  $\beta 1$* ) modifie les caractéristiques et les propriétés de ce canal sodique. Ce canal muté exprimé dans des oocytes de grenouille augmente l'influx de courant sodique; dans les neurones la mutation provoque une dépolarisation et ainsi l'hyperexcitabilité<sup>394</sup>. Depuis cette découverte, d'autres mutations ont été associées à l'épilepsie généralisée associée à des crises fébriles et identifiées dans les gènes *SCN1A*, *SCN2A* et *GABRG2* (codant pour une sous unité du récepteur GABA<sub>A</sub>)<sup>395,396</sup>. En particulier certaines mutations dans le gène *SCN1A* sont les causes d'épilepsie infantile sévère associée à des crises myocloniques, le syndrome de Dravet<sup>397</sup>. Certes, les canaux sodiques sont des protéines ubiquitaires pourtant il a été démontré que leur perte résultait en des déficits sélectifs et plus conséquents sur les interneurons produisant la parvalbumine<sup>398</sup>. Et la délétion du canal sodique Nav1.1 par *Emx1.Cre* ne cause aucun déficit notable chez la souris<sup>398</sup>. Nous pourrions citer d'autres exemples appuyant l'implication des interneurons dans le développement de l'épilepsie. Le gène *NKX2.1* assure la détermination alors que *SOX6* est nécessaire à la migration et à la maturation des interneurons dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale. Il n'est pas surprenant que dans des modèles animaux les délétions des gènes *NKX2.1* ou *SOX6* induisent une épilepsie généralisée<sup>239,240</sup>.

## Hypothèses et objectifs

Bien que la déficience intellectuelle soit hétérogène, engageant de nombreuses et diverses voies intracellulaires, plusieurs évidences suggèrent qu'elles convergent toutes vers une atteinte du développement et/ou de la fonction de la synapse. Jusqu'à récemment tous les gènes associés à la déficience intellectuelle non syndromique ont été recensés sur le chromosome X ou dans les gènes à transmission autosomique récessive. Grâce aux techniques permettant la capture de l'exome et le séquençage de l'ADN génomique, notre laboratoire a précédemment reporté les premières mutations pathogéniques dans le gène à transmission autosomique dominante *SYNGAP1*. *SYNGAP1* code pour une RasGAP, régule la maturité des synapses glutamatergiques, régleme ainsi la plasticité synaptique et la balance entre l'excitation et l'inhibition dans l'hippocampe aussi bien que dans le néocortex. D'altérer la séquence génomique de *SYNGAP1* engendre fort probablement de dramatiques conséquences au niveau des circuits neuronaux. Le groupe du Dr Michaud a montré que les mutations *de novo* dans le gène autosomique *SYNGAP1* puissent expliquer une fraction des cas de déficience intellectuelle non syndromique. Cependant les conséquences fonctionnelles de ces mutations *de novo* n'ont pas été établies. Nous avons émis l'assomption selon laquelle les mutations *de novo* dans le gène *SYNGAP1* associées à la déficience intellectuelle engendrent la perte de fonction de la protéine (Hypothèse 1). Les objectifs de cette étude sont l'identification et l'étude de l'impact fonctionnel de mutations *de novo* dans le gène *SYNGAP1*.

Alors que de nombreuses certitudes révèlent le rôle crucial de *SYNGAP1* pour les neurones glutamatergiques, peu d'écrits illustrent son impact sur les interneurons GABAergiques corticaux. Pourtant nous avons soumis l'hypothèse selon laquelle l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* affecte l'inhibition synaptique imposée par les interneurons GABAergiques sur les circuits corticaux (Hypothèse 2).

Les enjeux de mon projet de PhD sont: 1) d'identifier l'impact de mutations humaines dans la fonction de *SYNGAP1*; 2) de déterminer si *SYNGAP1* contribue au développement et à la fonction des circuits GABAergiques; 3) de révéler comment l'haploinsuffisance de *Syngap1* restreinte aux circuits GABAergiques affecte le comportement et la cognition.

Les résultats de ces travaux sont exposés dans les chapitres sous-jacents.

**Chapitre II: Mutations in *SYNGAP1* cause intellectual disability, autism and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency.**

*Human Mutation* 2013 Feb;34(2):385-94. doi: 10.1002/humu.22248. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23161826

## **Mutations in *SYNGAP1* cause intellectual disability, autism and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency.**

Martin H. Berryer<sup>1</sup>, Fadi F. Hamdan<sup>1</sup>, Laura L. Klitten<sup>2,3</sup>, Rikke S. Møller<sup>2,3</sup>, Lionel Carmant<sup>1</sup>, Jeremy Schwartzentruber<sup>4</sup>, Lysanne Patry<sup>1</sup>, Sylvia Dobrzeniecka<sup>5</sup>, Daniel Rochefort<sup>5</sup>, Mathilde Neugnot<sup>1</sup>, Jean-Claude Lacaille<sup>6</sup>, Zhiyv Niu<sup>7</sup>, Christine M. Eng<sup>7</sup>, Yaping Yang<sup>7</sup>, Sylvain Palardy<sup>8</sup>, Céline Belhumeur<sup>9</sup>, Guy A. Rouleau<sup>5</sup>, Niels Tommerup<sup>3</sup>, LaDonna Immken<sup>10</sup>, Miriam H. Beauchamp<sup>1</sup>, Gayle Simpson Patel<sup>10</sup>, Jacek Majewski<sup>4,11</sup>, Mark A. Tarnopolsky<sup>12,13,14</sup>, Klaus Scheffzek<sup>15</sup>, Helle Hjalgrim<sup>2,16</sup>, Jacques L. Michaud<sup>1\*</sup>, and Graziella Di Cristo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre of Excellence in Neurosciences of Université de Montréal and Sainte-Justine Hospital Research Center, Montréal, Canada; <sup>2</sup>Danish Epilepsy Centre, Dianalund, Denmark; <sup>3</sup>Wilhelm Johannsen Centre for Functional genome Research, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; <sup>4</sup>McGill University and Genome Quebec Innovation Center, Montréal, Canada; <sup>5</sup>Center of Excellence in Neuroscience of Université de Montréal, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; <sup>6</sup>Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Department of Physiology, Université de Montréal, Montréal, Canada; <sup>7</sup>Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, USA; <sup>8</sup>Department of Psychiatry, Sainte-Justine Hospital, Montréal, Canada; <sup>9</sup>Department of Pediatrics, Sainte-Justine Hospital, Montréal, Canada; <sup>10</sup>Specially for Children, Austin, USA; <sup>11</sup>Department of Human Genetics, McGill University, Montréal, Canada; <sup>12</sup>Medical Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada; <sup>13</sup>Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, Canada; <sup>14</sup>Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, Canada; <sup>15</sup>Biocenter - Division Biological Chemistry, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria; <sup>16</sup>Institute of Regional Health Services Research, University of Southern Denmark, Odense, Denmark.

**Key words: SYNGAP1, haploinsufficiency, intellectual disability, autism, epilepsy**

## Abstract

*De novo* mutations in *SYNGAP1*, which codes for a RAS/RAP GTP-activating protein, cause non-syndromic intellectual disability (NSID). All disease-causing point mutations identified until now in *SYNGAP1* are truncating, raising the possibility of an association between this type of mutations and NSID. Here, we report the identification of the first pathogenic missense mutations (c.1084T>C [p.W362R]; c.1685C>T [p.P562L]) and three novel truncating mutations (c.283dupC [p.H95PfsX5]; c.2212\_2213del [p.S738X]; (c.2184del [p.N729TfsX31]) in *SYNGAP1* in patients with NSID. A subset of these patients also showed ataxia, autism, and a specific form of generalized epilepsy that can be refractory to treatment. All of these mutations occurred *de novo*, except c.283dupC, which was inherited from a father who is a mosaic. Biolistic transfection of wild-type *SYNGAP1* in pyramidal cells from cortical organotypic cultures significantly reduced activity-dependent pERK levels. In contrast, constructs expressing p.W362R, p.P562L or the previously described p.R579X had no significant effect on pERK levels. These experiments suggest that the *de novo* missense mutations, p.R579X, and possibly all the other truncating mutations in *SYNGAP1* result in a loss of its function. Moreover, our study confirms the involvement of *SYNGAP1* in autism while providing novel insight into the epileptic manifestations associated with its disruption.



## Introduction

Intellectual disability (ID) is a common neurodevelopmental disorder that is defined by the presence of significant limitations in both cognitive and adaptive behaviors with onset before the age of 18. ID can be classified into syndromic and non-syndromic ID (NSID) forms, which, in the case of the former, is characterized by the presence of morphologic or metabolic features. Both forms of ID can also be associated with epilepsy and/or autism spectrum disorders (ASD).

Recent studies indicate that *de novo* mutations in the *SYNGAP1* gene (OMIM 603384) are a cause of NSID. In total, seven *de novo* point mutations (affecting 1 or few nucleotides), all resulting in the truncation of the protein, have been reported in *SYNGAP1* in patients with moderate-to-severe ID (Hamdan, et al., 2011a; Hamdan, et al., 2011b; Hamdan, et al., 2009; Vissers, et al., 2010). A subset of these patients also showed mild generalized epilepsy and one of them had a diagnosis of autism. In addition, a balanced translocation disrupting *SYNGAP1* as well as deletions (112 – 813 Kb) encompassing *SYNGAP1* have been described in patients with ID (Klitten, et al., 2011; Krepischi, et al., 2010; Pinto, et al., 2010; Zollino, et al., 2011). Several of these patients with chromosomal rearrangements also showed generalized epilepsy and one of them had a diagnosis of autism (Klitten, et al., 2011; Pinto, et al., 2010; Zollino, et al., 2011).

*SYNGAP1* encodes a brain-specific RAS GTPase-activating protein that is part of the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR) complex. RAS has a slow intrinsic GTPase activity, and GTPase-activating proteins such as SYNGAP1 negatively regulate RAS by enhancing the hydrolysis of GTP to GDP (Ligeti, et al., 2012). RAS has been shown to play an important role in a form of synaptic plasticity called long-term potentiation (LTP), in part by modulating  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole propionate receptors (AMPA) trafficking during long-term potentiation (Qin, et al., 2005). RAS appears to induce AMPAR insertion at the synaptic membrane by activating the MEK-ERK pathway. As expected, *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice show increased activation of the MEK-ERK pathway, increased insertion of AMPAR at the synaptic membrane, and impaired learning and memory (Carlisle, et al., 2008; Komiyama, et al., 2002; Rumbaugh, et al., 2006). SYNGAP1 thus appears to function as a key link between NMDAR, RAS and AMPAR trafficking, possibly restricting the length of time over which RAS remains

activated during LTP. SYNGAP1 can also regulate the activity of RAP, a small guanine nucleotide binding protein related to RAS (Krapivinsky, et al., 2004; Pena, et al., 2008). However, the relationship between SYNGAP1 and RAP in the context of synaptic plasticity remains unclear.

All point mutations documented so far in *SYNGAP1* are predicted to truncate the protein. This observation raises the possibility of a specific association between this type of *SYNGAP1* mutation and NSID. In addition, the mechanisms by which these mutations disrupt SYNGAP1 function have not yet been explored. We report here the identification of five novel *SYNGAP1* mutations in NSID patients, including two *de novo* missense, two *de novo* truncating mutations, and one truncating mutation inherited from a mildly affected parent who is a mosaic. To assess the functional impact of *SYNGAP1* mutations, we developed an assay to measure SYNGAP1 activity in cortical organotypic cultures. We found that the missense mutations abolish the ability of SYNGAP1 to inhibit ERK activation, suggesting that they cause ID by inducing *SYNGAP1* haploinsufficiency. Comparison of these five new patients with those previously described also allowed us to gain insight into the phenotypic spectrum associated with *SYNGAP1* disruption.

## Methods

### Subjects

For targeted sequencing of *SYNGAPI*, we screened a total of 32 sporadic cases of NSID belonging to two cohorts, one recruited at the Danish Epilepsy Center (Dianalund, Denmark) and the other one recruited at the Sainte Justine Hospital (Montréal, Canada). The first cohort consisted of 16 subjects diagnosed with NSID and various forms of generalized epilepsy, including myoclonic astatic epilepsy (n=10), myoclonic absence epilepsy (EMA; n=3), Lennox-Gastaut syndrome (n=2), and West syndrome (n=1). The second cohort consisted of 16 patients diagnosed with NSID, including 6 with generalized epilepsy, 3 with autism, and one with both autism and generalized epilepsy. We also performed exome sequencing on two additional sporadic cases of NSID. One of these cases was studied in the context of an ongoing research project centered on children with various rare disorders (FORGE consortium, Canada), while exome sequencing was performed on a clinical basis in the other case. Array genomic hybridization (Affymetrix 6.0 SNP chip or comparative genome hybridization with an array containing 135K oligonucleotides) performed in all NSID cases studied here did not reveal any pathogenic copy number variant,

### ***SYNGAPI* targeted sequencing and TA cloning**

Genomic DNA was extracted from whole blood or saliva samples (which were obtained after approval by institutional ethics committees) according to standard procedures. PCR amplification of all *SYNGAPI* exons and intronic splice junctions (NM\_006772.2) and subsequent Sanger sequencing was performed as previously described (Hamdan, et al., 2009). Mutations were confirmed by sequencing both strands at the Genome Quebec and McGill Innovation Center (Montreal, Canada).

To measure the ratio of mutant (c.283dupC in exon-3 of *SYNGAPI*) and wild-type alleles, PCR products were generated from paternal and proband genomic DNA using primers flanking exon-3 (Forward [3F]: 5'-TCCAGTCACCAAGTGTGGAG and Reverse [3R]: 5'-TCGGGAAGCAAGACTTTGT), and cloned into pCR4-Topo (Invitrogen). Plasmids were

isolated from individual clones and verified by restriction digestion to contain an insert with the expected size. Inserts were then Sanger sequenced using the forward primer 3F.

## **Exome capture and sequencing**

Exome sequencing and data interpretation was either done on a clinical diagnostic basis (patient-4) or research basis (patient-5). For the former, exome capture and sequencing was performed at the Whole Genome Laboratory and Medical Genetics Laboratory at Baylor College of Medicine (BCM). Briefly, the exome of patient-4 was captured from his blood genomic DNA using the VCRome 2.1 capture kit (Roche) and sequenced on an Illumina GAIIx (100 bp paired-end reads; 2 lane pools/exome). Data was analyzed using Mercury 1.0 pipeline developed by the Human Genome Sequencing Center at BCM. For Patient-5, exome capture done on blood genomic DNA (Agilent SureSelect Human All Exon 50 Mb kit) and HiSeq2000 sequencing (paired-end 100bp; 3 exomes/lane format) was done at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada. Sequence processing, alignment and variant calling were done as previously described (Srouf, et al., 2012).

All pathogenic *SYNGAP1* mutations reported herein were submitted to the *LOVD* database (<http://www.lovd.nl/SYNGAP1>).

## **Paternity and maternity testing**

Paternity and maternity testing of each proband with a *de novo SYNGAP1* mutation was done using six highly informative unlinked microsatellite markers (D2S1327, D3S1043, D4S3351, D6S1043, D8S1179, D10S677). Briefly, PCR was done on the blood genomic DNA of the probands and their parents using primers flanking each marker, in the presence of specific fluorescent dyes (FAM, VIC, PET and NED purchased from IDT), and then run on an ABI 3730 DNA analyzer. Results were analyzed with the GeneMapper software (Applied Biosystems) using a paternity custom panel. The proband compatibility with the parents was then assessed by comparing his/her alleles with those of the mother and father for each marker using the Mendelian error analysis.

## **Cell culture and transfection**

HEK293 and Neuronal N7 cells (Cederlane) were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Life Technologies) supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and cultured for 48h before protein extraction. In some experiments, the proteasome inhibitor MG132 (1µM; Calbiochem) was added to cell cultures for 14 hours. To verify the efficiency of transfection, the percentage of GFP-positive over GFP-negative cells was counted using an inverted microscope (Nikon ECLIPSE TE300; 20X/0.40).

## ***SYNGAP1* expression constructs**

The full-length open reading frame of human *SYNGAP1* cDNA (NM\_006772.2) was purchased from DF/HCC DNA Resource Core (Harvard Medical School; pENTR223.1-SYNGAP1, clone ID: HsCD00080382). The different point mutations (c.1084T>C [p.W362R], c.1685C>T [p.P562L], and c.1735C>T [p.R579X]) were introduced into the *SYNGAP1* cDNA using QuickChange II site-directed mutagenesis, according to the manufacturer's recommendations (Agilent Technologies). The mutant cDNAs were then cloned into the mammalian expression vector pCMV-IRES2-GFP (Clontech). The absence of other mutations in these constructs was confirmed by sequencing the entire cDNA of *SYNGAP1*.

## **Western blot analysis**

HEK293 or N7 cells were collected and homogenized in fresh, ice-cold RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) with protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation for 15 minutes at 13000rpm, the supernatant was collected. 80µg of total protein were loaded, separated by SDS-PAGE (4%, 10%) and transferred onto a poly-vinylidenedifluoride membrane (PVDF, BioRad). To detect SYNGAP1, we used a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 947 to 1167 of rat SYNGAP1 (Abcam; used at 1:1000), an epitope that is also conserved in the C-terminal

portion of human SYNGAP1. Detection of  $\beta$ -actin (monoclonal mouse antibody anti- $\beta$ -actin; 1:1000, Novus Biologicals) was used as internal loading control. After washing, the membranes were incubated for 1h at room temperature with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (goat polyclonal anti-rabbit IgG (1:10000, Abcam) or rabbit polyclonal anti-mouse IgG (1:10000, Abcam). Finally, protein bands were detected using the Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Results are representative of three independent experiments.

### **Cortical organotypic culture and biolistic transfection**

Brain slice culture preparation was performed as previously described (Chattopadhyaya, et al., 2004). Postnatal day 4-5 mouse pups were decapitated, and brains rapidly removed and immersed in ice-cold culture medium (containing DMEM, 20% Horse serum, 1 mM Glutamine, 13 mM Glucose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5  $\mu\text{m/ml}$  Insulin, 30 mM HEPES, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 0.001% Ascorbic acid). Coronal brain slices of occipital cortex, 400  $\mu\text{m}$  thick, were generated with a Chopper (Stoelting) in ice-cold ACSF. Slices were then placed on transparent Millicell membrane inserts (Millipore), usually two slices/insert, in 30 mm Petri dishes containing 0.75 ml of culture medium. Slices were incubated in a humidified incubator at 34°C with a 5%  $\text{CO}_2$  enriched atmosphere, and the medium changed three times a week. All procedures were performed under sterile conditions.

Constructs to be transfected were incorporated into “bullets” made by coating gold particles (BioRad, 1.6-micron) with 30  $\mu\text{g}$  of the construct of interest. These bullets were used to transfect cortical organotypic slices by gene gun (BioRad) at high pressure (180 psi). Transfected slices were then incubated for 8 days, under the same conditions as described above. To increase neuronal activity, cortical slices were treated with GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicucullin (Sigma, 30  $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes before fixation.

## **pERK immunostaining and quantification**

Organotypic cultures were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4), frozen and thawed in 30% sucrose in PBS, followed by incubation in 10% NGS and 1% Triton. Slices were then incubated overnight at 4°C in 10% NGS, 0.1% Triton and the primary polyclonal antibody against pERK (Thr202/Tyr204) (1:400, Cell Signaling), followed by incubation with Alexa Fluor 555 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (1:400, Molecular Probes) then mounted in Vectashield (Vector Labs). Confocal images were acquired with a Leica SPE and 20x water immersion objective (NA 0.5, Leica). Z-stacks were acquired with a 5µm step, exported as TIFF files, and analyzed using ImageJ software. For each transfected pyramidal cell, pERK positive cells were outlined and the intensity levels were measured, after background subtraction, for both the transfected pyramidal cell and at least 5 neighboring cells in the same confocal plane. The ratio of pERK intensity levels in the transfected *versus* untransfected neighboring cells was then calculated and compared across the different experimental conditions. For each construct, pyramidal cells from at least 4 different mouse pups were transfected, imaged and quantified.

## **Statistical analysis**

Differences between groups were assessed with one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Data are shown as mean ± SEM.

## Results

### Novel mutations in *SYNGAP1* in subjects with NSID

#### ***SYNGAP1* mutations identified by targeted sequencing.**

We sequenced all the coding exons and intronic splice junctions of *SYNGAP1* in 16 Danish individuals diagnosed with NSID and generalized epilepsy. We identified a heterozygous single base duplication (in exon-3) that introduces a premature stop codon at the beginning of *SYNGAP1* (c.283dupC [p.H95PfsX5]) in a single patient (patient-1). This mutation was absent in the mother but was possibly in a mosaic state in the father, as suggested by the reduced signal corresponding to the mutant allele compared to that of the wild-type (Fig.1B).

To investigate whether the father of patient-1 was indeed a mosaic for c.283dupC, as suggested by the chromatogram profile of the sequence, we measured the ratio of wild-type and mutant c.283dupC alleles after cloning and sequencing of PCR products. Analysis of DNA extracted from blood and saliva indicated that ~18 % and ~ 27 %, respectively of the father's PCR products harbored the mutation. In contrast, approximately 43% of the proband's PCR products (blood and saliva DNA) contained the c.283dupC mutation (Fig.1B). All together, these observations suggest that this mutation is indeed found in the mosaic state in the father. Because the parents of the father were not available for testing, we were not able to determine whether one of them was a carrier of c.283dupC. The father attended normal elementary school but needed additional help and dropped out from high school at the age of 15 due to learning difficulties. He suffers from recurrent depression and currently lives on disability aid.

We also sequenced *SYNGAP1* in 16 individuals with NSID recruited at Sainte-Justine Hospital. A subset of these individuals showed autism (n=4) or various forms of generalized epilepsy (n=7). We identified 2 novel missense mutations, one (c.1084T>C [p.W362R]) in an NSID patient with both epilepsy and autism (patient-2) and the other (c.1685C>T [p.P562L]) in an NSID patient with autism but no epilepsy (patient-3). Sanger sequencing showed that



both missense mutations were absent from the blood DNAs of the parents, indicating that they are *de novo* (Fig. 1C,D).

The W362 residue, mutated in patient-2, is conserved in all known vertebrate SYNGAP1 proteins and belongs to the C2 domain, which was shown to positively influence the GAP activity of the protein (Pena, et al., 2008). According to our earlier structure analysis of the C2-GAP domain of SYNGAP1, W362 is located at the C-terminal end of a beta-strand of the C2 domain, followed by a large and presumably flexible loop (Pena, et al., 2008). The effect of its substitution by arginine is difficult to forecast from the C2-GAP crystal structure but clearly implies an increase in the basic character of that position and the possibility of a longer-range contact (Fig. 2A). The P562 residue is located in the GAP domain and is conserved in all known RASGAP proteins, including SYNGAP1 (Fig. 2B; data not shown). P562 is located below the presumed RAS/RAP binding groove in a peptide segment connecting two helices ( $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 5). Although the structure does not suggest an immediate effect on RAS-RASGAP interaction/catalysis, proline is believed to add structural rigidity to the areas it belongs to. In the case of SYNGAP1, the substitution of the proline 562 for leucine would be likely to cause steric clashes of the leucine side chain with the main chain segment derived from a neighboring loop and may therefore destabilize the protein (Fig. 2A). Both p.W362R and p.P562L are predicted damaging to protein function by several widely used *in silico* algorithms, including Polyphen-2 (Adzhubei, et al., 2010), SIFT (Kumar, et al., 2009), and Mutation Taster (Schwarz, et al., 2010).

### ***SYNGAP1* mutations identified by exome sequencing.**

Exome capture and sequencing were performed on a clinical basis in a NSID case (patient-4) and on a research basis in another NSID case (patient-5) as part of the FORGE project on rare disorders. The exome sequencing metrics obtained with paired-end sequencing (2x100 bp) on the Illumina GAIIX (patient-4) and on the HiSeq2000 (patient-5) sequencers showed, in both cases, an average target coverage of >100X, with > 92% of the exome target bases being covered at > 10X. Data analysis identified one novel heterozygous truncating mutation in *SYNGAP1* in each of the exomes, including a 2-bp deletion in patient-4 (c.2212\_2213del [p.S738X]) and a 1 bp-deletion in patient-5 (c.2184del [p.N729TfsX31])

(Fig. 1). No other rare (minor allele frequency < 1% in the 1000 genomes or dbSNP135) potentially deleterious mutations (splicing, nonsense, or missense variants predicted-damaging by SIFT and/or Polyphen-2) in known ID genes (reported in the Human Genome Database, HGMD) were detected in the exomes of patient-4 or -5. Sanger sequencing confirmed that these truncating mutations were present in the respective probands but not in their parents, indicating that they occurred *de novo* (Fig. 1E,F).

Paternity and maternity of all the probands with *de novo* mutations in *SYNGAP1* (patients 2-5) were confirmed using 6 informative microsatellite markers (Supp. Table S1). None of the 5 *SYNGAP1* mutations identified herein was found in 570 healthy controls, including 285 Europeans and 285 previously described French Canadians (Hamdan, et al., 2011a; Hamdan, et al., 2009), nor was present in public SNP databases (dbSNP135, 1000 Genomes, or the Exome Variant Server of the NHLBI Exome Sequencing Project (EVS; <http://evs.gs.washington.edu/EVS>). The c.283dupC was also absent in an additional 99 controls of Danish ethnic background.

## **SYNGAP1 mutant proteins are not stable in cell lines**

A strong case can be made that truncating mutations in *SYNGAP1* affect protein function but the impact of missense mutations is less clear. In order to explore this question, we sought to determine whether these mutations affect the production of the protein. We first expressed wild-type *SYNGAP1* as well as mutant *SYNGAP1* containing either W362R, or P562L, or the previously described R579X (Hamdan, et al., 2009) in HEK293, a non-neuronal kidney cell line. Transfection with pCMV-IRES2-GFP empty vector was used as a control. The efficiency of transfection, evaluated using GFP signal, was not significantly different for the 4 constructs (data not shown). Western blot experiments showed that the endogenous *SYNGAP1* protein is not expressed in HEK293 cells (Fig. 3). On the other hand, cells transfected with the wild-type *SYNGAP1* construct expressed a protein of the expected size (~150 kDa), which could be detected using an antibody directed against the C-terminal portion of *SYNGAP1*. However, this antibody also revealed additional bands ranging from 120 to

90kDa, which may correspond to SYNGAP1 degradation products. Among the different mutant constructs, only the W362R construct resulted in the production of proteins that could be detected in our assay. In this case, we did not observe a band of the expected size (150 kDa) but multiple smaller bands ranging from 110 to 80kDa, which did not however correspond to the additional bands detected with the wild-type construct (Fig. 3). It thus appears that the mutant and wild-type SYNGAP1 proteins are being readily degraded in non-neuronal cells. In order to further characterize the basis of this instability, we decided to block protein degradation using the proteasome inhibitor MG132 (1  $\mu$ M) for 14 hours. MG132 administration did not change the overall pattern of degradation observed in cells transfected with constructs expressing wild-type or mutant SYNGAP1 (Fig. 3). As expected the antibody directed against the C-terminal portion of SYNGAP1 could not detect the protein corresponding to the R579X construct because this truncating mutation lies upstream of the targeted epitope.

The observed instability of SYNGAP1 might be due to the fact that HEK293 cells are non-neuronal, while SYNGAP1 is predominantly expressed in neurons (Kim, et al., 1998). We therefore repeated the same experiment using the immortalized neuronal cell line N7 (Belsham, et al., 2004). Similarly to HEK293 cells, we did not detect the endogenous production of SYNGAP1 protein in N7 cells. However, a unique band corresponding to the full-length protein could be detected in N7 cells transfected with wild-type SYNGAP1, further supporting the hypothesis that wild-type SYNGAP1 degradation is enhanced in non-neuronal cell lines. On the other hand, none of the mutant SYNGAP1 proteins was detected, even after addition of MG132 (Fig. 3). One possible interpretation of this result is that the missense mutations affect the stability of the protein in the context of these cells. Alternatively, the mutations could induce a conformational change, which would render mutant SYNGAP1 unrecognizable to the antibody.

## **Mutant forms of SYNGAP1 are unable to suppress activity-mediated ERK activation in cortical pyramidal neurons**

HEK293 and N7 cell lines do not express detectable levels of the endogenous SYNGAP1 protein (Fig. 3). In mature neurons, SYNGAP1 is found abundantly as part of the postsynaptic density complex (Kim, et al., 1998), which might stabilize and prolong the half-life of the protein. It is, therefore, possible that in HEK293 and N7 cells, SYNGAP1 stability is altered owing to the lack of other interacting postsynaptic proteins. We therefore decided to assess the functional consequences of the expression of the different SYNGAP1 constructs in cortical pyramidal neurons from organotypic slice cultures, which preserve local cortical circuits and recapitulate many aspects of synapse formation, maturation and plasticity (Chattopadhyaya, et al., 2004; Chattopadhyaya, et al., 2007; Opitz-Araya and Barria, 2011)

Previous studies showed that SYNGAP1 inhibits extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation *via* the RAS pathway (Komiyama, et al., 2002). In particular, ERK activation is suppressed in SYNGAP1-overexpressing neurons and enhanced in neurons with little or no SYNGAP1 protein (Rumbaugh, et al., 2006). To investigate whether SYNGAP1 mutants have lost this function, we asked whether their overexpression is able to inhibit the activity-dependent increase in phosphoERK (pERK) in pyramidal neurons in mouse cortical organotypic cultures.

Cortical organotypic cultures were biolistically transfected at equivalent postnatal day (EP) 12 (P4+8 days *in vitro*) with the wild-type or mutant SYNGAP1 constructs. Neuronal activity increases ERK activation, by inducing its phosphorylation. Thus, to increase ERK phosphorylation, cultures were treated with bicucullin (GABA<sub>A</sub> receptor antagonist) for 30 minutes before fixation. pERK levels were then compared between transfected and neighboring, untransfected neurons. As expected, we found that the ratio of pERK intensity in transfected vs neighboring cells was decreased in neurons overexpressing wild-type SYNGAP1 as compared to control neurons expressing GFP only (n=19 for WT SYNGAP1, n=14 for controls, p<0.05, one-way ANOVA, Fig. 4 A1-A2, B). Conversely, pERK levels in

neurons transfected with each of the mutant SYNGAP1 constructs were comparable to neighboring, untransfected cells and to GFP transfected pyramidal neurons (n=22, 14, 11 respectively for W362R, P562L and R579X, Fig. 4 A3-A5, B), indicating that the W362R, P562L and R579X mutations have a negative impact on the ability of SYNGAP1 to inhibit ERK activation. Taken together, these data confirm the involvement of SYNGAP1 in activity-mediated ERK activation and demonstrate that the W362R, P562L and R579X mutations disrupt SYNGAP1 protein function, either by affecting the stability of the protein or by interfering with its GTPase activity.

### **Clinical phenotype of patients with mutations in *SYNGAP1***

We reviewed the clinical profiles of all known patients (n=12) with *de novo* and/or truncating point mutations in *SYNGAP1*, including the five patients described here (Table 1 and Supp. patient description) (Hamdan, et al., 2011a; Hamdan, et al., 2009; Vissers, et al., 2010). All patients presented with developmental delay during the first or second year of life and showed moderate to severe NSID, with the exception of Patient-3 (p.P562L) who was mildly affected. Clinical examination revealed acquired microcephaly in 5 patients and ataxia, a feature not previously reported, in 1 of the patients described here (patient-5). In addition, 5 patients had a diagnosis of autism, including Patient-2 (p.W362R), Patient-3 (p.P562L) and Patient-5 (p.N729TfsX31). Autism was confirmed in 4 of these patients using the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS). Interestingly, Patient-3 showed autistic features early on, at the beginning of the second year of life. A diagnosis of autism was made at 22 months of age and confirmed with the ADOS at 4 years of age in this patient.

Nine patients with mutations in *SYNGAP1* showed generalized epilepsy, with variable types of seizures, including absences, tonic-clonic or myoclonic seizures (Table 1). Control of seizures was good in 5 patients, poor in 2, and unspecified in the remaining two. We sought to determine whether these patients show similar electroencephalographic features. A review of their EEG revealed the presence of generalized epileptic discharges with either a posterior (occipital) predominance or a synchronous bi-occipital onset with rapid secondary

generalization in all of them, except in patient-5, who showed potential epileptic activity in the right vertex (see Fig. 5 with representative EEGs from 2 patients). The EEG of patient-12 was not available to us for examination. Interestingly, EEG showed the presence of a similar pattern in another patient with a mutation in *SYNGAP1* but without any history of epilepsy (patient-3; Supp. information).

## Discussion

We report here the identification of 5 novel mutations in *SYNGAP1* in patients with NSID. The three truncating mutations (p.H95PfsX5, p.S738X, and p.N729TfsX31) are clearly deleterious as they abolish critical functional domains and are located upstream of other truncating mutations previously reported in NSID patients. The two other mutations are the first examples of *de novo* missense mutations in *SYNGAP1*. They are also predicted to be deleterious as they affect conserved residues in the C2 and RASGAP domains, which are important for the RAP/RAS GTPase activity of SYNGAP1 (Kim, et al., 1998; Pena, et al., 2008). We have developed an assay to biologically assess the functional impact of these mutations based on the ability of SYNGAP1 to modulate activity-mediated ERK activation in pyramidal cortical neurons. With this assay, we were able to study SYNGAP1 function in excitatory neurons where it is naturally produced and in the context of organotypic slice cultures, which preserve local circuitry and many aspects of synaptic plasticity.

The use of this validation assay, as well as previous observations, suggest that mutations in *SYNGAP1* cause ID mainly through a mechanism of haploinsufficiency. First, the two missense mutations reported herein seem to render the SYNGAP1 protein unstable, at least in the cell lines studied, and abolish its function in pyramidal neurons of the cortex. Second, some of the truncating mutations in *SYNGAP1* are located at the very beginning of the protein (e.g. p.H95PfsX5, p.K108VfsX25, p.K138X; Fig. 1) and are thus likely to abolish its production. Moreover, we found that the truncating mutation p.R579X, which is located in the middle of the protein in its RASGAP domain, affects its activity in the context of our assay. It is important to underline that all of the truncating mutations abolish C-terminal domains that are involved in the interaction of SYNGAP1 with components of the NMDAR complex (Kim, et al., 1998; Li, et al., 2001), further reinforcing our conclusion that pathogenic mutations in *SYNGAP1* are associated with a loss of its function (Hamdan, et al., 2011a; Hamdan, et al., 2009; Vissers, et al., 2010) (Fig.1). Third, the description of a balanced translocation affecting *SYNGAP1* and deletions encompassing *SYNGAP1* in patients with ID also supports the concept that *SYNGAP1* haploinsufficiency causes ID, even though some of these rearrangements are more difficult to interpret as they involve other genes (Klitten, et al., 2011;

Krepischi, et al., 2010; Pinto, et al., 2010; Zollino, et al., 2011). Finally, mice heterozygous for alleles containing intragenic deletions in *Syngap1* show impaired synaptic plasticity, dendritic spine morphogenesis, and learning (Guo, et al., 2009; Komiyama, et al., 2002; Muhia, et al., 2010). All together, these observations indicate that most if not all *de novo* mutations described until now in *SYNGAP1* are nulls. We, however, cannot exclude the possibility that mutations not yet identified disrupt SYNGAP1 signaling by inducing a dominant-negative effect or by conferring a gain of function. Our validation assay would allow us to distinguish these different effects.

We initially described mutations in *SYNGAP1* in patients with moderate-to-severe ID, with or without mild generalized epilepsy (Hamdan, et al., 2009). With the characterization of additional patients, it is becoming clear, however, that *SYNGAP1* disruption is associated with a broader phenotypic spectrum. We and others have previously described pathogenic mutations in *SYNGAP1* in two patients with ID and autism (Hamdan, et al., 2011a; Pinto, et al., 2010). Remarkably, in this study, patient-3 presented with autistic features early in life and a diagnosis of autism was established during the second year. Similarly, patient-2 and patient-5 were found to be autistic. These observations further strengthen the involvement of *SYNGAP1* in autism. Cognitive impairment also appears to be variable as illustrated by patient-3 who showed a milder form of ID. Moreover, epileptic manifestations associated with *SYNGAP1* mutations are more heterogeneous than initially suspected. Nine out of the twelve patients with *de novo* point mutations in *SYNGAP1* showed generalized epilepsy and most of them showed the same EEG pattern with predominant epileptic activity in the occipital regions (Table 1). While at least 5 of the epileptic patients responded well to treatment with single drugs such as valproic acid or topiramate, patient-1 (c.283dupC) showed a form of EMA that was initially resistant to treatment with several anti-epileptic drugs and patient-2 (p.W362R) showed an intractable form of generalized epilepsy. Likewise, a patient with intractable EMA was recently shown to carry a balanced translocation disrupting *SYNGAP1* (Klitten, et al., 2011). All together, these observations indicate that decrease of SYNGAP1 can result in generalized epilepsy, with a subset of patients showing drug-resistant seizures. Finally, one of the patients reported herein (patient-5) showed ataxia, a feature that has not been previously reported in patients with mutations in *SYNGAP1*. Since *SYNGAP1* disruption appears to cause ID by a mechanism of haploinsufficiency, such phenotypic variability might be explained by

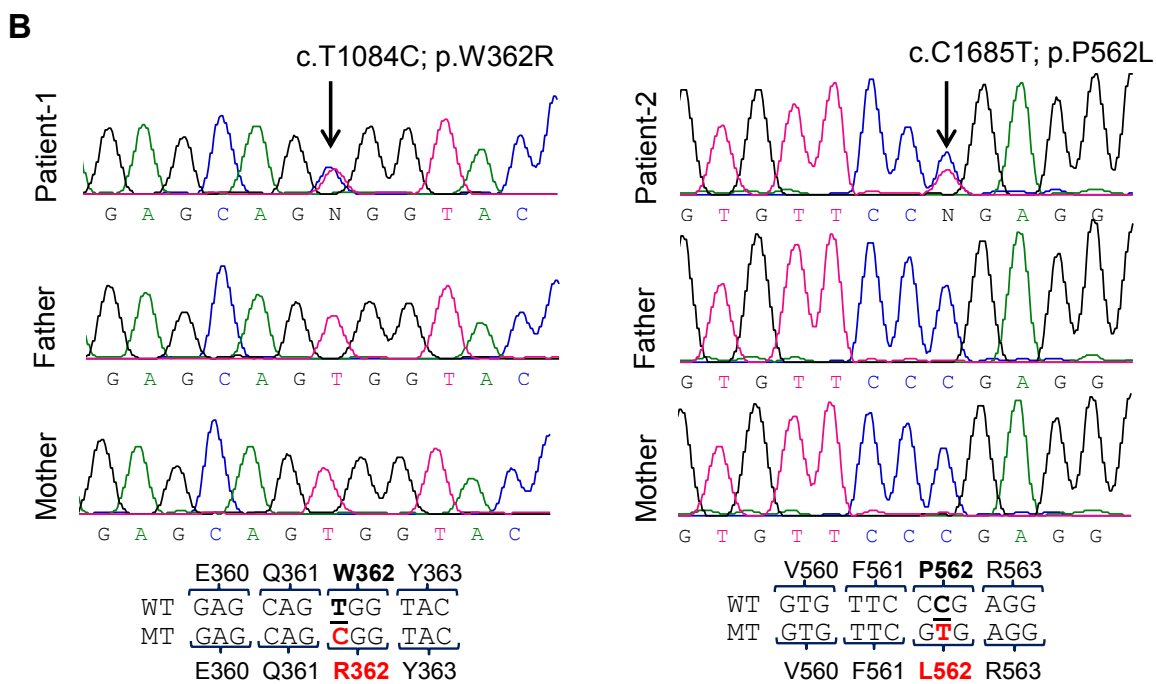
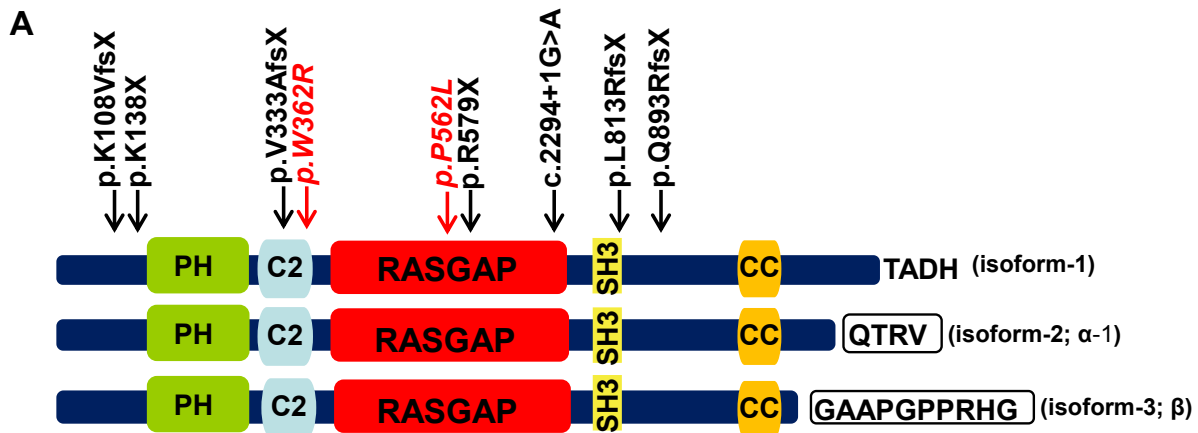


the influence of variants in other genes. Identifying these variants would provide interesting insight into the pathophysiology of ID, autism and epilepsy.

NSID represents a challenge for clinicians because of the lack of specific clinical features that would orientate them towards an etiological diagnosis. With the identification of novel NSID genes, molecular diagnosis will likely play a growing role in the exploration of these patients. In this context, it is important to determine the yield of *SYNGAPI* mutation analysis in patients with NSID. Our group has sequenced the coding region of *SYNGAPI* in a total of 186 individuals with NSID, including the two cohorts reported here and others previously described (Hamdan, et al., 2011a; Hamdan, et al., 2009). These NSID cases were selected on the basis that they were sporadic, that their parents were not related, and that the etiology of their cognitive impairment was unknown despite standard investigations. We found that 11.5% of our patients with epilepsy (6/52) have pathogenic mutations in *SYNGAPI* compared to 8.8% of the patients with autism (3/34) and 0.99 % of the patients with NSID only (1/101). Note that one of the NSID patients with mutations in *SYNGAPI* was counted in both cohorts with epilepsy and autism. Interestingly, all patients from these series with generalized epilepsy predominating in the posterior quadrants had mutations in *SYNGAPI*. The yield of molecular testing is thus likely to be high in this sub-population of patients. Whether *SYNGAPI* mutation analysis is cost-effective in other groups of patients with NSID will require the study of larger cohorts.

## **Acknowledgements**

J.L.M. holds a National Scientist Award from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. G.D.C holds a Canada Research Chair. We thank Stefan Welti for assistance with Fig. 2 and the patients and their parents for participating in this study. We are grateful to Dr. Nicole Leclerc for help with cell culture experiments and Dr. Myriam Srour for helpful discussions.

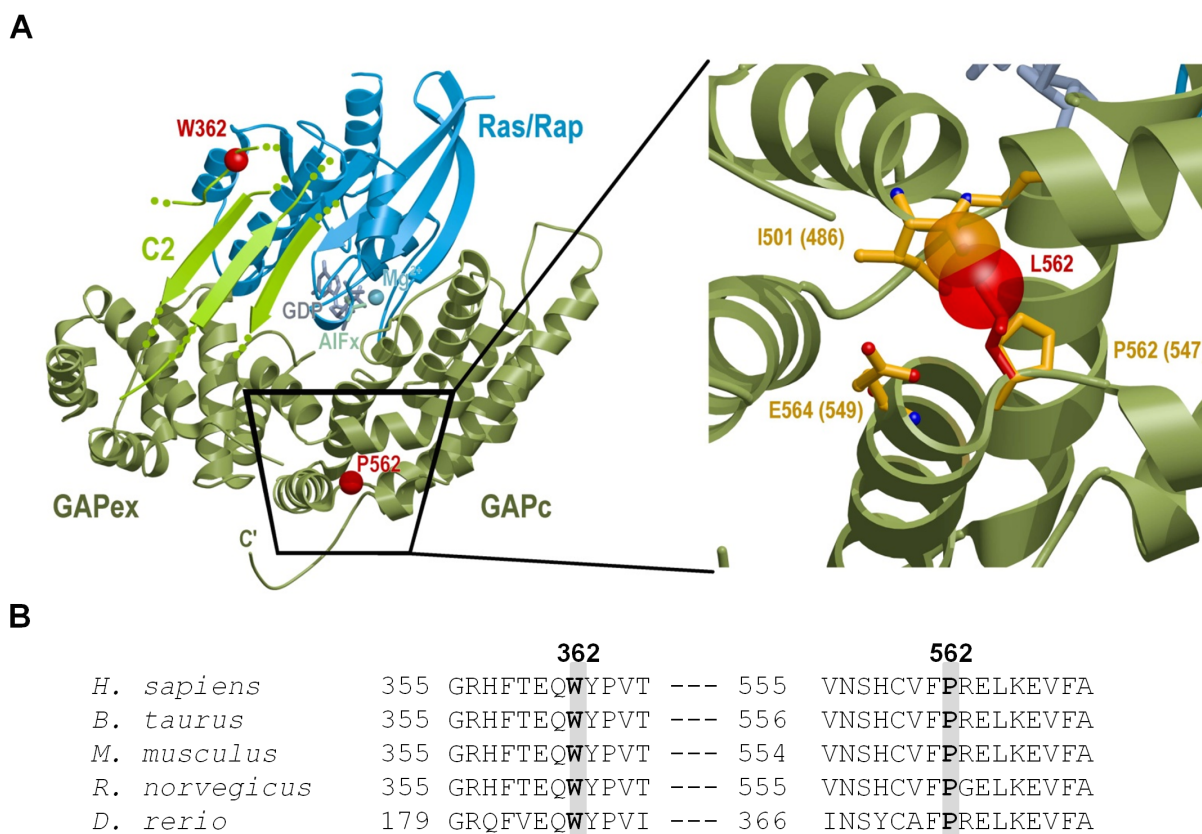


**C**

	362	562
<i>H. sapiens</i>	355 GRHFTEQWYPVT	555 VNSHCVFPRELKEVFA
<i>B. taurus</i>	355 GRHFTEQWYPVT	556 VNSHCVFPRELKEVFA
<i>M. musculus</i>	355 GRHFTEQWYPVT	554 VNSHCVFPRELKEVFA
<i>R. norvegicus</i>	355 GRHFTEQWYPVT	555 VNSHCVFPGELKEVFA
<i>D. rerio</i>	179 GRQFVEQWYPVI	366 INSYCAFPRELKEVFA

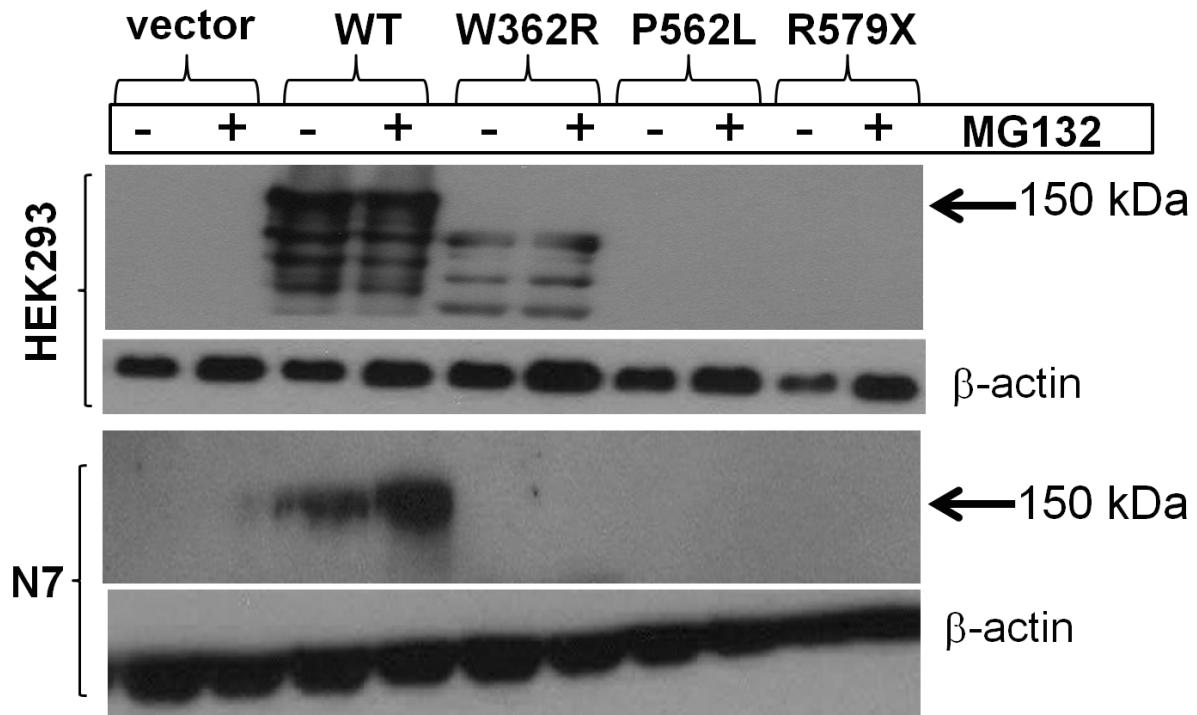
**Figure 1: Pathogenic point mutations in *SYNGAP1* identified in patients with NSID.**

(A) Localization of the *SYNGAP1* mutations identified in this study: p.H95PfsX5, p.W362R, p.P562L, p.S738X, p.N729TfsX31 (in red/italics) and in others: p.K138X, p.R579X, p.L813RfsX23 (Hamdan et al. 2009), p.V348AfsX70 (Vissers et al. 2010), p.K108VfsX25, p.Q893RfsX184, c.2294+1G>A (Hamdan et al. 2011a). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the NCBI reference sequence number NM\_006772.2 (isoform  $\alpha$ -2; 1343 amino acids), while the amino positions are based on the corresponding NCBI reference sequence number NP\_006763.2. The various predicted functional domains are highlighted: PH, pleckstrin homology domain (pos. 150–251), C2 domain (pos. 263–362), RASGAP (pos. 392–729), SH3 (pos. 785–815), coiled coil (CC; pos. 1189–1262), T/SXV Type 1 PDZ-binding motif (“QTRV;” isoform  $\alpha$ -1), and CamKII binding (“GAAPGPPRHG;” isoform- $\beta$ ). (B) Chromatograms showing presence of c.283dupC mutation in blood and saliva DNA from patient-1 and her father but not in the mother’s blood DNA. Note that the signal peak corresponding to c.283dupC allele in the father is considerably lower than that of the wildtype allele, suggesting mosaicism (upper panel). Allele frequencies counted by TA cloning PCR products followed by Sanger sequencing. The numbers of colonies corresponding to the wild-type (WT) or mutant allele (MT; c.283dupC) that were identified are indicated within each of the bars in the graph (lower panel). (C-E) Chromatograms showing the presence of p.W362R, p.P562L, p.S738X, and p.N729TfsX31 mutations in the patients’ blood DNA and not in the DNAs of their corresponding parents.



**Figure 2: Potential impact of the p.W362R and p.P562L mutations on SYNGAP1 structure.** (A) Location of missense mutations in the C2-GAP portion of SYNGAP1, as derived from the structure of rat SYNGAP1 (PDB code 3BXJ), which shares 99.9% identity with the human orthologue. The position of Ras/Rap was modeled according to the complex between Ras and the GAP domain from p120GAP (Scheffzek, et al., 1997). The mutated positions are indicated as red balls in the overview structure (left panel). The P562L substitution was modeled (in red, right panel, boxed zoom) using the program COOT (Emsley and Cowtan, 2004) and displayed using molscript and Raster3D/povray (Fenn, et al., 2003). Numbers in brackets refer to the construct numbering used in the C2-GAP structure. Van der Waals radii were included as transparent spheres for the atoms potentially causing steric hindrance thereby possibly destabilizing the protein. The environment of W362 is difficult to define due to the high disorder of the C2 domain in the C2-GAP crystal structure (Pena et al. 2008). (B) Amino acid alignments of human SYNGAP1 (*H. sapiens*: NP\_006763.2) and its

orthologues (*B. taurus*: NP\_001192395.1, *M. musculus*: XP\_990642.3; *R. norvegicus*: NP\_851606.3; *D. rerio*: XP\_001919204.2) were generated using homogene (NCBI) and the amino acid sequences corresponding to SYNGAP1 W362 and P562 and flanking residues are shown.



**Figure 3: SYNGAP1 mutant proteins are unstable in HEK293 and N7 cells.**

Representative western-blot of the different constructs expressed in HEK293 and N7 cells in presence or absence of the proteasome inhibitor MG132, which was applied for 14h, 34h after transfection with pCMV-IRES-GFP carrying either no insert (vector) or SYNGAP1 wild-type (WT) or the SYNGAP1 mutant cDNAs (W362R, P562L, R579X). Same amount of protein was loaded in all the experiments. In N7 cells only the wild-type form of SYNGAP1 protein is detected as a single band of ~150 kDa, while in transfected HEK293 cells, a band corresponding to SYNGAP1 expected size (150 kDa) was detected along with several other bands of lower molecular weight. No bands corresponding to the expected size of SYNGAP1 mutant proteins were detected in N7 cells or HEK293 cells. Treatment with MG132 increased the amount of wild-type SYNGAP1 detected in N7 cells but not in HEK293 cells.

**Table I:** Phenotype of patients with point mutations in *SYNGAP1*

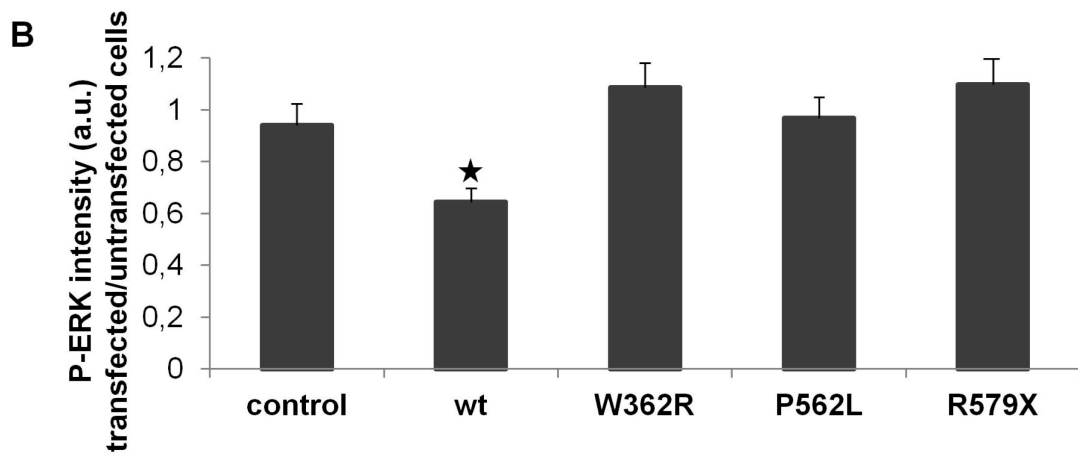
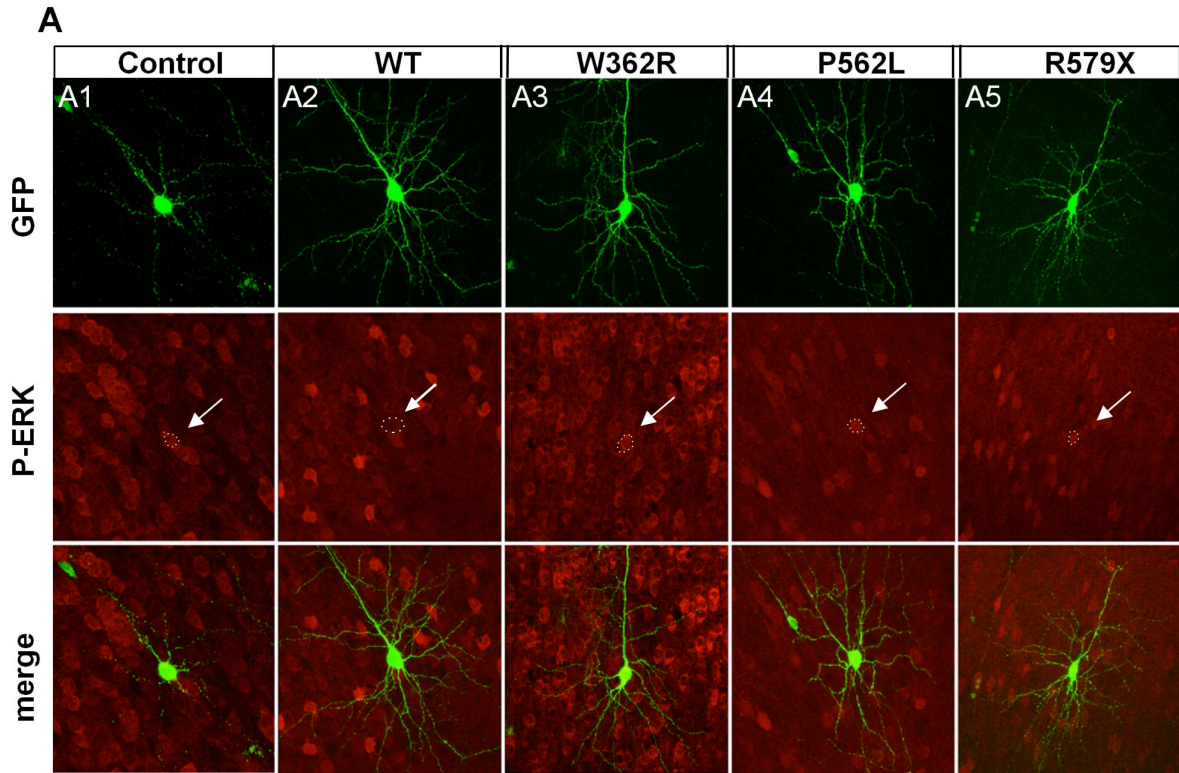
*Prochaine page*

Table 1. Phenotype of patients with point mutations in SYNGAP1

Patients	This study					Hamdan et al, 2009			Hamdan et al, 2011a			Visser et al, 2010
	Patient-1	Patient-2	Patient-3	Patient-4	Patient-5	Patient-6	Patient-7	Patient-8	Patient-9	Patient-10	Patient-11	Patient-12
<b>Gender</b>	F	M	F	M	F	F	F	F	F	M	M	F
<b>Age</b>	16 y	3 y 6 mo	4 y 3 m	30 mo	9 y 4 mo	4 y 5 mo	5 y 10 mo	12 y 2 mo	3 y 8 mo	4 y	13 y	NR
<b>Ethnicity</b>	Eur	Eur	Eur	Eur	Eur	SA	FC	FC	FC	FC	FC	NR
<b>Mutation*</b>	c.283dupC p.H95PfsX5	c.1084T>C p.W362R	c.1685C>T p.P562L	c.2212_2213del p.S738X	c.2184delC p.N729TfsX31	c.412A>T p.K138X	c.1735C>T p.R579X	c.2438delT p.L813RfsX23	c.2677delC p.Q893RfsX184	c.321_324del p.K108VfsX25	c.2294+1G>A	c.1043_1044de l p.V348AfsX70
<b>Epilepsy onset</b>	18 mo	32 mo	-	36 mo	3 y 2 mo	15 mo	28 mo	-	29 mo	24 mo	-	48 mo
<b>Seizure type(s)</b>	Myoclonic absences, Absences, Myoclonic seizures	Drop attacks; absence	-	-	Drop attacks; absence	Febrile and afebrile GTCS; Partial complex seizures	Myoclonic- atonic seizures	-	Head drop with loss of contact; absence	Myoclonic jerks of truncus with loss of contact	-	NR
<b>Epilepsy outcome</b>	Poor control	Poor control	NA	NR	Good control	Good control	Good control	NA	Good control	Good control	NA	NR
<b>Cognitive outcome</b>	Moderate ID. Language delay	Moderate ID. No speech	Mild ID	Moderate ID	severe ID. Speech impairment	Moderate ID. Speech impairment	Moderate ID. Speech impairment	Moderate ID. Speech impairment	Mod-to-severe ID. Speech impairment	Mod-to-severe ID. Speech impairment	Mod-to-severe ID. Speech impairment	Mild-to-mod. ID. No speech
<b>Autism</b>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	NR
<b>Abnormal behaviour</b>	Recurrent seasonal depression	NR	Irritability ; auto-mutilation ; sleeping difficulties	Sleep difficulty and aggression	NR	NR	NR	NR	Attention deficit; aggressive, adverse behavior	ADHD; aggressive, adverse behaviour; temper tantrums	Mood instability; temper tantrums	NR
<b>Ataxia</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NR
<b>Microcephaly</b>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	NR
<b>Brain Imaging</b>	MRI: normal	MRI: normal	NE	MRI: normal	MRI: normal	MRI: normal	MRI: normal	CT scan: normal	MRI: normal	MRI: Atrophy	MRI: normal	MRI: myelinisation delay

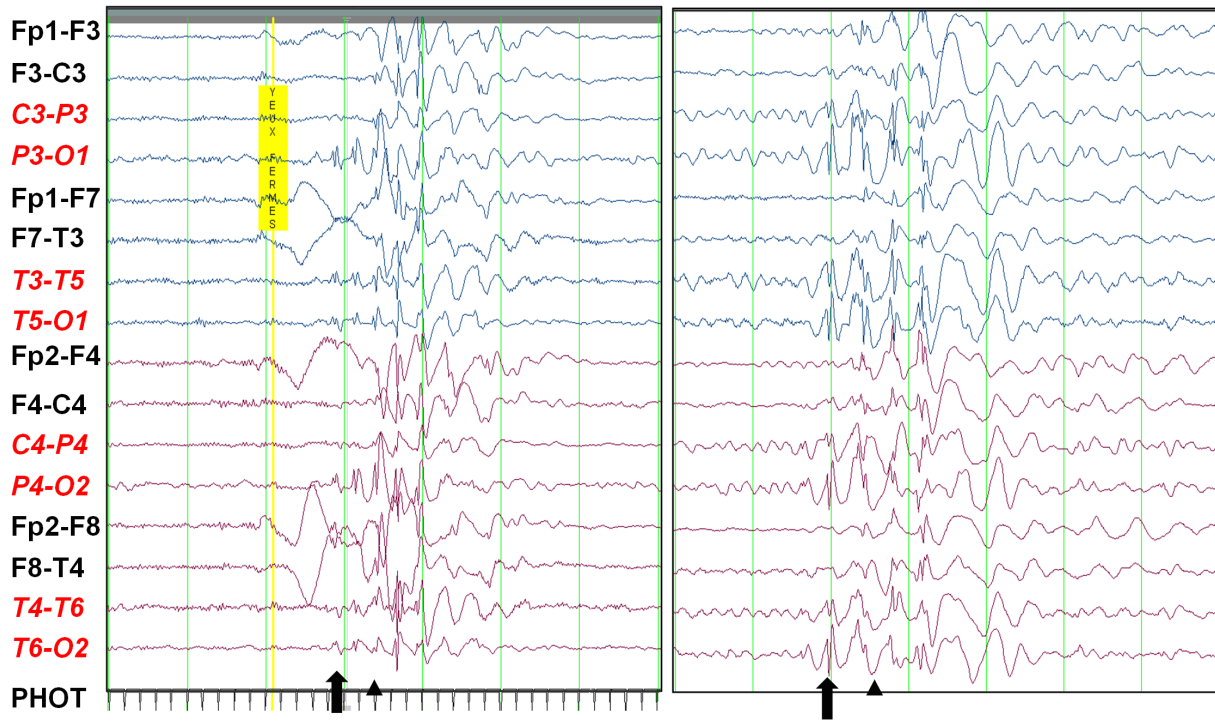
\*All mutations were de novo except for c.283dupC which was inherited from a father mosaic for the mutation. F = Female, M = Male, y = years, mo = months, FC = French Canadian, Eur = European, SA = South American. ADHD = attention deficit hyperactivity disorder, GTCS = generalized tonic-clonic seizure, MRI = Magnetic Resonance Imaging, NR = not reported, NE = not evaluated, NA: not applicable. Autism was diagnosed by a positive ADOS for patients 2,3, and 11. Nucleotide and amino acid numbering of the mutations in SYNGAP1 was based on NCBI RefSeq number NM\_006772.2





**Figure 4. SYNGAP1 mutants are less efficient in inhibiting ERK phosphorylation induced by neuronal activity.**

(A) Confocal images of cortical organotypic culture biolistically transfected with pCMV-IRES2-GFP (green) carrying either *SYNGAP1* wild-type (WT) or *SYNGAP1* mutant forms. Cortical organotypic cultures are treated with bicucullin for 30' prior fixation to increase basal pERK activity (red). pCMV-SYNGAP1-IRES2-GFP transfected pyramidal cells show decreased pERK immunoreactivity (A2, arrow) compared to untransfected neighboring cells, while pERK levels in pyramidal cells transfected with pCMV-IRES2-GFP (A1: control) do not differ from neighboring cells. (A3-5) Pyramidal cells transfected with either one of the 3 *SYNGAP1* mutants (arrows) show pERK expression levels similar to neighboring cells. (B) The ratio of pERK intensity levels (arbitrary units) in transfected vs untransfected pyramidal cells for either *SYNGAP1* mutants is significantly different as compared to the ratio for cells transfected with *SYNGAP1* wild-type (1, way-Anova;  $p < 0.05$ ), but does not differ from the ratio for cells transfected with pCMV-IRES2-GFP (1, way-Anova;  $p > 0.05$ ). Bars represent mean  $\pm$ SEM. Control n=14, *SYNGAP1* WT n=19, *SYNGAP1* W362R n=22, *SYNGAP1* P562L n=14, *SYNGAP1* R579X n=11; n stands for the number of transfected pyramidal neurons.



**Figure 5. Electroencephalographic features of patients with mutations in *SYNGAP1*.**

Interictal EEGs of patients with mutation p.R579X (left panel) and p.W362R (right panel) showing the typical interictal discharges observed in our epileptic patients with mutations in *SYNGAP1*. This 2-3 second interictal discharge begins with bilateral synchronous occipital spikes (arrow) that generalize within a second into a spike-wave discharge with occipital predominance (arrowhead). The most posterior channels are highlighted in red/italics. These discharges were seen both during photic stimulation (left panel) and at rest (right panel). The bilateral synchrony and photic sensitivity are in favor of a primarily generalized epileptic disorder.

## Supporting Information

### Supp. patient description.

#### Patient-1 (c.283dupC [p.H95PfsX5])

This female patient, aged now 16 yrs, is the single child of unrelated Danish parents. Her mother is healthy with no history of learning or psychiatric problems. The father, however, has learning difficulties but without epilepsy or ID. He attended regular elementary school but always needed additional help and eventually dropped out of school at the age of 15 due to learning difficulties. He suffers from recurrent depression (treated with sertraline hydrochloride) and currently lives on disability aid.

His affected daughter was delivered at 42 weeks of gestation (birth weight 3.7 Kg, height 55 cm) after an unremarkable pregnancy. Her motor development was normal. She sat at 6 months of age and started to walk at 10.5 months of age. Language was initially normal with first words appearing at 12-to-18 months, but she was not able to form sentences until the age of 4 years, and her language remains delayed. Her current WISC-III scores indicate moderate ID (Full scale IQ = 40). Evaluation with the Beck Youth Inventory Test showed very high scores for recurrent Fall-and-Winter depressions but the scores were normal for anxiety and self-esteem.

Onset of seizures was at 18 months of age. Her seizures were characterized by myoclonic absences (EMA). Control was difficult until 12 years of age despite the administration of combinations of anticonvulsants, including clonazepam, clobazam, valproate and leviteracetam. Initial treatment with oxcarbazepine led to an increase in her seizure frequency. She was stable for several years on a combination of leviteracetam and valproate. She is currently on ethosuximide and valproate and has been seizure-free for two years. She was briefly put on atomoxetine for behavioural problems, but this was not helpful. Her EEG was recorded at different dates and showed generalized paroxysms of spike-wave discharges at 3½-5 Hz predominating over the posterior quadrant, sometimes lateralizing to the right sometimes to the left.

At 14y 5m of age, patient-1 weighed 46.2 kg (50<sup>th</sup> centile) and measured 155.5 cm (15-50<sup>th</sup> centile). Her latest head circumference was 50 cm (5<sup>th</sup> centile) when she was 10 y 7 m.

She does not show any specific dysmorphic features. Neurological examination was unremarkable. Her karyotype, urine metabolic screening, and brain MRI were all normal. High-resolution SNP genotyping array (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0) and mutation analysis of *GLUT1* did not show any abnormality.

### **Patient-2 (c.1084T>C [p.W362R])**

Patient-2, a male aged 3 years and 6 months, is the only child of unrelated European parents. Family history is unremarkable. He was delivered spontaneously at term after an unremarkable pregnancy. The APGAR score was 9<sup>1</sup> and 9<sup>5</sup>. At birth, his weight was 3.95 kg (75<sup>th</sup> centile) and his head circumference was 37 cm (75<sup>th</sup> centile). Motor development was characterized by some hypotonia. He started to walk at 2 years, 6 months of age. Currently, he does not say any words. Developmental assessments were performed at 4 years and 3 months of age with the Mullen Scales of Early Learning (MSEL) and the Vineland Adaptive Behaviour Scale (VABS-II), completed by the mother. The latter indicates a low level of adaptive functioning. Communication abilities are poor for both receptive and expressive language (age equivalence: 10 months and 5 months, respectively). Socialization skills are poor for interpersonal relations, play, leisure time and coping skills (age equivalence: 1 year 10 months). A delay in terms of daily living skills such as personal care, domestic tasks and life in society is also observed (age equivalence: 3 months to 1 year, 1 month). Finally, motor skills, including gross and fine abilities, appear to be better developed compared to the other domains (age equivalence: 1 year, 10 months). During the administration of the Mullen Scales of Early Learning (MSEL), patient 3 had four epileptic episodes that lasted a few seconds each. He performed poorly on all the MSEL tasks compared to children of his age (1st percentile). Specifically, both gross and fine motor skills are poor (18 and 11 months, respectively). Concerning the visual reception domain, he shows little interest in the assigned tasks and performs at an age equivalent of 10 months. Both receptive and expressive language skills are poorly developed based on the MSEL, with performances equivalent to what would be expected of a 10- and 8-month-old respectively. Overall, the cognitive assessment showed a moderate intellectual disability. Assessment with the Autism Diagnostic Observation Schedule General (ADOS-G) performed at 4 years of age confirmed this diagnosis.

He had his first seizure at age 2.5 years, which was an atonic episode. From the onset, the seizures occurred in cluster of drop attacks every 5 minutes up to 10 times per day intermingled with brief absence seizures which led to an increment in medication. Soon after, multiple daily episodes of loss of contact were also observed. He was first started on levetiracetam, followed by clobazam, valproic acid, ethosuximide, clonazepam with no success except for less absence seizures with ethosuximide. The patient was started on a ketogenic diet in March 2012. EEGs demonstrated generalized spike-wave discharges with a posterior predominance.

At 2 years and 6 months of age, patient-2 weighed 15 kg (50-75<sup>th</sup> centile) and measured 89.5 cm (10-25<sup>th</sup> centile). His head circumference was 50.5 cm (50<sup>th</sup> centile). At the last physical examination, at 3 years and 6 months, no specific dysmorphic features were noticed. Eye contact was poor. The neurologic examination revealed hypotonia, normal reflexes and no focalizing or lateralizing sign.

Karyotyping (at a resolution of 450 bands), whole-genome comparative hybridization with an array containing 135000 oligonucleotides, and molecular testing for the triple repeat expansion associated with the Fragile X syndrome did not show any abnormality. A comprehensive metabolic work-up, including blood lactate and urine creatine and guanidinoacetate measurements, plasma amino-acid and urine organic acid chromatography, as well as evaluation of immunoreactive forms of transferrin after isoelectric focusing in polyacrylamide gels, was unremarkable. Brain MRI performed at 4 years of age was normal.

### **Patient-3 (c.1685C>T [p.P562L])**

Patient-3, a female aged 4 years and 3 months, is the third child of unrelated European parents. Family history is unremarkable. She was delivered spontaneously at 35 weeks of gestation after an unremarkable pregnancy. The APGAR score was 1<sup>1</sup>, 9<sup>5</sup> and 9<sup>10</sup>. She was initially hyporeactive but recovered within a few minutes after birth. Her weight was 4.0 kg (85-97<sup>th</sup> centile) and her head circumference was 34 cm (50<sup>th</sup> centile). She showed transient mild respiratory distress and was discharged at 4 days of life.

Patient-3 showed global developmental delay. She first walked at 15 months of age. She was saying 3 words at 2 years and 5 months of age but was not using signs to

communicate. She understood simple commands and could designate parts of her body when asked. She started to use a spoon around that age. At four years of age, she was using 50 words but was not putting them together. She could not undress herself and had no interest for drawing. Assessments were performed at 4 years and 3 months of age with the Mullen Scales of Early Learning (MSEL) and the Vineland Adaptive Behavioural Scale (VABS). The Vineland Adaptive Behaviour Scale (VABS-II), filled out by the mother, shows a low level of adaptive functioning. Communication abilities are heterogeneous, with receptive language skills in the average range (age equivalence: 3 years, 7 months), while expressive language skills are less developed (age equivalence: 1 year, 9 months). Concerning the socialization domain, Patient-3 appears to have poor abilities in terms of interpersonal relations, play and leisure time, and coping skills (age equivalence: 1 year, 5 months and 1 year, 4 months, respectively). A delay in terms of daily activities such as personal care, domestic tasks and life in society is observed (age equivalence 1 year, 5 months and 1 year, 4 months, respectively). Gross motor skills appear to be in the moderate to low range (age equivalence: 2 years, 2 months) while fine motor skills are poor (1 year, 5 months). The first attempt to administer the MSEL was impossible because the patient refused to complete the tasks. During the second assessment, she was more willing to participate but her mother had to use food rewards to motivate her. Visual reception and fine motor skills are below average (4th percentile) and are equivalent to the abilities of a 34-month-old child. Both receptive and expressive language skills are poor (1st percentile) and are equivalent to what is expected of a 31-month-old child. Overall, the cognitive assessment showed a mild intellectual disability

Non-verbal interactions were described as poor at 22 months of life, leading to a diagnosis of autism. Assessment with the Autism Diagnostic Observation Schedule performed at 4 years of age confirmed this diagnosis. During the second year of life, she had difficulty sleeping and she showed episodes of irritability with auto-mutilation. Both the sleeping difficulties and the irritability improved with the administration of valproate and omeprazole. There is no history of seizures.

At 2 years and 10 months of age, patient-3 weighed 18.9 kg (> 97<sup>th</sup> centile) and measured 94 cm (50-75<sup>th</sup> centile). At 3 years and 8 months of age, her head circumference was 51.8 cm (75-90<sup>th</sup> centile). On physical examination, no specific dysmorphic features were noticed. Neurological examination was unremarkable.

Karyotyping (at a resolution of 450 bands), whole-genome comparative hybridization with an array containing 135000 oligonucleotides, mutation analysis of the *MECP2* gene, and molecular testing for the triple repeat expansion associated with the Fragile X syndrome did not show any abnormality. Plasma amino-acid and urine organic acid chromatography were unremarkable. Electroencephalogram performed at 26 months of age was normal whereas another study performed at 3 years of age showed intermittent and slow dysfunction in the occipital regions.

#### **Patient-4 (c.2212\_2213del [p.S738X])**

Patient-4, a male aged 30 months, is the single child of unrelated European parents. His mother has a history of petit mal seizures starting at the age of 7. She was well controlled with the medication and seizures stopped at 13 years of age. The mother also shows macrocephaly. Patient-4 was delivered spontaneously at term after an unremarkable pregnancy. The APGAR score was 9<sup>1</sup> and 9<sup>5</sup>. His weight was 2.918 kg (10-25<sup>th</sup> centile) and his head circumference was 32 cm (2<sup>nd</sup> centile). Motor development was delayed. He sat at 9 months and walked at 21 months of age. He is currently unable to say words and does not use signs to communicate. He has moderate ID. Non-verbal social interactions are unremarkable. He is easily frustrated and bangs things with his hands or bangs his head. There is no history of seizures.

Patient-4 has difficulty feeding since the newborn period. He had trouble latching to the breast and as a result milk production was not established and he had to be weaned off by 1 month of age. He also had some difficulties feeding on formulas. At 10 months of age, a G-tube was placed for supplemental feeding. Currently, he gets about 30% of calories from the G-tube and receives a full diet orally but he shows an aversion to solid foods, crunchy foods and liquids and only eats food with a pureed consistency. He also had constipation from a young age.

At 30 months of age, patient-4 weighs 11.88 kg (15<sup>th</sup> centile) and measures 88.3 cm (15<sup>th</sup> centile). Serial measurements of head circumference showed acquired microcephaly. At 25 months of age, his head circumference was 45.7 cm (10<sup>th</sup> centile). Physical examination showed mild dysmorphic features, including thickened helices, crimped outer helix and



bilateral 5<sup>th</sup> finger clinodactyly. Neurological examination revealed generalized hypotonia. He is unsteady on his feet but not ataxic.

Patient-4 started to show absence seizures at 36 months of age. EEG showed occasional bursts of generalized spike and slow wave discharges with a bioccipital predominance. The patient is currently being treated with Keppra. The impact of this treatment is currently under evaluation.

Exhaustive metabolic work-up including blood lactate, ammonia, amino acids, acylcarnitines, and 7-dehydrocholesterol measurements, as well as urine organic acids chromatography was normal. Array genomic hybridization, methylation study of the region associated with Angelman syndrome and molecular testing for the triple repeat expansion associated with the Fragile X syndrome did not show any abnormality. Brain MRI and spectroscopy performed at age 20 months was normal.

#### **Patient-5 (c.2184del [p.N729TfsX31])**

Patient-5, aged 9 years and 4 months, is the daughter of unrelated European parents. Family history is unremarkable. She was delivered at 39 weeks of gestation after an uneventful pregnancy. The APGAR score was 9<sup>1</sup> and 10<sup>5</sup>. Her birth weight was 3.85 kg and head circumference at birth was 36 cm (55<sup>th</sup> centile). She first walked at the age of 26 months, and said her first words at the age of ~ 5 years. Currently, she is able to speak with short sentences. Assessment by a developmental pediatrician led to diagnoses of moderate-to-severe global developmental delay and autism.

She started to present drop attacks and absence seizures at 3 years and 2 months of age. These seizures were well controlled by the administration of valproic acid. EEG was initially normal but a subsequent study showed abnormal bursts, in the right vertex region, of poorly formed waves during sleep that were potentially epileptogenic, mainly.

At 9 years and 4 months of age, her weight, height and head circumference all corresponded to the 75<sup>th</sup> centile. On physical examination, no specific dysmorphic features were noticed. Neurological examination was normal aside from increased tone in the legs and an ataxic gait with truncal titubation.

Exhaustive metabolic work-up including blood amino acids and urine organic acids chromatographies as well as measurement of the activity of respiratory chain complexes in the muscle was normal. Array genomic hybridization and molecular testing for the triple repeat expansion associated with the Fragile X syndrome did not show any abnormality. Brain MRI was normal

**Supp. Table S1.** Paternity and maternity testing for patients 2-5 done using 6 informative polymorphic unlinked microsatellite markers.

<b>Trio</b>	<b>D3S1754</b>	<b>D4S3351</b>	<b>D8S1179</b>	<b>D15S659</b>	<b>D14S587</b>	<b>D19S215</b>
Patient-2	7 9	5 7	5 6	2 7	1 3	3 6
Father	7 8	5 6	5 7	2 3	2 3	2 3
Mother	7 9	5 7	8 6	3 7	1 6	6 6
Patient-3	6 8	2 6	5 6	6 7	6 7	1 8
Mother	6 7	5 6	5 6	6 6	6 7	6 8
Father	8 8	2 7	6 8	2 7	6 6	1 6
Patient-4	6 8	5 6	7 7	2 6	3 6	6 10
Father	6 8	6 6	6 7	2 2	6 7	2 6
Mother	1 8	5 13	7 5	6 7	3 3	6 10
Patient-5	7 7	4 6	2 7	3 7	5 9	1 6
Father	7 8	4 6	7 8	4 7	5 6	2 6
Mother	7 8	4 5	2 5	3 3	5 9	1 6

PCR was done using primers flanking each marker in the presence of specific fluorescent dyes and then analyzed on a 3730 DNA analyzer. Shown are the genotypes observed in each member of the 4 trios. Results are consistent with paternity and maternity for each trio.

**Chapitre III: Decrease of *Syngap1* in GABAergic cells  
impairs inhibitory synapse connectivity, synaptic inhibition  
and cognitive function.**

En révision: *Nature Communication*

***Nota bene***

A l'heure de l'édition de cette thèse, je vous expose ici la deuxième version de l'article soumis.

**Decrease of *Syngap1* in GABAergic cells impairs inhibitory synapse connectivity,  
synaptic inhibition and cognitive function.**

Martin H. Berryer<sup>1,2</sup>, Bidisha Chattopadhyaya<sup>1,2</sup>, Paul Xing<sup>1,2</sup>, Ilse Riebe<sup>1,6</sup>, Ciprian Bosoi<sup>2</sup>,  
Nathalie Sanon<sup>2</sup>, Judith Antoine-Bertrand<sup>3</sup>, Maxime Lévesque<sup>4</sup>, Massimo Avoli<sup>4</sup>, Fadi F.  
Hamdan<sup>2</sup>, Lionel Carmant<sup>1,2</sup>, Nathalie Lamarche-Vane<sup>3</sup>, Jean-Claude Lacaille<sup>1,6,#</sup>, Jacques L.  
Michaud<sup>1,2,5,#,\*</sup> and Graziella Di Cristo<sup>1,2,#,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

<sup>2</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada

<sup>3</sup>Cancer Research Program of the Research Institute of MUHC, Department of Anatomy and  
Cell Biology, McGill University, Montreal, QC, Canada

<sup>4</sup>Montreal Neurological Institute and Department of Neurology and Neurosurgery, McGill  
University, Montréal, QC, Canada

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, Université de Montréal, QC, Canada

<sup>6</sup>Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Université de Montréal, Montréal,  
QC, Canada

## ABSTRACT

Haploinsufficiency of the *SYNGAP1* gene, which codes for a Ras GTPase activating protein, impairs cognition both in humans and in mice. Decrease of *Syngap1* in mice has been previously shown to cause cognitive deficits at least in part by inducing alterations in glutamatergic neurotransmission and the premature maturation of excitatory connections in the neocortex and hippocampus. Whether *Syngap1* plays a role in the development of GABAergic connectivity and function remains unclear. Here, we show that *Syngap1* haploinsufficiency significantly reduces the formation of perisomatic innervations by parvalbumin-positive basket cells, a major population of GABAergic neurons, in a cell-autonomous fashion. We further show that *Syngap1* haploinsufficiency in GABAergic cells derived from the medial ganglionic eminence impairs their connectivity, reduces mature inhibitory synaptic activity and cortical gamma oscillation power and causes cognitive deficits. Our results indicate that *Syngap1* plays a critical role in GABAergic circuit function and further suggest that *Syngap1* haploinsufficiency in GABAergic circuits may contribute to cognitive deficits.

## INTRODUCTION

Long-term changes in the strength of synaptic transmission are thought to be critical both during brain development and for learning and memory throughout life. The Ras family GTPases, their downstream signaling proteins and upstream regulators are key biochemical cascades modulating synaptic plasticity. *SYNGAP1* codes for a GTPase-activating protein (GAP) that physically interacts with the small GTPase Ras, which in turn acts in a cycle as a molecular switch with an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form<sup>1,2</sup>. Ras has a slow intrinsic GTPase activity, and GAPs such as SYNGAP1 negatively regulate Ras by enhancing the hydrolysis of GTP to GDP. The importance of SYNGAP1 in synaptic plasticity is exemplified by the fact that *de novo* mutations in the *SYNGAP1* gene cause moderate or severe intellectual deficiency (ID)<sup>3-9</sup>. SYNGAP1 function has been mainly studied in excitatory neurons. For example, in primary neuronal cultures, SYNGAP1 functions to limit excitatory synapse strength by restricting the expression of the AMPA receptor (AMPA) at the post-synaptic membrane<sup>1,2,10,11</sup>. In mice, *Syngap1* haploinsufficiency causes abnormal synaptic plasticity as well as behavioral abnormalities and cognitive deficits<sup>12-15</sup>. *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice are also characterized by enhanced excitatory synaptic transmission early in life and the premature maturation of glutamatergic synapses<sup>16,17</sup>. Thus, it has been proposed that glutamatergic synaptic alterations represent the main contributing factor for the occurrence of cognitive and behavioral deficits<sup>16,17</sup>.

During healthy cortical network activity, excitation is precisely balanced by GABAergic inhibition. Inhibitory activity not only regulates circuit excitability, but also restricts the temporal window for integration of excitatory synaptic inputs and resulting spike generation, thereby facilitating an accurate encoding of information in the brain<sup>18</sup>. In addition, GABAergic cells are implicated in generating temporal synchrony and oscillations among networks of pyramidal neurons, which are involved in complex cognitive functions, such as perception and memory<sup>19,20</sup>. Furthermore, GABAergic inhibition plays a critical role in modulating developmental plasticity in the young brain<sup>21</sup>. Highlighting the importance of GABA interneurons in cognitive functions, cortical circuits in several mouse models of ID and autistic-like behaviour show excitation/inhibition imbalance, which is due to alterations in

glutamatergic or GABAergic neurotransmission, or more often, in both<sup>16,22-27</sup>. Whether and to what extent *Syngap1* haploinsufficiency affects GABAergic cell circuits, thus contributing to excitation/inhibition imbalance and cognitive abnormalities remains unclear.

Here, we examined the specific contribution of *Syngap1* to the formation of perisomatic innervations by parvalbumin-positive basket cells, a major population of GABAergic neurons, by single-cell deletion of *Syngap1* in cortical organotypic cultures. In addition, we generated mice with specific deletion of *Syngap1* in GABAergic neurons generated in the medial ganglionic eminence (MGE) to assess its role in the establishment of mature GABAergic connectivity and mouse cognitive function *in vivo*. We found that *Syngap1* strongly modulates the formation of GABAergic synaptic connectivity and function and that MGE cell-type specific *Syngap1* haploinsufficiency alters cognition.

## RESULTS

### ***Single-cell cre-mediated inactivation of *Syngap1* reduced perisomatic innervation formed by GABAergic basket cells in cortical organotypic cultures.***

*Syngap1* expression peaks (PND 14) when the processes of synaptogenesis and developmental plasticity are heightened<sup>28</sup>. While its expression in glutamatergic cell is well documented<sup>1,14-16,29-32</sup>, few studies have also reported SYNGAP1 expression in GABAergic neurons<sup>17,33,34</sup>. To further confirm that SYNGAP1 is present in GABAergic neurons, we prepared dissociated neuronal cultures from E18 wild-type embryos and immunostained them for GAD67, which is the main GABA synthesizing enzyme<sup>35</sup>, and SYNGAP1 at DIV21, after the peak of synapse formation. We found that GAD67-positive cells co-localized with SYNGAP1 (Suppl. Figure 1a, 63% ± 5% co-localization), indicating that SYNGAP1 is indeed expressed by GABAergic neurons.

GABAergic circuits comprise an astonishing variety of different cell types, exhibiting differences in molecular, morphological and electrophysiological properties<sup>19</sup>. These differences are particularly important in the light of recent discoveries suggesting that different GABAergic cell types are recruited by different behavioral events<sup>19</sup>. Among the different GABAergic neuron subtypes, the parvalbumin-expressing (PV+) basket cells comprise the largest subpopulation in cortical circuits<sup>19</sup>. Each PV+ basket cell innervates hundreds of neurons, with large, clustered boutons targeting the soma and the proximal dendrites of postsynaptic targets, an optimal location to control timing and frequency of action potential generation<sup>19,36</sup>. Such distinct features of PV+ basket cell innervations are achieved during the first postnatal month in rodents and are modulated by neural activity levels<sup>35,37-39</sup>. We found that almost the totality of PV+ basket cells express SYNGAP1 in dissociated neuronal cultures (Suppl. Figure 1b) and thus we sought to investigate whether *Syngap1* plays a role in the formation of the innervation of PV+ basket cells, by inducing single-cell *Syngap1* deletion in cortical organotypic cultures.

To abolish *Syngap1* expression in isolated PV+ basket cells and simultaneously label their axonal arbors at synaptic resolution, we used a previously characterized promoter region P<sub>G67</sub><sup>37</sup> to express either the Cre recombinase together with GFP (pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> basket cells) or GFP alone (pGAD<sub>67</sub>-GFP; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> basket cells) in cortical organotypic cultures prepared from *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> mice<sup>35,37-40</sup>. In organotypic cultures, PV+



basket cells initially display very sparse and simple axons, which develop into complex and highly branched arbors in the following 4 weeks, recapitulating the *in vivo* situation<sup>37,38</sup>. We chose to induce *Syngap1* deletion in PV+ basket cells at Equivalent Postnatal day 10 (EP10 = cultured prepared at Postnatal day 4 + 6DIV) and harvest the cultures at EP24 because extensive and stereotyped maturation of PV+ basket cell innervations occurs during this time window<sup>37,37-41</sup>.

We investigated two aspects of PV+ basket cell axon innervation: 1) the extent of perisomatic innervation around single neuronal somata (terminal branching and perisomatic bouton density) and 2) the fraction of potentially innervated cells in the field (percentage of innervation). By studying the localization of pre- and post-synaptic markers and performing electron microscopy, we have previously shown that the vast majority of GFP-labeled boutons in our experimental condition represent presynaptic terminals<sup>35,37,42</sup>.

Whereas pGAD<sub>67</sub>-GFP; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> basket cells at EP24 showed complex perisomatic innervations (Figure 1a), *Syngap1* knockdown in single basket cells from EP10-24 induced a significant reduction in the number of both axonal branching and synaptic boutons innervating the target neurons (NeuN positive cells) (Figure 1b, c, d: boutons/soma,  $7.4 \pm 0.3$  for pGAD<sub>67</sub>-GFP; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> versus  $5.2 \pm 0.5$  for pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup>, Students *t* test  $p < 0.01$ ). On the other hand, the percentage of potentially innervated neurons was not significantly different between the two groups (Fig 1e:  $71\% \pm 2$  for pGAD<sub>67</sub>-GFP; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> versus  $66\% \pm 2$  for pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup>, Students *t* test,  $p > 0.05$ ), suggesting that *Syngap1* deletion specifically affected local synapse formation of PV+ basket cells but not their overall axonal growth. *Syngap1* knockout at later age (EP16-24) caused a similar decrease in perisomatic bouton density (Suppl. Figure 2, boutons/soma,  $7.4 \pm 0.3$  for pGAD<sub>67</sub>-GFP; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> versus  $4.7 \pm 0.5$  for pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre; *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup>, Students *t* test  $p < 0.001$ ). Altogether, these data demonstrate that *Syngap1* promotes the formation of PV+ basket cell innervations in a cell autonomous fashion.

### ***Syngap1 haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons reduced basket cell connectivity.***

Our data suggest that the abolition of *Syngap1* expression has a direct impact on the formation of PV+ basket cell innervations *in vitro*. To investigate the role of *Syngap1* in PV+

cell circuits *in vivo*, we generated mice that were heterozygous or homozygous for the *Syngap1<sup>fllox</sup>* allele and hemizygous for the *Tg(Nkx2.1-Cre)* transgene. This approach allowed the conditional deletion of *Syngap1* in cortical<sup>43</sup>, hypothalamic<sup>43</sup> and mesencephalic<sup>44</sup> (striatum) GABAergic interneurons originating from the medial ganglionic eminence (MGE) as early as embryonic day 10.5 and throughout adulthood<sup>45</sup>. In mouse, *Nkx2.1*-expressing MGE precursors produce most of PV+ and Somatostatin (SOM)+ cortical interneurons<sup>45</sup>. To confirm the specificity of CRE expression, we fluorescently labeled the cells expressing Cre by crossing *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice with a GFP reporter line (RCE mouse<sup>46</sup>). We confirmed that the large majority of cortical GFP+ cells expressed either PV or SOM (% of GFP+ cells expressing PV or SOM, 74±7% and 25±6%, respectively, n=3 mice). Further, the large majority of cortical neurons immunopositive for PV also expressed GFP (Suppl. Figure 3; 85±6%, n=3 mice), as previously reported<sup>47</sup>.

We focused our study on *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice, since most of *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/fllox</sup>* mice died at birth (9 out of 11, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/fllox</sup>* versus none of *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice) as it is the case for *Syngap1<sup>-/-</sup>* mice. Therefore, *Syngap1* expression in MGE-derived cells may be required for survival. Alternatively, since both *Syngap1* and *Nkx2.1* are expressed in the developing lungs and heart<sup>28,29,45</sup>, it is possible that the deletion of *Syngap1* outside the brain is the cause underlying this early mortality.

First, we investigated whether *Syngap1* haploinsufficiency restricted to MGE-derived GABAergic cells affected perisomatic innervations formed by PV+ basket cells in the cortex. To label PV+ basket cells, we used immunofluorescence staining for parvalbumin (PV), a calcium-binding protein that is exclusively expressed by PV+ basket cells in the neocortex and hippocampus after the second postnatal week. In particular, we analyzed the intensity of PV immunostaining around layer 2-3 NeuN positive neurons in the somatosensory cortex of P45 *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* and control littermates as reported in<sup>27</sup>. In control mice, distinct PV-positive perisomatic bouton rings enclosed a large portion of the pyramidal soma, while PV-positive perisomatic rings were significantly less developed in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* (Figure 2a, c: PV mean intensity (A.U.), 15.9 ± 0.9 for *Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice

versus  $10.1 \pm 0.8$  for  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$  mice; one-way ANOVA, *post-hoc* Holm-Sidak's test  $p < 0.05$ ), which suggests a decrease of perisomatic boutons made by PV+ basket cells. This effect was not restricted to the cortex, as we found a similar reduction in PV staining intensity around hippocampal CA1 pyramidal cells (PV mean intensity (A.U.),  $17 \pm 2$ ,  $n=52$  cells from three  $Syngap1^{fllox/+}$  mice vs  $9.9 \pm 0.9$ ,  $n=56$  cells from four  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$  mice; one-way ANOVA, *post-hoc* Holm-Sidak's test  $*p < 0.05$ ).

To evaluate whether germ line *Syngap1* haploinsufficiency affects GABAergic perisomatic innervation formed by PV+ basket cells in the cortex, we performed the same analysis in  $Syngap1^{+/-}$  and control littermates. We found a reduction in perisomatic PV-positive rings in the somatosensory cortex of  $Syngap1^{+/-}$  mice, which was comparable to what we observed in  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$  (Figure 2b, 2c; PV mean intensity (A.U.),  $12 \pm 1$ , vs  $8.6 \pm 0.7$  from  $Syngap1^{+/+}$  and  $Syngap1^{+/-}$  mice, respectively; one-way ANOVA, *post-hoc* Holm-Sidak's test  $p < 0.05$ ). Thus, *Syngap1* haploinsufficiency both in germ line and MGE-derived interneurons reduced cortical PV+ basket cell bouton density *in vivo*.

To further investigate how *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived GABAergic cell precursor affects the formation of PV+ basket cell axonal arbour and synaptic boutons, we prepared cortical organotypic cultures from P4  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$  mice and their control littermates. PV+ basket cells were labeled by biolistic transfection of P<sub>G67</sub>-GFP. In EP24 organotypic cultures from control mice ( $Syngap1^{fllox/+}$ ), NeuN-positive somata were surrounded by highly branched basket cell axonal terminals and numerous perisomatic boutons (Figure 3a); on the contrary, in age-matched cultures from  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$  mice, we found a significant decrease of the complexity of the terminal axonal branching (Figure 3b, d) as well as of the perisomatic bouton density formed by basket cell around targeted neurons (Figure 3c; boutons/soma,  $10 \pm 1$  for  $Syngap1^{fllox/+}$  vs  $4.7 \pm 0.3$  for  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$ , Students *t* test  $p < 0.05$ ). Similarly to what we observed in single-basket cell knockout of *Syngap1* performed at EP10-24, the fraction of innervated somata was not affected by *Syngap1* knockdown in MGE-derived PV+ basket cells at the embryonic stage (Figure 3e, percentage of innervation,  $69\% \pm 3\%$  for  $Syngap1^{fllox/+}$  vs  $67\% \pm 3\%$  for  $Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1^{fllox/+}$ ; Students *t* test,  $p > 0.05$ ). All together, these data show that

*Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived neuron precursors affects the formation of PV+ basket cell innervations *in vivo*.

***Syngap1 haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons impairs inhibitory synaptic transmission in vivo.***

The observation that PV+ basket cells in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> formed less boutons around their potential postsynaptic targets raises the possibility of an impairment in GABAergic synaptic transmission. Thus, we examined the effects of MGE-specific *Syngap1* knockdown on spontaneous inhibitory synaptic transmission in acute cortical and hippocampal slices from adult Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice and their respective control littermates. We found that mean inter-event interval of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) recorded from pyramidal neurons in L2-3 somatosensory cortex was significantly longer in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice relative to the controls (Figure 4a1, 4b1; IEI: 92 ± 7 ms for *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> vs 127 ± 12 ms Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup>; unpaired Students *t* test *p*<0.05; K-S test *p*<0.001). Similarly, inter-event intervals of mIPSCs recorded from CA1 pyramidal neurons were significantly longer in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice relative to the controls (Figure 4c1, 4d1; IEI: 184 ± 26 ms for *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> vs 789 ± 157 ms Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup>; unpaired Students *t* test *p*<0.05; K-S test *p*<0.001). Amplitude of mIPSCs was not affected in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice compared to controls (Figure 4b1, 4d1; Amplitude, L2-3: 31 ± 2 pA for *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> vs 34 ± 2 pA for Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup>; CA1: 37 ± 2 pA for *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> vs 39 ± 3 pA for Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup>; unpaired Students-*t* test *p*>0.05; K-S test *p*>0.05). mIPSC kinetics were generally similar between the different genotypes, except for mIPSC rise time that showed a small increase in L2-3 pyramidal neurons of Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> (Suppl. Figure 3a). The mIPSC charge transfer was also not different for cortical and hippocampal neurons between the different genotypes (Suppl. Figure 4c, f; unpaired Students *t* test *p*>0.05). Therefore, *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons *in vivo* strongly affects GABAergic transmission in adult mice.

To investigate whether inhibitory neurotransmission is also affected by germ line deletion of *Syngap1*, we performed the same analysis in *Syngap1*<sup>+/-</sup> and control littermates. We found no difference in inter-event intervals of mIPSC recorded from either L2-3 or CA1 pyramidal neurons in *Syngap1*<sup>+/-</sup> compared to control mice (Figure 4a2, 4b2, 4c2, 4d2; L2-3: IEI: 111 ± 15 ms for *Syngap1*<sup>+/+</sup> vs 106 ± 11 ms for *Syngap1*<sup>+/-</sup>; CA1: IEI: 153 ± 21 ms for *Syngap1*<sup>+/+</sup> vs 191 ± 28 ms for *Syngap1*<sup>+/-</sup>; unpaired Students *t* test p>0.05). mIPSC amplitude, kinetics and charge transfer were also not affected (Figure 4b2, 4d2; Suppl. Fig. 3). The differences observed between *Syngap1*<sup>+/-</sup> and Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mice suggest that the concurrent *Syngap1* haploinsufficiency in glutamatergic and/or in GABAergic neurons, which do not originate from the MGE alters neuronal circuit development in a fashion that compensates inhibitory synaptic deficits originating from *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived GABAergic neurons.

To further confirm that *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons impairs functional cortical GABAergic connectivity *in vivo*, we targeted expression of the light-sensitive channel channelrhodopsin-2 (ChR2) to MGE-derived GABAergic cells, by injecting a Cre-dependent adeno-associated virus in somatosensory cortex<sup>47</sup> (Figure 5a). Two-weeks posttransfection, we recorded inhibitory synaptic responses evoked by blue light pulses of different duration (input-output function) in layer 5 pyramidal cells. The amplitude of evoked IPSCs was significantly smaller in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> compared to those recorded in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>+/+</sup> littermates (Figure 5b, c; 2-way ANOVA *posthoc* Sidak's multiple comparisons test, p<0.0001). Together with the observation that the number of cortical perisomatic boutons formed by PV+ baskets is reduced in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> (Figures 2 and 3), this result demonstrated that *Syngap1* haploinsufficiency impairs GABAergic synapse formation and function of MGE-derived interneurons.

***Syngap1* haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons affects gamma oscillations during exploratory behavior in adulthood.**

PV+ cells represent the large majority of cortical GABAergic interneurons generated by MGE-derived precursors. Correlative, causal and computational evidence indicates that gamma oscillations in the 30–80 Hz range depend on synchronous activity of PV+ cells<sup>48,49</sup>.

Since we found that PV+ cell connectivity was reduced in both cortex and hippocampus of *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice (Figure 2), we hypothesized that PV+ cell synaptic impairment should lead to changes in gamma oscillatory activity in these mice.

To test this hypothesis, we measured specific oscillatory patterns by video-EEG recordings in awake animals, during active exploratory behavior. We found that in the cortex, average power in the gamma frequency band was significantly lower in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* animals compared to control littermates (Figure 6a-c;  $0.27 \pm 0.02$  vs  $0.32 \pm 0.02$  for *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* and *Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, respectively; Wilcoxon rank sum test,  $p < 0.01$ ). Similar results were observed in the hippocampus (Figure 6c;  $0.29 \pm 0.02$  vs  $0.335 \pm 0.005$  for *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* and *Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, respectively; Wilcoxon rank sum test  $p < 0.001$ ). Taken together, these data demonstrate that *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons alters brain network activity, which in turn may contribute to cognitive deficits.

***Syngap1 haploinsufficiency restricted to MGE-derived interneurons causes cognitive and behavioral deficits that partially resemble those in *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice.***

While *Syngap1<sup>-/-</sup>* mice die within the first days after birth, adult *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice showed behavioral and cognitive deficits, including hyperactivity, anxiety, abnormal reference, working and social memories<sup>12,14-17</sup>. We have previously proposed that *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice represent an appropriate model to study the cognitive and behavioral abnormalities associated with the disruption of *SYNGAPI* in humans, as documented pathogenic mutations in this gene are predicted to cause a loss-of-function<sup>7</sup>.

To understand to what extent *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived GABAergic neurons may contribute to the cognitive and behavioral deficits observed in *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice, we compared the performance of young adult *Syngap1<sup>+/-</sup>*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice and their respective control littermates in several behavioral tests. We first assessed the locomotion activity using the open-field arena. Relative to their wild type littermates, *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice traveled more during a 10 min session (Figure 7a;  $40 \pm 4$  m for *Syngap1<sup>+/+</sup>* vs  $57 \pm 6$  m for *Syngap1<sup>+/-</sup>*, One-Way ANOVA *posthoc* Dunn's pairwise multiple comparisons test,  $p < 0.05$ ), which is consistent with previously published observations<sup>12,14-16</sup>. These results indicate that *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice are hyperactive and that they do not display major locomotor

deficits. Next, we tested anxiety-like behavior using the elevated plus maze test. *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice spent significantly more time in the open arms than the wild type littermates (Figure 7b; 10 ± 2% for *Syngap1*<sup>+/+</sup> vs 25 ± 4% for *Syngap1*<sup>+/-</sup>, One-way ANOVA *posthoc* Tukey's pairwise multiple comparisons test, p<0.05), suggesting a reduced level of anxiety-like behavior in the germline *Syngap1* heterozygous mice, as reported in previous studies<sup>14,16</sup>. Conversely, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> showed normal levels of locomotion and anxiety-like behavior compared to *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mice (Figure 7a, 7b; for openfield: 45 ± 5m for *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> vs 51 ± 6m for *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup>; for elevated plus maze: 15 ± 3 % for *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> vs 21 ± 3 % *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup>; One-way ANOVA p>0.05). As expected no statistical difference in locomotion or in anxiety like behavior was found between *Syngap1*<sup>+/+</sup> and *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> (Figure 7a, 7b; One-way ANOVA p>0.05).

Several mouse models of ID and autism exhibit reduced social interaction behavior<sup>17,23</sup>. We tested social interactions in *Syngap1*<sup>+/-</sup> and *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> and their respective littermates. After a habituation period, we evaluated sociability by assessing the preference of the tested mice for an unknown wild-type conspecific mouse matched for age, sex and background *versus* an empty wire cage (Suppl. Figure 5b). Mice of all genotypes spent significantly more time with an unfamiliar mouse (stranger 1) relative to the empty wire cage (Suppl. Figure 5c, Two-way ANOVA p<0.05), indicating that social approach behavior was normal in *Syngap1*<sup>+/-</sup> and *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> relative to their respective control littermates. Next, we tested whether social novelty preference was affected in these mice by assessing the preference for a second stranger mouse. *Syngap1*<sup>+/+</sup> and *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mice spent significantly more time in the chamber containing the novel mouse (stranger 2) than in the chamber with the familiar one (stranger 1) (Figure 7c1, c2; stranger 2 *versus* stranger 1: 45 ± 5% *versus* 31 ± 4% for *Syngap1*<sup>+/+</sup>; 51 ± 5% vs 33 ± 3% for *Syngap1*<sup>fllox/+</sup>; two-way ANOVA *posthoc* Sidak's multiple comparisons test p<0.05). In contrast, both *Syngap1*<sup>+/-</sup> and *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> spent similar amount of time with the novel vs the familiar mice (Figure 7c1; 7c2, stranger 2 *versus* stranger 1: 41 ± 4% *versus* 34 ± 3% for *Syngap1*<sup>+/-</sup>; 50 ± 5 *versus* 37 ± 5 for *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup>; two-way ANOVA *posthoc* Sidak's multiple comparisons test p>0.05), indicating deficits in social novelty preference in both *Syngap1*<sup>+/-</sup> and *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mice.

Finally, we tested spatial working memory by measuring spontaneous alternation in the T-maze YYY. Spontaneous alternation was strongly altered in both *Syngap1*<sup>+/-</sup> and Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> relative to their respective control littermates (Figure 7d; 67 ± 6% for *Syngap1*<sup>+/+</sup> vs 41 ± 11% for *Syngap1*<sup>+/-</sup>; 64 ± 7% for *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> vs 33.333 ± 11% for Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup>, One-way ANOVA test p<0.05), suggesting impaired spatial working memory in both mutant lines. On the other hand, we found that Tg(*Nkx2.1-Cre*) mice showed no statistical difference in locomotion, anxiety, spontaneous alternation and social recognition behavior (Suppl. Figure 6). All together, these data show that specific inactivation of *Syngap1* in MGE-derived interneurons recapitulates at least in part the behavioral and cognitive alterations observed in mice with germline *Syngap1* haploinsufficiency.



## DISCUSSION

Our data show that *Syngap1* is required for the proper terminal axonal branching and bouton formation of cortical GABAergic PV+ basket cells both *in vitro* and *in vivo*. Further, MGE-restricted *Syngap1* haploinsufficiency causes deficits in cortical inhibitory synaptic transmission and gamma oscillations and specific impairments in social novelty preference and working memory, in adult mice. In contrast, a recent paper study failed in identifying cognitive deficits in *Gad2-cre;Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice<sup>17</sup>. One possible explanation for this discrepancy is that *Nkx2.1* and *Gad2* may be expressed at different developmental time points. In fact, *Nkx2.1* is already expressed in all MGE-derived GABAergic interneurons by E10.5<sup>45</sup>. On the other hand, while *Gad2* transcription starts early during embryogenesis<sup>50</sup> (around E11.5), it is possible that not all GABAergic cells express it at the same time. For example, GAD65, which is coded by *Gad2*, is barely expressed before P6 in rodent somatosensory cortex<sup>51</sup>. Consistent with this hypothesis, single-cell *Syngap1* deletion in basket cells in cortical organotypic cultures at EP10 had a more severe effect on the formation of their perisomatic innervations than when the same manipulation was performed later during development (compare Figure 1 and Suppl. Fig.2). *Syngap1* haploinsufficiency appears to disrupt the function of excitatory circuits mainly by affecting their early synaptic development<sup>16,17</sup>. Our observations suggest that *Syngap1* is also required during the early phases of the development of GABAergic circuit connectivity.

Another major difference is that, while *Gad2* is expressed by most GABAergic interneurons, *Nkx2.1* is expressed only by interneurons derived from the MGE, which include PV+ and SOM+ interneurons but not for example, those positive for the vasoactive intestinal polypeptide (VIP). Recent results demonstrate that VIP-expressing neurons form a disinhibitory microcircuit that is conserved across cortical regions<sup>52</sup>. In particular, VIP interneurons tend to inhibit most SOM+ and a fraction of PV+ interneurons. Inhibition of these interneurons in turn disinhibits principal cells *in vivo*, providing a form of gain control<sup>52</sup>. It is possible that removing *Syngap1* in all interneurons may allow homeostatic synaptic adjustments that are not otherwise engaged when *Syngap1* is removed only in MGE-derived interneurons. It will therefore be important to assess whether and how *Syngap1* regulates the synaptic connectivity of distinct GABAergic interneuron types other than PV+ basket cells.

Disruption of excitatory/inhibitory balance is emerging as a common theme for many neurodevelopmental disorders<sup>53,54</sup>. However, the critical challenge is to understand how specific circuit alterations resulting from mutations affect the development of cognitive abilities. Our study suggests new avenues of research for the understanding of mechanisms involved in *SYNGAP1*-related ID. For example, our results showed that *Syngap1* plays a role in the formation of perisomatic synapses by PV+ basket cells. These cells regulate network gamma oscillations<sup>48,55</sup>. Cortical gamma oscillations increase in power during tasks that require complex processing of sensory information, attention, working memory, and cognitive control, suggesting that gamma oscillations are crucial for cognition<sup>56</sup>. Interestingly, substantial evidence indicates that individuals with specific psychiatric disorders, such as schizophrenia or autism, show lower power of gamma oscillations induced during the performance of cognitive tasks compared to healthy individuals<sup>57,58</sup>. Here, we showed that MGE-specific *Syngap1* haploinsufficiency leads to reduced gamma oscillation power in awake, exploring mice, which in turn may contribute to the occurrence of cognitive deficits. It will be interesting to explore the presence of alterations in brain oscillations in patients carrying *SYNGAP1* mutations. Furthermore, cortical GABAergic inhibition, in particular the one mediated by PV+ cells, has been suggested to play a key role in critical period plasticity in the developing brain<sup>21,59</sup>. Critical periods represent heightened epochs of brain plasticity during childhood, during which experience can produce permanent, large-scale changes in neuronal circuits. By regulating critical period plasticity, PV+ cell-mediated inhibition may influence how experience shapes brain wiring during early life. As a consequence, altered PV cell connectivity and function could drive cortical neuronal circuits along abnormal developmental trajectories, which could then contribute to cognitive dysfunction. Ultimately, the understanding of *SYNGAP1* function in specific inhibitory and excitatory circuits might lead to the development of tailored therapies.

MGE-derived interneurons include PV+ basket cells and SOM+ interneurons<sup>60</sup>, thus alterations in the synaptic connectivity of this latter group may also contribute to the cognitive deficits that were observed in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice. Further, it is very likely that altered GABAergic signaling results in either causal or compensatory alterations in non-

GABA circuits as well, which can further play a role in cognitive dysfunctions in mutant mice. The main challenges will be to understand when these alterations arise and whether and to what extent cognitive deficits are due to either altered neural circuit development leading to diverse changes in brain and behavior and/or a state of continuous synaptic dysfunction in adulthood.

Haploinsufficiency of the *NFI* gene, which also codes for a RasGAP, causes neurofibromatosis type 1, a complex neuro-cutaneous condition that is associated with cognitive impairment and autism spectrum disorders. Decrease of *Nfi* induces deficits in hippocampal-dependent spatial learning, amygdala dependent-social learning, and prefrontal cortex-dependent working memory by increasing GABA release in these different areas of the brain through the activation of the Ras-ERK pathway<sup>61-64</sup>. The increase of Ras thus appears to produce opposite effects on GABA neurotransmission depending upon whether it is associated with *Syngap1* or *Nfi* haploinsufficiency. How can we explain this paradox? One possibility is that *Syngap1* and *Nfi* affect Ras activity at different time points during the development of GABAergic circuits. As discussed above, *Syngap1* haploinsufficiency might impact the establishment of GABAergic connectivity by acting during early synaptic development. *Nfi* might on the other hand modulate GABA release in mature synapses. Alternatively, it is possible that SYNGAP1 and the *Nfi* product, neurofibromin, function in distinct subcellular compartments of GABAergic neurons and thus regulate different processes. SYNGAP1 is associated with NMDA receptor complexes at the post-synaptic membrane of glutamatergic neurons<sup>1,2,29</sup>, raising the possibility that it also interacts with such receptors in GABAergic neurons<sup>65</sup>. In contrast, neurofibromin has been shown to localize to smooth vesiculotubular elements, cisternal stacks and multivesicular bodies in the cell body and dendrites of Purkinje cells, but not with the plasma membrane<sup>66</sup>. All together, these observations suggest that SYNGAP1 and neurofibromin modulate the development and function of GABAergic cells by regulating differently the spatial and/or temporal activity of Ras.

In summary, our study suggests that *Syngap1* haploinsufficiency affects GABAergic circuit connectivity and function, which in turn may contribute to cognitive alterations. Further

studies will be required to determine whether pharmacological interventions during development can rescue these deficits.

## MATERIAL AND METHODS

### *Mice*

*Syngap1*<sup>+/-</sup> mice were kindly provided by Dr Seth Grant (Edinburgh University, United Kingdom) and *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> by Drs. Irene Knuesel and Mary Muhia (University of Zurich, Switzerland). They were generated and genotyped as described in<sup>10,15</sup>. They were maintained as a heterozygous line onto a C57Bl/6 background. *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> mice were crossed with a mouse line bearing a transgene encoding the enzyme Cre recombinase under the control of the Nkx2.1 promoter (Jackson Laboratory #008661). This promoter drives the expression of the Cre protein in GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence starting at embryonic day 10.5<sup>45</sup>. The resulting animals were referred to as Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mice. In order to obtain Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> mice, we crossed Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> individuals with *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> mice. To validate the specificity of Cre expression, we backcrossed these mice with a GFP reporter line (RCE mouse<sup>46</sup>).

### *Primary cortical neuron culture*

Cortical neurons from E18 rat embryos were dissociated mechanically and plated on dishes treated with poly-D-lysine (0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Neurons were cultured overnight in attachment medium: MEM (Invitrogen) supplemented with 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 0.6% D-glucose (Sigma-Aldrich), and 10% horse serum. The medium was replaced the next day with maintenance medium: Neurobasal-A medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Invitrogen) and 1% L-glutamine (Invitrogen). The maintenance medium was replaced with fresh medium at 3DIV. Subsequently, the medium was replaced every six days with maintenance medium until harvesting the cells. Cultures were incubated in a humidified incubator at 37°C with a 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere during 21 days then were fixed in 100% methanol (-20°C) for 5 min. The fixation was stopped by adding 0.3M glycine for 5 min. Neurons were permeabilized with 0.25% Triton in phosphate buffer pH 7.4, washed and blocked for 0.5h in 3% BSA at room temperature. Cultures were then incubated for 1h with anti-GAD67 antibody (mouse, 1:200, Abcam #26116) or anti-PV antibody (mouse, 1:500, Sigma, #P3088) and anti-SYNGAP1 antibody (rabbit, 1:200, Abcam #3344), followed by incubation with Alexa 488-conjugated IgG (goat anti-rabbit, 1:400, Invitrogen #A-11008) and Alexa 555-conjugated IgG (goat anti-mouse 1:400, Invitrogen #A-21422) for 0.5h at RT,

then mounted in Prolong (Invitrogen #P-7481) and stored at 4°C. Images were acquired using a confocal microscope (LEICA TCS SPE).

### ***Cortical organotypic culture and biolistic transfection***

Slice culture preparation and gene gun transfection were performed as described in<sup>37,40</sup>. Briefly, post-natal day 4 *Syngap1*<sup>flox/flox</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>flox/+</sup> and *Syngap1*<sup>flox/+</sup> mice were decapitated, brains were rapidly removed and immersed in culture medium (containing DMEM, 20% horse serum, 1mM glutamine, 13 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 μM/mL insulin, 30 mM HEPES, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 0.001% ascorbic acid). Coronal brain slices, 400 μm thick, were cut with a chopper (Stoelting). Slices were then placed on transparent Millicell membrane inserts (Millipore), usually two to three slices per insert, in 30 mm Petri dishes containing 750 μL of culture medium. Finally, they were incubated in a humidified incubator at 34°C with a 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. Medium was changed three times per week. All procedures were performed under sterile conditions. Constructs to be transfected were incorporated into “bullets” that are made using 1.6 μm gold particles coated with 25–30 μg of one of the plasmids of interest. These bullets were used to biolistically transfect slices by gene gun (Bio-Rad) at high pressure (180ψ) 6 or 12 days after slice culture preparation. The transfected slices were incubated for 8 or 14 days at the time period of interest, under the same conditions as described above, before imaging. In experiments where *Syngap1* was deleted in PV+ single basket cells in an otherwise wild-type background, organotypic slices from *Syngap1*<sup>flox/flox</sup> mice were transfected either with pGAD<sub>67</sub>-GFP (*Syngap1*<sup>+/+</sup>, control basket cells), or pGAD<sub>67</sub>-Cre/pGAD<sub>67</sub>-GFP (*Syngap1*<sup>-/-</sup> basket cells). In particular, for each mouse half of the organotypic cultures were transfected with pGAD<sub>67</sub>-GFP and half with pGAD<sub>67</sub>-Cre/pGAD<sub>67</sub>-GFP, thus allowing us to control for inter-animal variability. Organotypic slices from *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>flox/+</sup> and *Syngap1*<sup>flox/+</sup> were transfected with pGAD<sub>67</sub>-GFP to visualize PV+ basket cells morphology a minimum of 5 days before imaging.

### ***Immunohistochemistry, image acquisition and analysis of basket cells in cultures.***

Slices were fixed and immunostained as described previously<sup>37,40</sup>. To visualize basket cell targeted neurons, we used anti-NeuN (monoclonal antibody, 1:400; Millipore Bioscience

Research Reagents), followed by incubation with Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-mouse IgG (1:400; Invitrogen). Only one basket cell was acquired from each organotypic culture. Non-overlapping fields of axonal innervation from well-isolated basket cells were acquired with a 63x glycerol-immersion objective (NA 1.4; Leica) using a confocal microscope (LEICA TCS SPE). Z-stacks were acquired with 1 $\mu$ m steps, exported as TIFF files, and analyzed with Neurolucida software (MicroBrightField). Green and blue channels were separated, and basket cell axons and boutons were traced in three-dimensions in the green channel, which were then superimposed on the blue channel containing images of pyramidal cell somata (identified by NeuN immunofluorescence). Care was taken to analyze only those pyramidal cell somata that were complete and well isolated. The following parameters were analyzed for each basket cell: (1) perisomatic GFP-positive bouton density; (2) axonal terminal branching around targeted somata and (3) percentage of pyramidal somata putatively contacted by GFP-positive axons. In our three-dimensional Sholl analysis, Sholl spheres with a 1 $\mu$ m increment from the center of a pyramidal soma were used to quantify axon terminal branch complexity and bouton density around the pyramidal cell soma. Axon branch complexity around a single pyramidal cell soma was quantified as the average number of intersections between basket cell axons and the Sholl spheres in the first 9  $\mu$ m from the center of the pyramidal cell soma. We had chosen 9  $\mu$ m as the limiting radius for a Sholl sphere because it approximates the average pyramidal cell soma radius measured from pyramidal neurons immunostained with NeuN antibody. Bouton density around each pyramidal cell soma was measured within the same set of Sholl spheres and averaged among pyramidal neurons for each condition. Only pyramidal cell somata with Sholl spheres, which intersect basket cell axons in the first 9  $\mu$ m from the center of their soma, were taken for analysis. 15 to 20 pyramidal neurons located not more than 200  $\mu$ m from the soma were analyzed for each basket cell. By using this method, we obtained an unbiased estimate of the number of presumptive boutons within a given distance of a labeled pyramidal cells soma (NeuN profiles), because we did not manually choose the boutons that contact the target. The percentage of pyramidal somata innervated by basket cells was defined in a confocal stack by the number of somata potentially contacted by the GFP-positive axon divided by the total number of observed somata. At least two fields were imaged for each basket cell and the results were averaged. For these experiments, the number of basket cells was used as

independent replicate (N). All quantification was done blind to the genotype or the experimental conditions

***Analysis of perisomatic innervation in vivo.***

P45 mice were anesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA 4%) in phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed, immersed in PFA 4% overnight then cryoprotected in 30% sucrose (in sodium-phosphate buffer pH7.2) and finally embedded in optimal cutting temperature Tissue Tek®. Coronal sections (40 µm) from *Syngap1*<sup>+/-</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> and their control littermates of both sex were cut using a cryostat (Leica VT100). Brain sections were blocked in 10% NGS and 0.3% Triton X-100 for 2 h at RT. Slices were then incubated overnight at 4°C with anti-Parvalbumin (rabbit 1:1000, Swant) and anti-NeuN antibodies (mouse 1:400, Chemicon) followed by incubation with Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG and Alexa 633-conjugated anti-mouse IgG (1:400, Invitrogen) for 2h at RT. After washing, slices were mounted in Vectashield mounting medium (Vector). Confocal images were taken using a 63X oil objective (Leica NA 1.4). Scans from each channel were collected in multiple-track mode and subsequently merged. For each animal, three to four coronal sections containing the somatosensory cortex and an equal number containing the CA1 region of the hippocampus were imaged. Stacks were acquired with 1µm steps, exported as TIFF files and analyzed with ImageJ software. We analyzed the intensity of PV-positive puncta around layer 2/3 pyramidal cell somata because the size of their apical dendrite rendered their identification fairly easy, therefore reducing the variability in the analysis. For each identified neuronal soma, intensity was quantified in the optical section where the soma profile was larger, in particular an area 2 µm distal from the edge of a neuron profile was traced and outlined and staining intensity within this area was measured. Results of at least 30 NeuN-positive somata from the somatosensory cortex of each mouse were averaged. For these experiments, the number of animals was used as independent replicate (N). All quantification was done blind to the genotype.



### ***Viral vector and stereotaxic injections***

The pAAV.CAGGS.flex.ChR2.tdTomato.SV40 was a gift from Scott Sternson (Addgene plasmid # 18917) and was produced as AAV2/9 serotype by the UPenn Vector Core Facilities (University of Pennsylvania, Philadelphia). Mice aged postnatal day 24 to 28 (P24-P28) were used for all surgeries. Bilateral viral injections were performed at the following stereotaxic coordinates: 1 mm from bregma, 1 mm lateral from midline, and 0.70 mm vertical from cortical surface. Surgical procedures were standardized to minimize the variability of AAV injections. To ensure minimal leak into surrounding brain areas, injection pipettes remained in the brain for ~5 min after injection before being slowly withdrawn. The final injected volume for the AAV was 0.5  $\mu$ l. We waited 2 weeks for maximal viral expression. The titer for the viruses was  $\sim 2.69 \times 10^{12}$  genome copies/ml.

### ***Electrophysiology***

**mIPSC recordings.** Acute slices (300 $\mu$ m thickness) were prepared from hippocampus or somatosensory cortex of 7-9 week old *Syngap1*<sup>+/-</sup>; Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Syngap1*<sup>fllox/+</sup> mice and their respective control littermates of both sexes<sup>25</sup>. Slices were cut on a Leica vibratome in ice-cold oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) cutting solution containing 87mM NaCl, 2.5mM KCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM glucose, 75mM sucrose, 3mM pyruvic acid and 1mM ascorbic acid. Slices were then transferred to oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 124mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 26mM NaHCO<sub>3</sub> and 10mM glucose (pH 7.2-7.3; 300mOsm) and allowed to recover at room temperature for at least 1h before recording in ACSF. Whole-cell patch clamp recordings were obtained from visually identified pyramidal neurons in hippocampal CA1 region or somatosensory cortex layer 2-3 using borosilicate pipettes (3-5MW) and an upright microscope (Nikon Eclipse, E600FN), equipped with a water immersion long-working distance objective (40x, Nomarski optics) and an infrared video camera. To record miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs), the internal solution

contained 130mM CsCl, 10mM HEPES, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM EGTA, 5mM di-Na-phosphocreatine, 2mM ATP-Tris, 0.4mM GTP-Tris, 5mM QX-134 (pH 7.2-7.3; 280mOsm). mIPSCs were measured by holding the cells at -60mV in the presence of 10μM CNQX, 50μM D-APV and 0.5μM TTX (to block AMPA receptors, NMDA receptors and sodium channels, respectively). Data was acquired using Multiclamp 700A/B amplifiers (Molecular Devices) and digitized using Digidata 1322A/1440A and pClamp 10 (Molecular Devices). Recordings were low-pass filtered at 3 kHz and digitized at 20 kHz. Series resistance was regularly monitored during experiments and data were included only if the holding current and series resistance were stable. mPSCs were analysed using Mini-Analysis 6.0.3 (Synaptosoft) after detection of a well-defined baseline. Averages of at least 150 events from each cell were considered for analysis. For these experiments, the number of recorded pyramidal cells was used as independent replicate (N).

***Optogenetics.*** Slices were prepared as described above. Whole-cell patch clamp recordings were obtained from visually identified pyramidal neurons in somatosensory cortex layer 5 using borosilicate pipettes (3-5MW) and an upright microscope (Olympus BX50WI), equipped with a water immersion long-working distance objective (40x, Nomarski optics) and an infrared video camera. Care was taken to record from brain slices showing similar dense AAV transfection, i.e.tdTomato expression. The internal solution contained 120mM CsMeSO<sub>3</sub>, 5mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 10mM diNa-phosphocreatine, 2mM ATP-tris, 0.4mM GTP-tris, 0.5mM spermine, and 2mM QX-314-Cl. Light evoked IPSCs were recorded by holding the cell at 0 mV in the presence of 10μM CNQX and 50μM DL-APV. IPSCs were evoked by brief pulses of blue light (470 nm, custom-made LED system) delivered to the whole slice every 30s via a light guide positioned above the slice. Data was acquired using a Multiclamp 700A amplifier (Molecular Devices) and digitized using Digidata1440A and pClamp 10 (Molecular Devices). Recordings were low-pass filtered at 3 kHz and digitized at 20 kHz. Series resistance was regularly monitored during experiments and data were included only if the holding current and series resistance were stable. Light evoked IPSCs were analyzed using Clampfit 10 (Molecular devices). For these experiments, the number of recorded pyramidal cells was used as independent replicate (N).

***EEG recordings and gamma oscillation analysis.*** To analyze power in the gamma frequency band (30-80Hz), we monitored P80-P100 mice by continuous video-EEG recordings after implantation of electrodes in the hippocampus and the overlying cortex. The insertion of electrodes was performed under isoflurane anesthesia, while the head of the mouse was immobilized in a stereotaxic frame. A stainless steel bipolar electrode (Plastics-1 Inc., Roanoke, VA, USA) was positioned at the following coordinates with reference to Bregma: AP = - 1mm, ML = - 1mm and DV = 1.5mm for one electrode in the hippocampus and 0.5 mm for the one in the cortex (Paxinos and Watson, 2005). Following a 5-day recovery period, EEG was recorded with a Stellate systems 32-channel video-EEG recording unit for 2 weeks. Mice were monitored during 6-hour sessions (afternoon and night). An operator blind to the genotype extracted EEG traces during mouse exploratory behavior spanning 30 to 120 seconds. A total of 10 minutes of active exploration was selected for each mouse.

EEG recordings from the cortex and hippocampus were first analysed to detect time periods of strong theta oscillations, which were indicative of stable recordings during which the animal was exploring. In order to detect theta oscillations, we used the spectrogram method using discrete short-time Fourier transforms. More specifically, data sampled at 200 Hz were first low-pass filtered by a 100th order finite impulse response filter. Spectrograms were then built from the data set and separated into 1-s intervals, to which a Hamming window was applied. The discrete Fourier transforms were then evaluated over  $2^{14}$  points with zero padding. Finally, for each time slot, the algorithm identified oscillations with the highest intensity in the theta frequency band (4-12 Hz) and that lasted at least 1 s. The power spectral density was normalized in amplitude from 0 to 1 and equalized with an exponential function with exponent 0.15 to improve its contrast to random noise. This analysis resulted in a list of theta oscillations for each extracted EEG recording. For each time period of theta oscillations, we then calculated the average power in the gamma frequency band. Averages from the two groups were then compared with Wilcoxon rank sum tests since values were not normally distributed. Analysis was performed in Matlab (7.11.0) (The Mathworks, Natick, MA, USA). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### ***Behavioral studies***

All animals were kept under a light-dark cycle (12h light-12h dark) in a temperature and humidity controlled room. Food and water were available *ad libitum*. All procedures described here had been approved by the Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) of the Research Center of Sainte-Justine Hospital in accordance with the principles published in the Canadian Council on Animal's Care's (Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Feb 91). Room lights were kept low during all procedures but the Morris water maze experiments. For all experiments, a camera was mounted above the arena; images were captured and transmitted to a computer running the Smart® software (Panlab, Harvard Apparatus).

#### *Spontaneous openfield activity*

The openfield test was performed as previously described<sup>14</sup>. Each subject (P25) was gently placed in the center of the openfield, allowed to freely explore undisturbed for 10 min, after which the animal was removed, the arena cleaned with 70% ethanol and dried prior to testing the next animal. Locomotor activity was indexed as the total distance travelled (m).

#### *Elevated plus maze*

Experiments were performed as described in<sup>65</sup>. The test session lasted 5 min during which the animals (P27) were allowed to explore the maze freely before being removed and returned to their home-cage. The percentage of time spent in the open arms ( $\text{open}/(\text{open}+\text{closed}) \times 100$ ) was scored as a measure of anxiety-related behavior.

#### *Three-chamber*

A three-chamber arena was used to assess the social recognition performance of the mice<sup>68</sup>. The tested animal (P36) was placed in the middle of the central chamber and allowed to explore all the chambers for 10 min. During this habituation session, small wire cages were present, one in each opposite chamber. After habituation, an unfamiliar conspecific of the same sex and age (Stranger 1) was placed inside a small wire cage whereas the other remained empty. The tested animal was allowed to freely explore the three chambers of the apparatus for 10 min. At the end of this 10min, a new unfamiliar mouse of the same sex and the same

age (Stranger 2) was placed in the previously unoccupied wire cage and the tested mouse was examined for an additional 10 min to assess preference for social novelty. Stranger 1 and stranger 2 animals originated from different home cages and had never been in physical contact with the tested mice or between each other. Social novelty preference was evaluated by quantifying the time spent by the tested mice in each chamber during the third 10 min session.

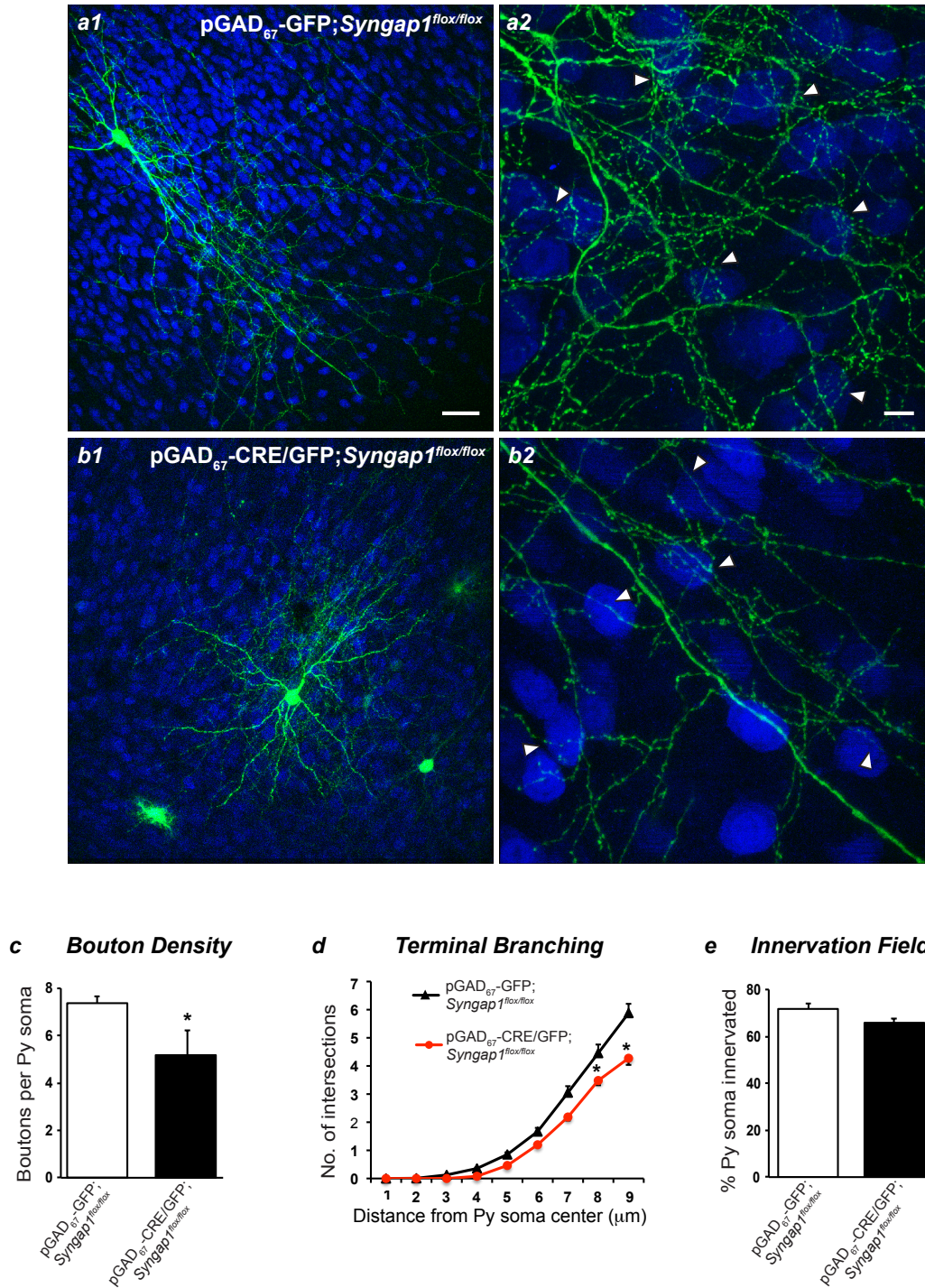
### *T-maze*

A discrete-two-trials spontaneous alternation paradigm in a T-maze apparatus was used to assess the working memory<sup>69</sup>. Each test consisted of a two free choice trials separated by a 1 min inter-trial interval (ITI) for three consecutive days. At the beginning of each trial, the animals (P38-40) were placed in the starting arm, allowed to freely move until one arm was chosen. The animals were left in the choice arm for 10 s before being removed and placed in the home-cage for 50 s. Then, the individuals were allowed to perform another free-choice trial. If the mice entered in the opposite arm than the first trial, the responses were considered as an alternation.

### ***Statistical analysis***

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between two groups were assessed with the Student's *t*-test for normally distributed data. Differences between multiple groups were assessed with one-way ANOVA with either Dunn's or Tukey's *post-hoc* test for non-normally distributed and normally distributed data, respectively. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison *post-hoc* test was used for the detection of differences in the novelty social recognition test and in light-evoked IPSC. mIPSC frequency and amplitude were represented with Tukey boxplots (median  $\pm$  1.5 x interquartile range, IQR; box represents 1st-3<sup>rd</sup> quartile). In the same graph, a cross represented mean mIPSC frequency and amplitude values.

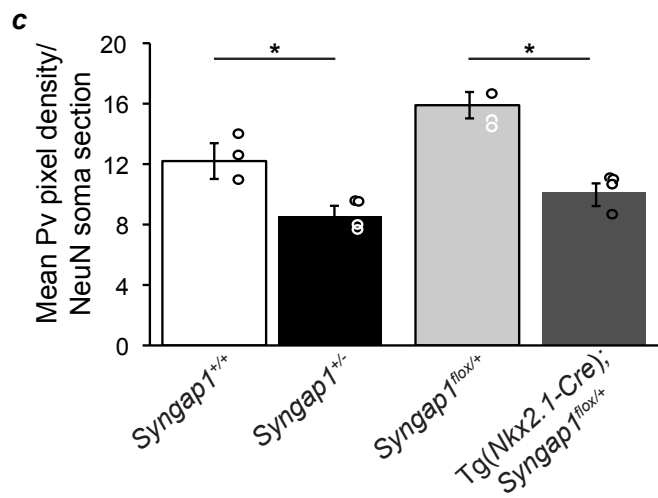
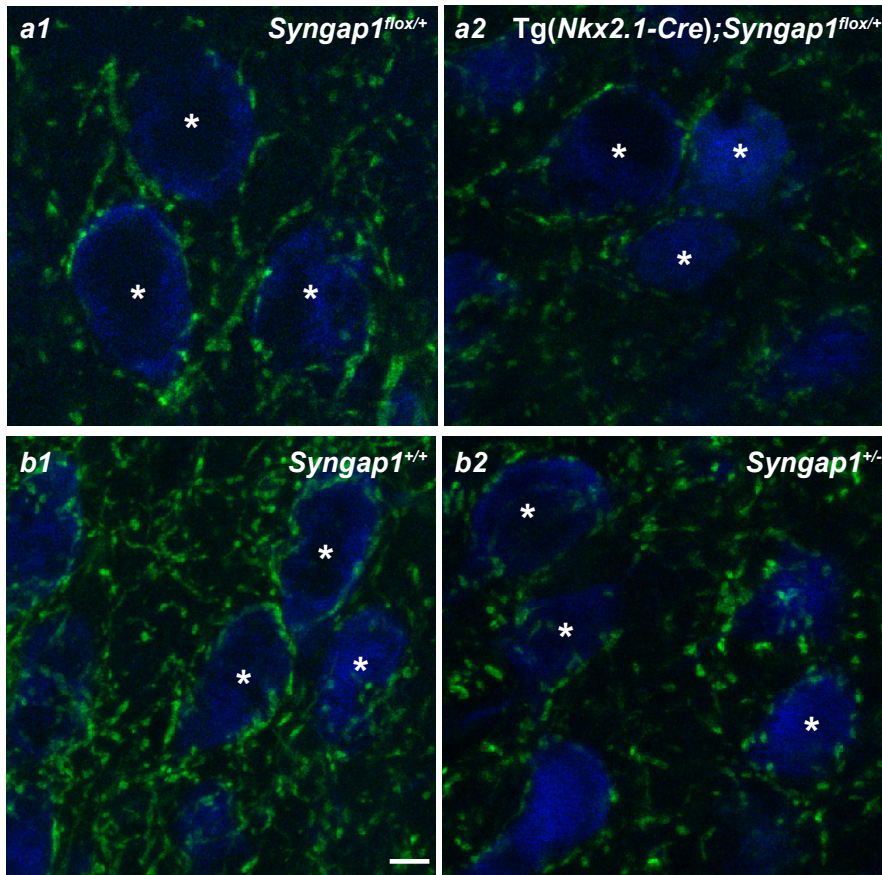
Figure 1



**Figure 1: Single-cell Cre-mediated inactivation of *Syngap1* reduces the number of cortical GABAergic basket cell boutons and terminal branching.**

(a1) Control GABAergic basket cell transfected with pGAD<sub>67</sub>-GFP (green, *Syngap1*<sup>+/+</sup> cell) in EP24 cortical organotypic cultures from *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> mice showing (a2) rich axonal branching and numerous clustered boutons (arrowheads) around NeuN-positive somata (blue). (b1, b2) Conversely, a basket cell transfected with pGAD<sub>67</sub>-Cre/GFP (*Syngap1*<sup>-/-</sup> cell) from EP16-24 shows markedly reduced axonal branching and perisomatic boutons (arrowheads). (c) Bouton density and (d) complexity of terminal axon branching are significantly decreased in *Syngap1*<sup>-/-</sup> basket cells (c, d, *Syngap1*<sup>+/+</sup> versus *Syngap1*<sup>-/-</sup>, Student's *t*-test \**p*<0.05), whereas the percentage of innervated cells (e) is not affected compared to age matched control basket cells (*Syngap1*<sup>+/+</sup> versus *Syngap1*<sup>-/-</sup>, Student's *t*-test, *p*>0.05). n=8 *Syngap1*<sup>+/+</sup> basket cells from n=5 mice; n=6 *Syngap1*<sup>-/-</sup> basket cells from n=5 mice. Scale bar: (a1, b1) 50μm, (a2, b2) 10μm.

Figure 2

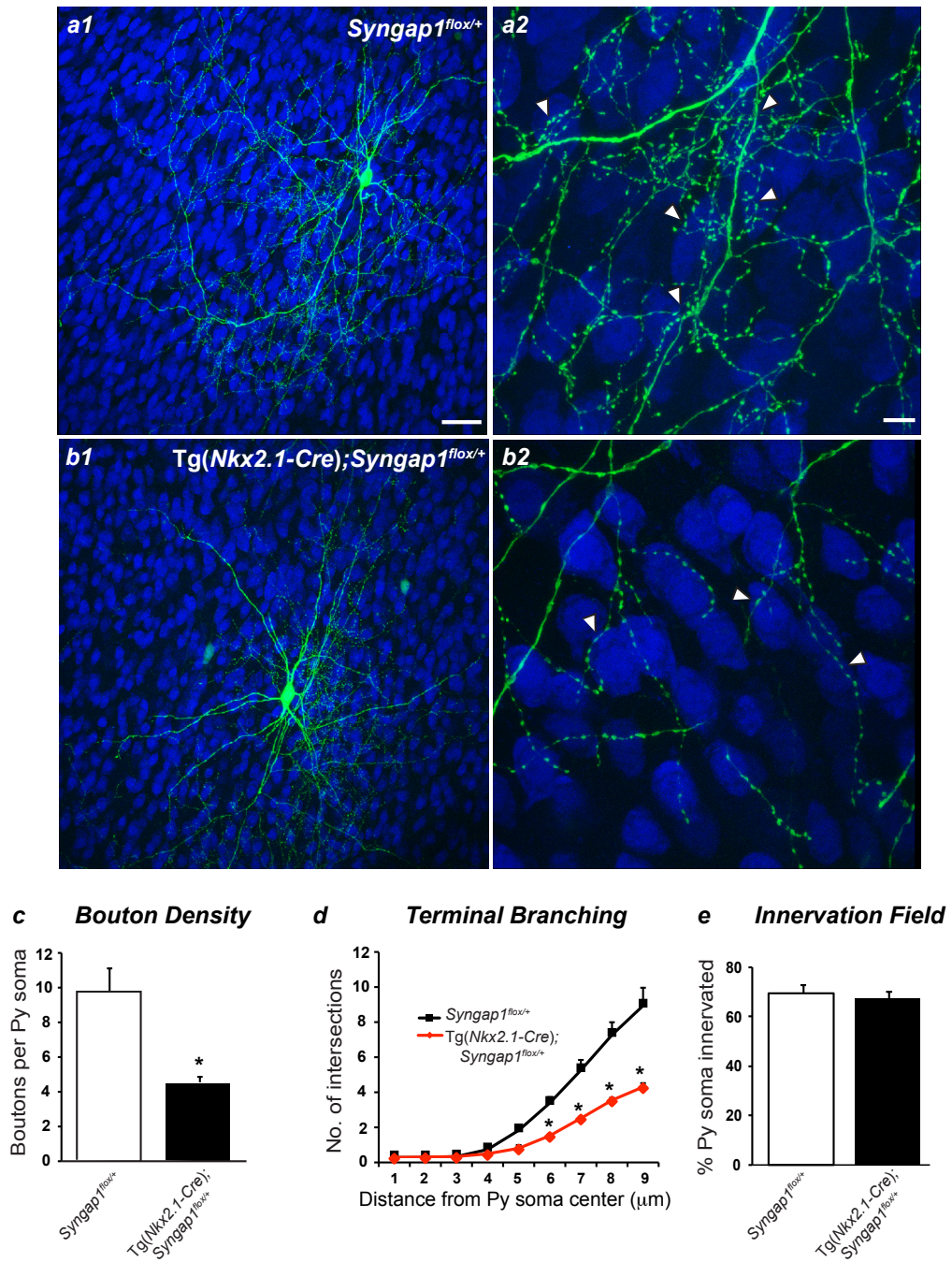




**Figure 2: Both MGE-specific and germline *Syngap1* haploinsufficiency reduce PV+ perisomatic innervation in the cortex of young adult mice.**

(a) Confocal images of layer 2-3 pyramidal cells in somatosensory cortex of P45 mice show distinct and intense PV-positive perisomatic rings (green), which enclosed a large portion of neuronal somata (NeuN, blue) in control *Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice (a1), whereas in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice (a2) perisomatic PV-rings are less intense and often do not form a complete ring around cell somata. (b) Similar differences can be observed between *Syngap1<sup>+/+</sup>* (b1) and *Syngap1<sup>+/-</sup>* (b2) mice. (c) Quantification shows that mean PV fluorescence per NeuN soma section is significantly reduced in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* and *Syngap1<sup>+/-</sup>* compared to their respective control littermates (Kruskal-Wallis One way ANOVA with Dunn's multiple comparisons *post-hoc* method, \* $p < 0.05$ ). Graph bars represent mean  $\pm$  SEM, circles represent values for each analyzed mouse. n=91 neurons from 3 *Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice; n=93 neurons from 4 *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice, n=100 neurons from 4 *Syngap1<sup>+/+</sup>*, n=109 neurons from 4 *Syngap1<sup>+/-</sup>*. Scale bar 10 $\mu$ m.

Figure 3

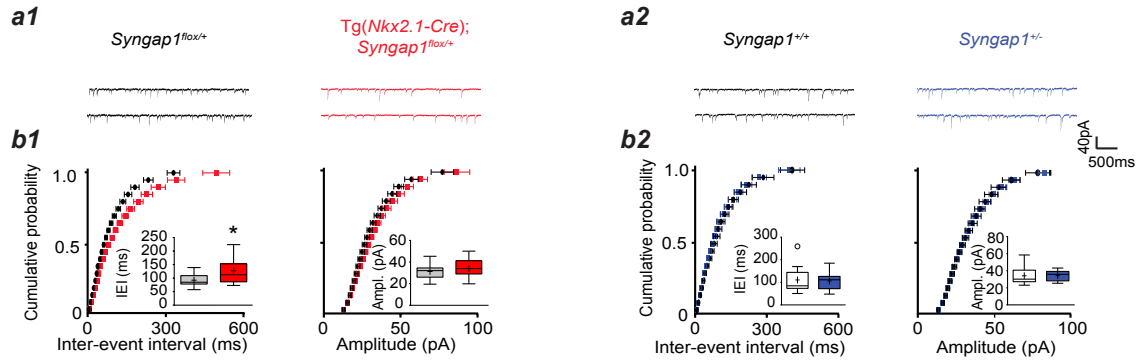


**Figure 3: *Syngap1* promotes terminal axonal branching and bouton formation in cortical MGE-derived basket cells.**

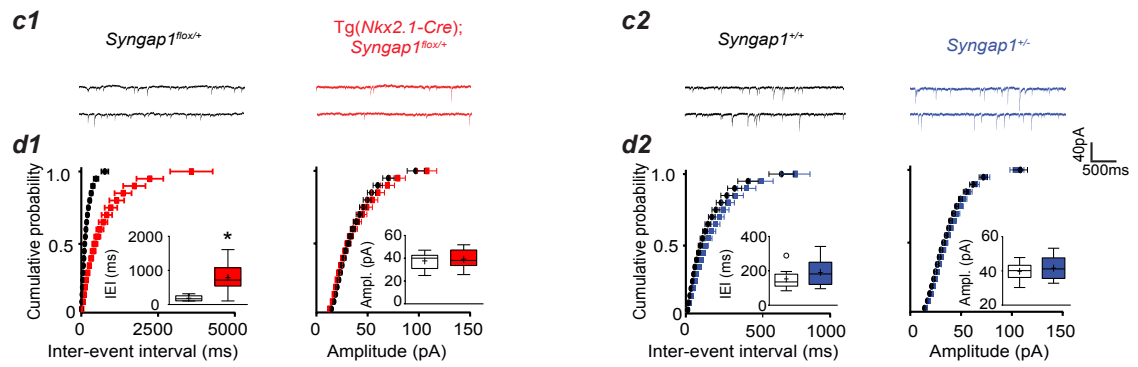
(a1) A GABAergic basket cell transfected with pGAD<sub>67</sub>-GFP (green) in EP24 cortical organotypic cultures from *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice showing dense axonal innervation and clustered perisomatic boutons (a2, arrowheads) around pyramidal somata (NeuN, blue). (b1) In contrast, age-matched basket cells from organotypic cultures from Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice show strongly reduced terminal axonal branching and bouton density around neuronal somata (b2, arrowheads). (c, d) MGE-derived basket cells from Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> show significantly reduced bouton density and less developed terminal branching (c, d, Student's *t*-test, \**p*<0.05) compared to age-matched basket cells from *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> cultures. (e) The percentage of innervated cells does not differ between the two phenotypes (Student's *t*-test, *p*>0.05); suggesting that *Syngap1* promotes the formation of local perisomatic innervations without affecting overall axonal growth. n=6 basket cells from 3 *Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice ; n=7 basket cells from 3 Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>fl<sup>ox</sup>/+</sup> mice. Scale bar: (a1, b1) 50μm, (a2, b2) 10μm.

Figure 4

Somatosensory Cortex L2-3



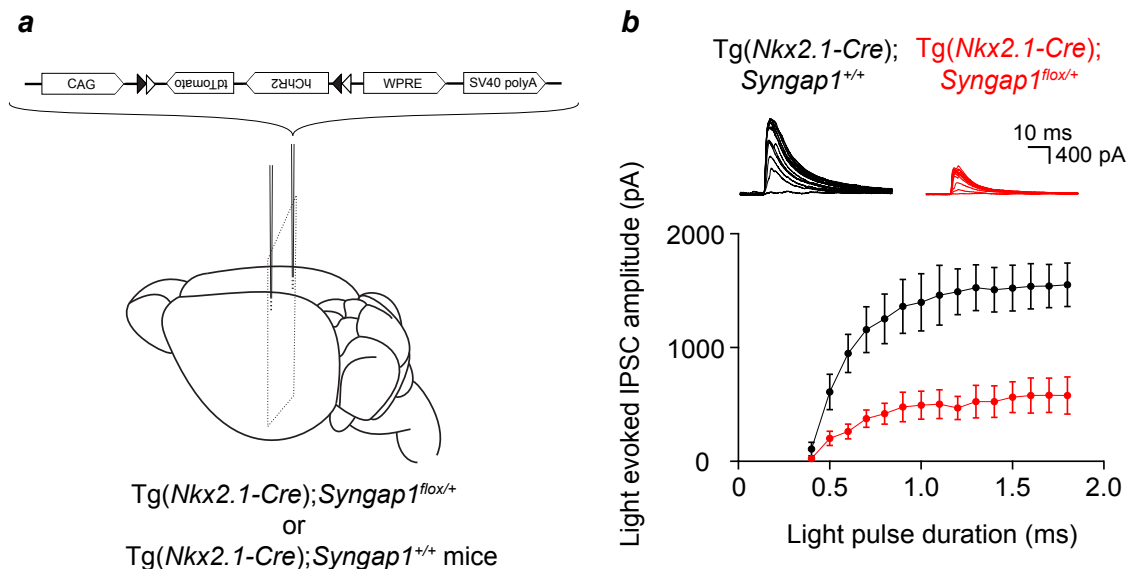
CA1 region



**Figure 4: *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons reduces mIPSC frequency.**

(a) Representative traces of mIPSCs from L2-3 pyramidal neurons in acute slices from *Syngap1<sup>flox/+</sup>* versus *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* (a1) and *Syngap1<sup>+/+</sup>* versus *Syngap1<sup>+/-</sup>* (a2) young adult mice. (b) mIPSC inter-event intervals are significantly longer in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* compared to *Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice (b1, K-S test,  $p < 0.001$ ; unpaired Student's *t*-test  $*p < 0.05$ ), but not in *Syngap1<sup>+/-</sup>* versus *Syngap1<sup>+/+</sup>* mice (b2, K-S test,  $p > 0.05$ ; unpaired Student's *t*-test  $p > 0.05$ ). mIPSC amplitude is not affected in either mouse line (b1, b2, K-S test,  $p > 0.05$  for inter-event interval; unpaired Student's *t* test  $p > 0.05$ ). (c) Representative traces of mIPSCs from CA1 pyramidal neurons in acute slices from *Syngap1<sup>flox/+</sup>* versus *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* (c1) and *Syngap1<sup>+/-</sup>* versus *Syngap1<sup>+/+</sup>* (c2) young adult mice. (d) mIPSC inter-event intervals, but not amplitudes, are significantly increased in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* compared to *Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice (d1, K-S test,  $p < 0.001$ ; unpaired Student's *t*-test  $*p < 0.05$ ). (d2) mIPSC inter-event interval and amplitude are not significantly affected in neurons from *Syngap1<sup>+/-</sup>* mice compared to control littermates (d2, K-S test,  $p > 0.05$ ; unpaired Student's *t* test  $p > 0.05$ ). Somatosensory cortex L2-3:  $n = 11$  neurons from  $n = 3$  *Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice;  $n = 16$  neurons from  $n = 4$  *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice;  $n = 15$  neurons from  $n = 6$  *Syngap1<sup>+/+</sup>* mice;  $n = 14$  neurons from  $n = 4$  *Syngap1<sup>+/-</sup>*. CA1:  $n = 9$  neurons from  $n = 4$  *Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice;  $n = 8$  neurons from  $n = 5$  *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* mice;  $n = 10$  neurons from  $n = 3$  *Syngap1<sup>+/+</sup>* mice;  $n = 9$  neurons from  $n = 3$  *Syngap1<sup>+/-</sup>*.

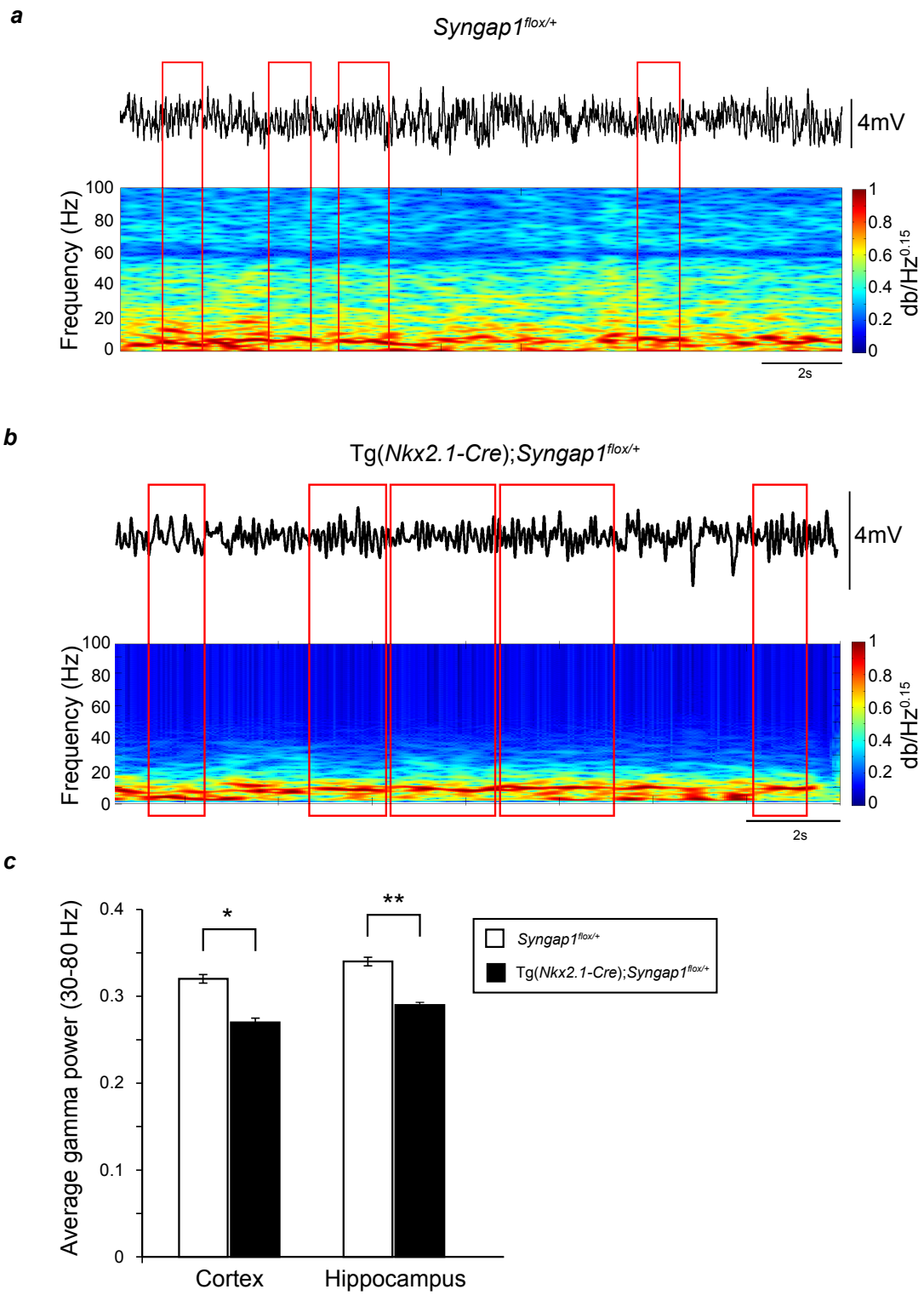
**Figure 5**



**Figure 5: *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons reduces their synaptic output to pyramidal cells.**

(a) Schematic of the experimental approach. pAAV.CAGGS.flex.ChR2.tdTomato.SV40 is bilaterally injected in somatosensory cortex of either Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>flox/+</sup> or Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>+/+</sup> young adult mice. This strategy allows ChR2 and tdTomato expression only in cells expressing Cre. (b) Upper panel. Traces of IPSCs recorded in response to light pulses of different duration in representative somatosensory cortex layer 5 pyramidal neurons in acute slices from Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>+/+</sup> (black) and Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>flox/+</sup> (red) mice. Lower panel. Summary graph showing data from input-output function of inhibitory responses evoked by light stimulation. The IPSC amplitudes are significantly lower in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>flox/+</sup> compared to Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>+/+</sup>, starting from the third point of the input-output function (2-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test,  $p < 0.0001$ ).  $n = 7$  neurons from  $n = 4$  Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>+/+</sup> mice;  $n = 9$  neurons from  $n = 4$  Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>flox/+</sup> mice.

Figure 6

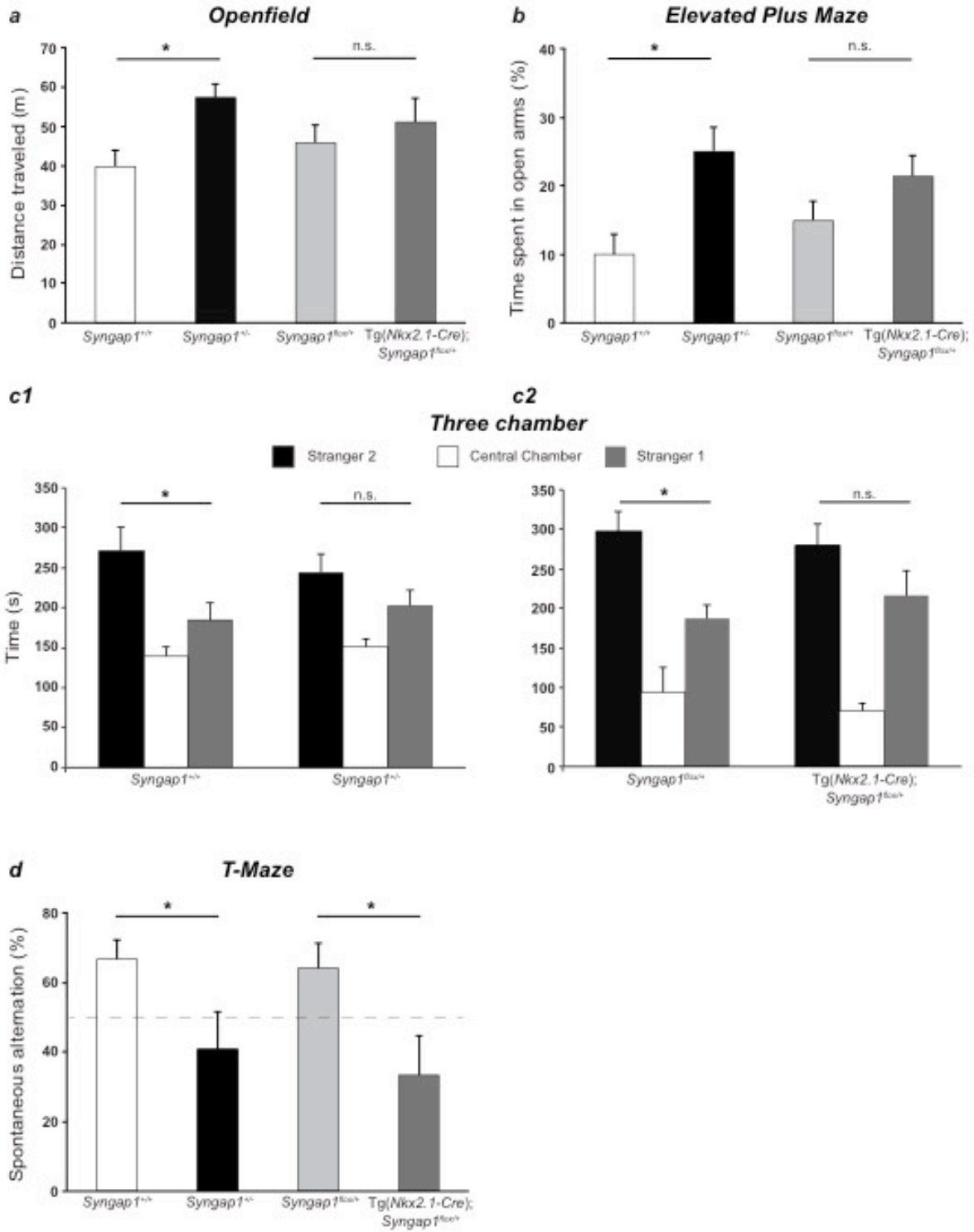


**Figure 6: *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons impairs cortical gamma oscillations during active exploration in awake mice.**

(a,b) Representative examples of EEG recordings from the cortex of adult (a) *Syngap1<sup>fllox/+</sup>* and (b) *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice with corresponding spectrogram. Note that although theta oscillations (red boxes) are detected in both animals, gamma power is lower in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* during these oscillations. (c) Bar graph showing the average power in the gamma frequency band in the cortex and the hippocampus for both groups. Note that in both regions, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* showed less power in the gamma frequency band (\*p<0.01, \*\*p< 0.001).



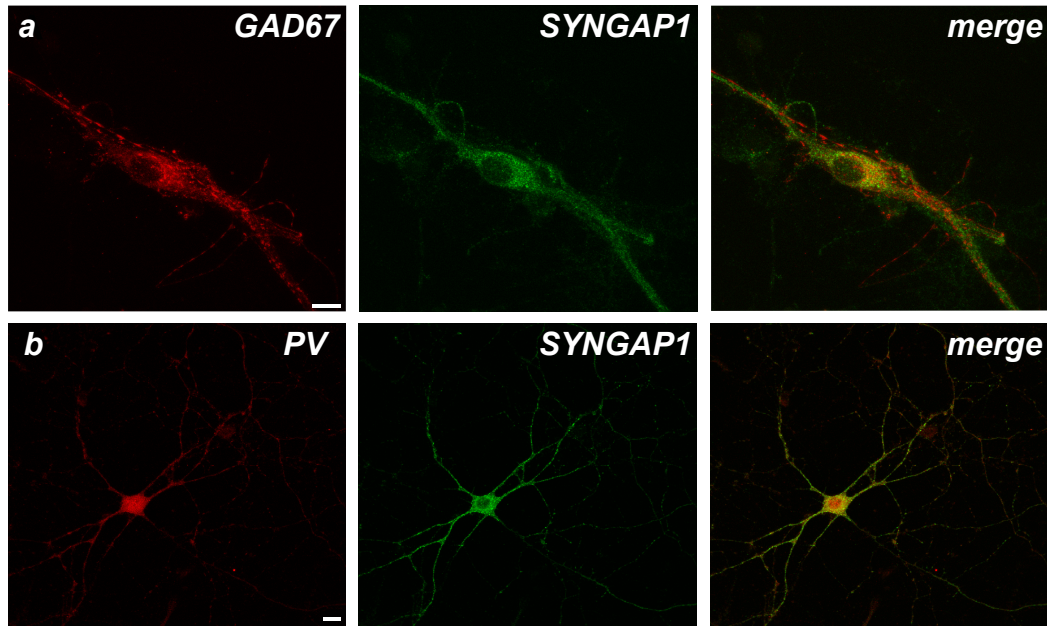
Figure 7



**Figure 7: Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>lox/+</sup> mice show cognitive deficits that partially recapitulate those observed in Syngap1<sup>+/-</sup> mice.**

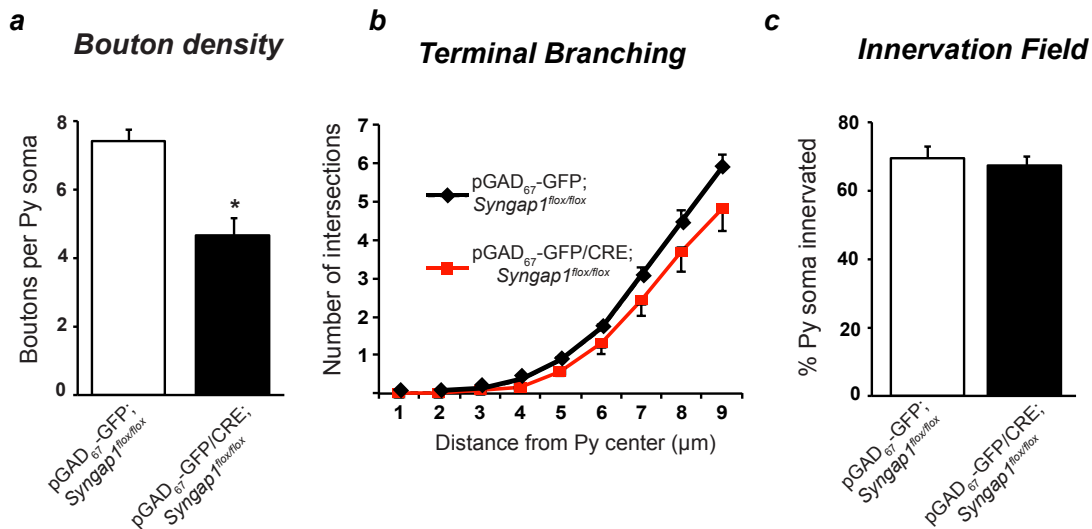
(a, b) *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice show hyperactivity (a, Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's method *post-hoc* test, \*p<0.05) and altered stress levels (b, One way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test, \*p<0.05), while Tg(Nkx2.1-Cre);*Syngap1*<sup>lox/+</sup> mice behave similarly to their control littermates in the open field (a) and elevated plus maze (b) tests (p>0.05; n.s., not significant). (c) *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice (c1) and Tg(Nkx2.1-Cre);*Syngap1*<sup>lox/+</sup> (c2) mice show social novelty preference impairment and spend similar amount of time in the chambers with either the novel (Stranger 2) or the familiar mouse (stranger 1), contrary to their control littermates, which spend more time with the novel mouse (Stranger 2 X Stranger 1 X Genotype, Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison *post-hoc* test, \*p<0.05). d) Both Tg(Nkx2.1-Cre);*Syngap1*<sup>lox/+</sup> and *Syngap1*<sup>+/-</sup> mice perform worse than their littermates on the T-maze test (Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's method *post-hoc* test, \*p<0.05). Open field and Elevated T Maze: n=12 *Syngap1*<sup>+/+</sup>, n=11 *Syngap1*<sup>+/-</sup>, n=12 *Syngap1*<sup>lox/+</sup>, n=11 Tg(Nkx2.1-Cre);*Syngap1*<sup>lox/+</sup> mice. For three-chamber test: n=10 *Syngap1*<sup>+/+</sup>, n=10 *Syngap1*<sup>+/-</sup>, n=10 *Syngap1*<sup>lox/+</sup>, n=16 Tg(Nkx2.1-Cre);*Syngap1*<sup>lox/+</sup> mice. For T-maze, n=15 *Syngap1*<sup>+/+</sup>, n=9 *Syngap1*<sup>+/-</sup>, n=13 *Syngap1*<sup>lox/+</sup> n=9 Tg(Nkx2.1-Cre);*Syngap1*<sup>lox/+</sup> mice.

**Suppl. Figure 1**



**Suppl. Figure 1: GABAergic interneurons express Syngap1.**

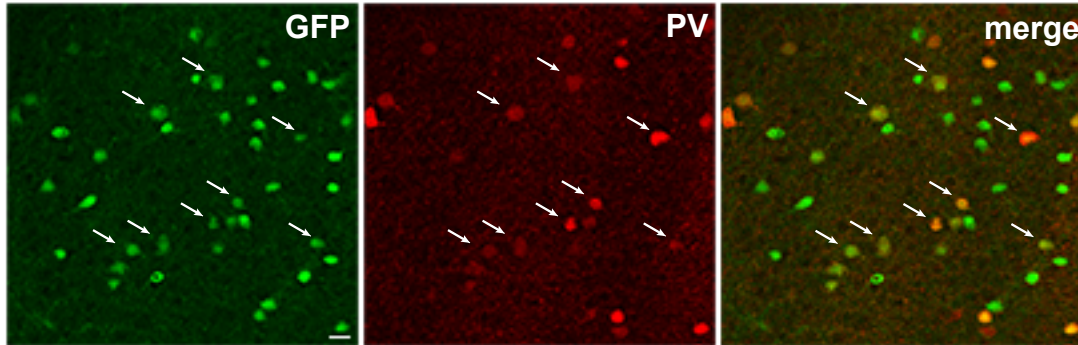
(a, b) Dissociated cortical neurons from E18 rat embryos cultured for 21 days *in vitro* and immunostained for (a) GAD67 (red) or (b) PV (red) and SYNGAP1 (green) show colocalization of both GAD67 and PV with Syngap1. Scale bar, 10 $\mu$ m.



**Suppl. Figure 2: Cre-mediated inactivation of *Syngap1* from EP16 to EP24 reduces basket cell bouton density.**

Cortical organotypic cultures prepared from *Syngap1*<sup>flx/flx</sup> mice were transfected at EP16 with pGAD<sub>67</sub>-GFP (pGAD<sub>67</sub>-GFP;*Syngap1*<sup>flx/flx</sup> cells) or pGAD<sub>67</sub>-Cre/GFP (pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre;*Syngap1*<sup>flx/flx</sup> cells), fixed at EP24 and stained for NeuN. Perisomatic bouton density is significantly decreased in pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre; *Syngap1*<sup>flx/flx</sup> basket cells (a; Student's *t*-test \**p*<0.05), whereas the complexity of terminal axon branching (b) and the percentage of innervated cells (c) are not affected compared to age matched control basket cells. n=8 pGAD<sub>67</sub>-GFP;*Syngap1*<sup>flx/flx</sup> basket cell from n=4 mice and n=6 pGAD<sub>67</sub>-GFP/Cre;*Syngap1*<sup>flx/flx</sup> basket cells from n=4 mice.

**Suppl. Figure 3**

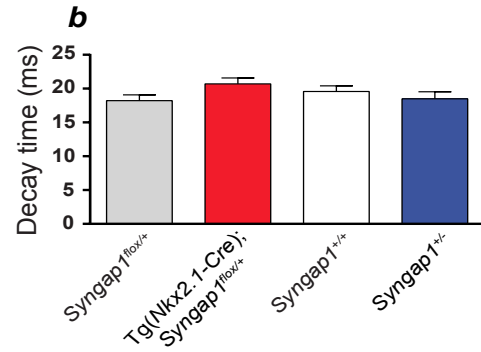
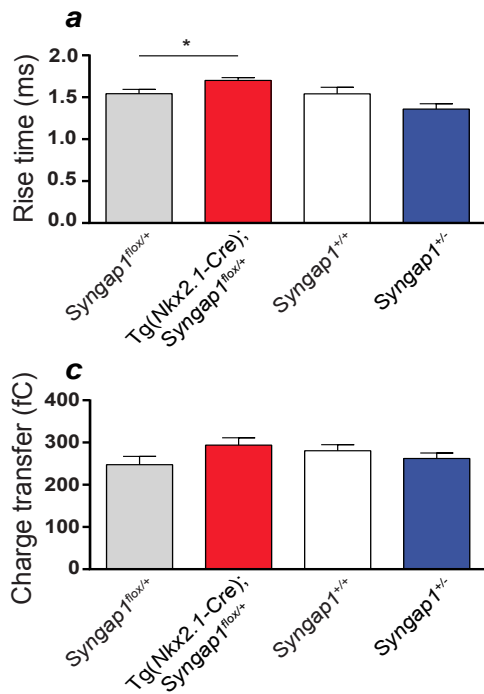


**Suppl. Figure 3: Cortical PV+ cells show Cre-mediated activation of GFP in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>flox/+</sup>;RCE mice.**

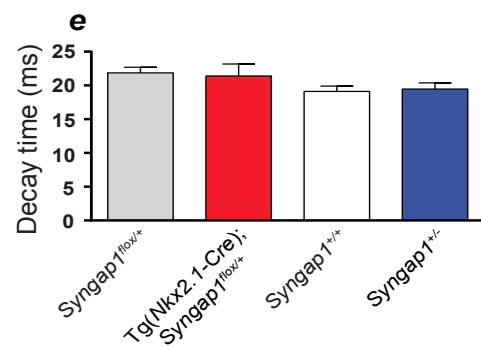
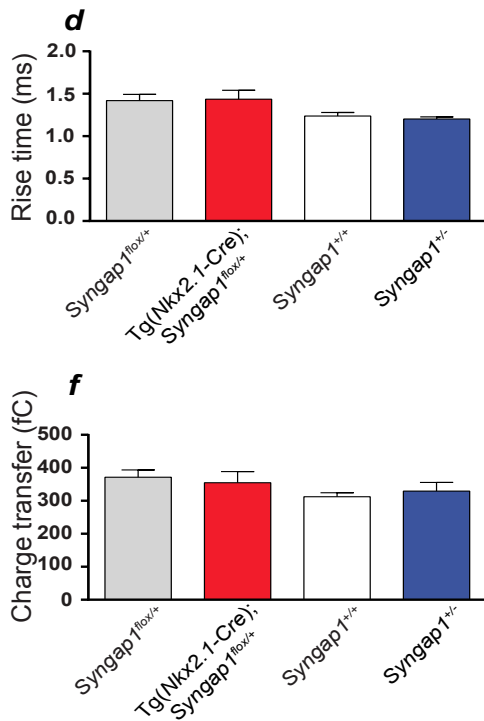
Confocal images of layer 2-3 pyramidal cells in somatosensory cortex of P45 mice show that the large majority of PV+ cells (red) express GFP (arrows, Green) in Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Syngap1*<sup>flox/+</sup>;RCE mice. Scale bar 10 $\mu$ m.

Suppl. Figure 4

Somatosensory Cortex L2-3



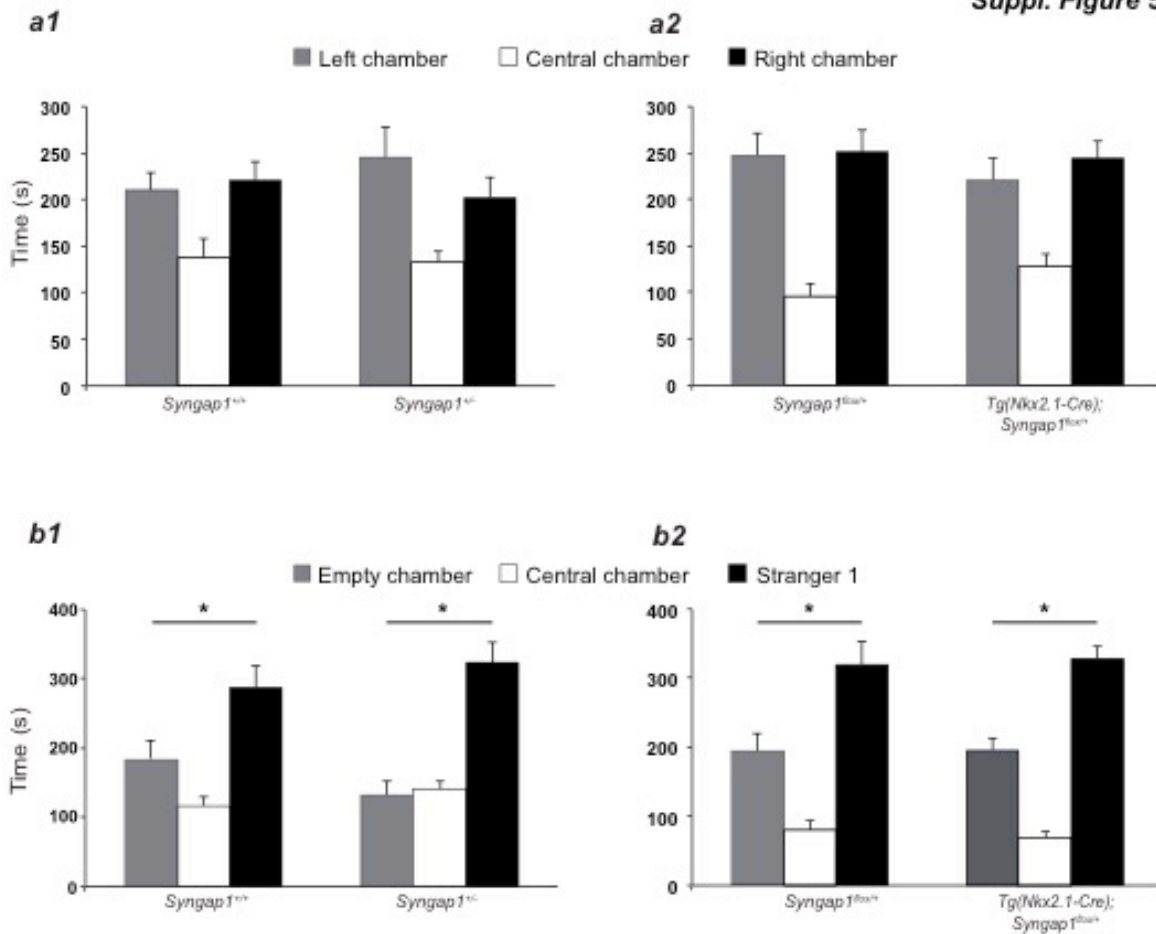
CA1 region



**Suppl. Figure 4: mIPSC kinetics and charge transfer in mice carrying *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived interneurons.**

(a, b, d, e) Rise and decay time of mIPSC recorded from L2-3 somatosensory cortical (a, b) and CA1 (d,e) pyramidal neurons from *Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* and *Syngap1<sup>+/+</sup>* and *Syngap1<sup>+/-</sup>* acute slices are not affected by the different genotype (unpaired Student's *t*-test,  $p > 0.05$ ), except for a small increase in rise time in *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* (a, unpaired Student's *t*-test,  $*p < 0.05$ ). (c, f) mIPSCs charge transfer from L2-3 somatosensory cortical (c) and CA1 (e) pyramidal neurons from *Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>*, as well as *Syngap1<sup>+/+</sup>* and *Syngap1<sup>+/-</sup>* acute slices (unpaired Student's *t*-tests  $p > 0.05$ ). Somatosensory cortex L2-3: n=11 neurons from n=3 *Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice; n=16 neurons from n=4 *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice; n=15 neurons from n=6 *Syngap1<sup>+/+</sup>* mice; n=14 neurons from n=4 *Syngap1<sup>+/-</sup>*. CA1: n=9 neurons from n=4 *Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice; n=8 neurons from n=5 *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>* mice; n=10 neurons from n=3 *Syngap1<sup>+/+</sup>* mice; n=9 neurons from n=3 *Syngap1<sup>+/-</sup>*.

Suppl. Figure 5



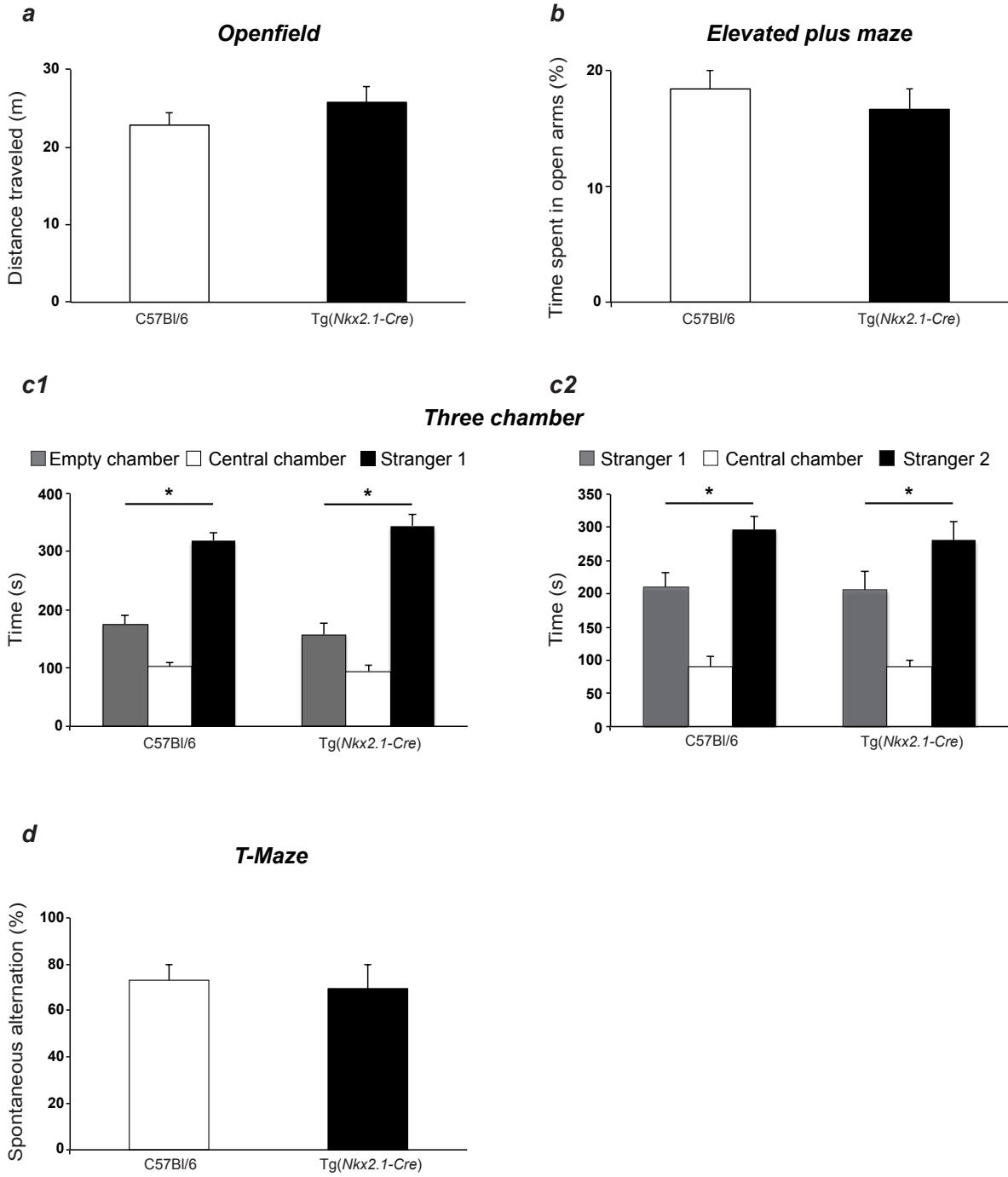
**Suppl. Figure 5: *Syngap1*<sup>+/-</sup> and *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>flox/+</sup> mice show normal social approach behavior.**

(a1) *Syngap1*<sup>+/+</sup>, *Syngap1*<sup>+/-</sup>, and (a2) *Syngap1*<sup>flox/+</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>flox/+</sup> mice (n=10 for each genotype) were allowed to freely explore the social interaction apparatus for 10 min (habituation). Time (s) spent in the chambers was recorded. Neither genotype was demonstrated any preference for right or left chamber during habituation session (Right chamber X Left chamber X Genotype, Two-way ANOVA Sidak's multiple comparison *post-hoc* test, *p*>0.05). (b1) *Syngap1*<sup>+/+</sup>, *Syngap1*<sup>+/-</sup>, and (b2) *Syngap1*<sup>flox/+</sup> and *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>flox/+</sup> mice (n=10 for each genotype) were tested for sociability with an unknown conspecific (social interaction). Both genotypes showed a significant preference for the stranger 1 relative to the chamber containing the empty cage (Stranger 1 X Empty chamber X Genotype, Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison *post-hoc* test, \**p*<0.05).





Suppl. Figure 6



**Suppl. Figure 6: *Tg(Nkx-Cre)* show normal locomotor, anxiety, spontaneous alternation and social behavior.**

(a, b) Comparison of *Tg(Nkx2.1-Cre)* mice with their control littermates (C57Bl6) show no statistical differences in open field (a) and elevated plus maze (b) (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).  $n = 6$  C57Bl/6 mice;  $n = 9$  *Tg(Nkx2.1-Cre)* mice.

(c) In the 3-chamber test, *Tg(Nkx2.1-Cre)* mice show a significant preference for the stranger 1 relative to the chamber containing the empty cage (c1) or with a novel mouse (Stranger 2) compared to a known mouse (stranger 1) (c2), as is the case for wild-type mice (Stranger 1 X Empty chamber X Genotype, Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison post-hoc test,  $*p < 0.05$ ).  $n = 12$  C57Bl/6 mice;  $n = 14$  *Tg(Nkx2.1-Cre)* mice. (d) *Tg(Nkx2.1-Cre)* mice perform as well as their littermates on the T-maze test. (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).  $n = 10$  C57Bl/6 mice;  $n = 11$  *Tg(Nkx2.1-Cre)* mice..

## Chapitre IV: Discussion

L'intégration par un neurone de signaux informatifs provenant des afférences inhibitrices et excitatrices et sa contribution comme unité fonctionnelle dans l'organisation de circuits neuronaux sont fondamentales dans le traitement efficace de l'information par le système nerveux central. D'établir et d'entretenir un ratio approprié entre les synapses inhibitrices et les excitatrices sont des phénomènes capitaux à l'essor d'une réponse cellulaire raffinée. La perte sélective d'un type particulier de synapses sans aucune forme de compensation (homéostatique, *feedback* rétroactif...), ou la survenue de conditions génétiques favorable à la formation ou au maintien d'une classe de synapses *versus* l'autre sont des facteurs contribuant au déséquilibre de ce ratio. Ces instabilités peuvent survenir au cours de la formation initiale des réseaux neuronaux tel qu'une défaillance dans le subtil et délicat mécanisme de raffinement crucial pendant les périodes critiques, ou encore être le résultat de l'incapacité du neurone et/ou du réseau neuronal à maintenir un équilibre excitation *versus* inhibition à l'âge adulte. Dans les neurones excitateurs des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>, la perturbation de ce ratio au delà d'un seuil de tolérance pour toutes compensations résulte en un état aberrant d'hyperexcitabilité se traduisant par une dégradation des processus de transmission de l'information synaptique associée à de sévères phénotypes cognitifs.

Dans le premier article adjoint à cette thèse, nos observations confirment l'association de la déficience intellectuelle avec les mutations dans le gène *SYNGAP1*, soulignent l'implication de *SYNGAP1* dans l'activation de la voie intracellulaire de ERK et démontrent que les mutations W362R, P562L et R579X affectent la fonction de la protéine soit en perturbant sa stabilité ou en interférant avec son activité de RasGAP. Par ailleurs, dans cet article nous avons mis au point un paradigme afin de tester l'impact fonctionnel des mutations de *SYNGAP1*.

L'altération de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition émerge comme cause commune de nombreux troubles neurodéveloppementaux<sup>399,400</sup>. Cependant le défi est de comprendre la spécificité des altérations au sein des circuits neuronaux particuliers et comment celles ci affectent le développement des performances cognitives. Alors que le rôle de *Syngap1* dans

cellules GABAergiques était controversé, nos résultats suggèrent que des problèmes dans le développement des interneurons issus de l'éminence ganglionnaire médiale contribuent au phénotype cognitif causé par l'haploinsuffisance de *Syngap1*.

### **Précautions, Limites & Questions en suspens**

Nous devons tenir compte que les cohortes sélectionnées de patients souffrant de déficience intellectuelle sont biaisées car enrichies en cas non-syndromique, sporadiques et idiopathiques. La prévalence des mutations dans le gène *SYNGAP1* dans la population générale des individus atteints de déficience intellectuelle est ainsi probablement inférieure à celle observée au sein de nos cohortes (3-4%). En effet une autre étude reporte un taux de 1%<sup>42</sup>. Néanmoins des mutations dans *SYNGAP1* ont été systématiquement découvertes dans des cohortes de patients révélant l'occurrence relativement commune des ces mutations comme cause de la déficience intellectuelle non syndromique. L'investigation de plus nombreuses et plus larges cohortes nous donnera une estimation plus précise de cette prévalence.

Nos observations indiquent que la réduction de *SYNGAP1* peut mener à différentes formes d'épilepsie généralisée. Malheureusement, une partie des patients atteints sont réfractaires aux diverses médications anti-épileptiques. Même si l'haploinsuffisance *de novo* (pour la très grande majorité) de *SYNGAP1* est associée à la déficience intellectuelle non syndromique, elle résulte donc en un spectre phénotypique. Au moins deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, nous ne pouvons pas exclure la présence de plusieurs variations bénignes (ou non) au sein du patrimoine génétique de ces patients pouvant contribuer à la variabilité phénotypique associée aux mutations dans *SYNGAP1*. L'identification de ces polymorphismes par des techniques de séquençage de nouvelles générations élargira nos connaissances dans la physiopathologie de la déficience intellectuelle, de l'autisme et de l'épilepsie. Deuxièmement, nos résultats suggèrent que la plupart, sinon toutes les mutations *de novo* dans le gène *SYNGAP1* découvertes jusqu'à présent aboutissent à la perte de fonction de la protéine. Cependant nous ne pouvons pas évincé la possibilité que

des mutations non encore identifiées s'avèrent avoir des effets dominants négatifs ou conférant un gain de fonction à la protéine. L'utilisation du paradigme établi dans le premier article de cette thèse dévoilera les conséquences fonctionnelles de telles mutations.

De récentes études suggèrent que *Syngap1* code grâce à l'utilisation de promoteur alternatif pour plusieurs isoformes. Ainsi, il existe divers fragments N et C terminaux de la protéine SYNGAP1 dont la production est contrôlée par l'épissage alternatif et l'activité synaptique<sup>118,115</sup>. L'isoforme SYNGAP1 alpha1 se lie à PSD95 et SAP102 grâce au motif QTRV interagissant avec le domaine structurel PDZ de protéines signalétiques, alors que SYNGAP1 alpha2 s'amarre à la CaMKII. D'autre part il est intéressant de noter que le motif QTRV de SYNGAP1 alpha1 n'est pas requis pour la localisation de la protéine au niveau du complexe protéique PSD (*postsynaptic domain*), mais est nécessaire à la régulation du trafic des récepteurs AMPA<sup>171,177</sup>. Bien que l'inactivation de *Syngap1* engendre un excès de GluR1 à la membrane des neurones excitateurs postsynaptiques et sa résultante l'augmentation des mEPSC, de récentes études prouvent que SYNGAP1 alpha1 décroît alors que SYNGAP1 alpha2 augmente les mEPSCs. SYNGAP1 beta et SYNGAP1 gamma, les autres isoformes C terminaux jusqu'alors décrit, n'ont pas été expertisés dans cette fonction<sup>115</sup>. Les isoformes de la queue N-terminale présentent également des effets opposés. SYNGAP1 B et SYNGAP1 C accroissent tandis que SYNGAP1 A réduit la « force » synaptique des récepteurs AMPA. Même si l'association des queues C et N terminales n'est pas connue *in vivo*, les auteurs ont examiné le rôle exercé par différentes combinaisons de la protéine. Confirmant notre intuition, il a été démontré que la protéine 5' -A SYNGAP1 alpha1- 3' diminue alors qu' 5'-B SYNGAP1alpha2- 3' accroît l'activité des récepteurs AMPA. Mais qu'en est il de l'isoforme 5'- A SYNGAP1 alpha2- 3' ? Ce dernier amoindrit l'activité de ces récepteurs glutamatergiques dans les cellules excitatrices<sup>115</sup>. Des études relatent de la présence de SYNGAP1 alpha1, SYNGAP1 alpha2 et SYNGAP1 beta dans la synapse excitatrice<sup>115</sup> et plusieurs évidences incluant nos résultats prouvent la production de SYNGAP1 par les interneurones. Tandis que SYNGAP1 beta est exprimé dans une sous population des interneurones GABAergiques, aucune donnée n'existe concernant les autres isoformes<sup>115</sup>. Nous proposons alors de déterminer quel(s) isoforme(s) sont exprimé(s) dans les interneurones GABAergiques et d'évaluer leur capacité de moduler le développement de l'innervation

GABAergique. A cet effet, en cultures dissociées nous débiterons par déterminer l'expression de tel ou tel isoforme. Nous procéderons de la même manière décrite dans le second article présenté dans ce devoir hormis l'utilisation d'anticorps spécifique à chacun des isoformes. Nous nous concentrerons ensuite sur les isoformes produits dans les interneurons GABAergiques afin de déterminer leur capacité de rétablir les altérations de l'innervation périsomatique GABAergique. Nous utiliserons des cultures organotypiques provenant de souris *Syngap1<sup>flox/flox</sup>* dans lesquelles nous transfecterons biolistiquement pendant la phase de formation des boutons GABAergiques (EP10-EP24), l'ADNc de chacun des isoformes d'intérêt en combinaison du plasmide pGAD<sub>67</sub>-Cre-GFP. Comme *Syngap1* intervient dans le développement de l'innervation GABAergique, nous supposons obtenir une restauration des altérations dans les cellules ciblées pour au moins un des isoformes testés. A l'instar des neurones excitateurs, il est probable que les différents isoformes de *Syngap1* aient des conséquences opposées sur l'innervation GABAergique.

Au sein des cellules glutamatergiques excitatrices, *Syngap1* contribue à restreindre l'activité de la voie intracellulaire Ras-ERK. Nous avons tiré profit de ces observations dans le premier article intégré à cette thèse, pour développer un paradigme en culture organotypique afin de valider l'impact fonctionnel dans les cellules pyramidales corticales des mutations dans le gène *SYNGAP1*. La transfection biolistique de l'ADNc de *SYNGAP1 wild-type* dans ces neurones réduit les niveaux de phosphoERK dépendant de l'activité, renforçant l'hypothèse de la régulation de la voie Ras-ERK par *Syngap1*. L'haploinsuffisance de *Syngap1* affecte-t-elle également les niveaux de phosphoERK dans la population des interneurons GABAergiques ? Afin de répondre à cette interrogation, nous proposons de réaliser des cultures organotypiques, de quantifier les niveaux d'expression de phosphoERK dans les interneurons GABAergiques issues de souris *Syngap1<sup>+/-</sup>* et *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>* en comparaison de cellules issues d'individus *Syngap1<sup>+/-</sup>* et *Syngap1<sup>flox/+</sup>*. Les interneurons seront identifiés par immunohistochimie contre la protéine parvalbumine. Que ce soit chez les souris *Syngap1<sup>+/-</sup>* ou *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>*, nous prédisons constater une augmentation des niveaux de phosphoERK dans les interneurons producteurs de parvalbumine, indiquant que *Syngap1* agirait à travers la même voie de signalisation dans les interneurons GABAergiques que dans les cellules excitatrices. Cependant, comme rencontré dans le premier article, il se peut que les

niveaux de phosphoERK soient variables entre différentes cellules de même type, biaisant d'autant la récolte de données significatives. Si ce problème apparaît, nous pourrions coordonner les cellules par l'administration de bicuculline, un inhibiteur des récepteurs GABA<sub>A</sub>.

Les interneurons GABAergiques producteurs de parvalbumine régulent la précision de l'input à la milliseconde, le gain de contrôle du neurone postsynaptique ou encore les oscillations corticales de type gamma<sup>401,402</sup>. L'inhibition corticale GABAergique, en particulier celle attribuée aux interneurons producteurs de parvalbumine est cruciale pour la plasticité synaptique lors des périodes critiques du cerveau en développement<sup>403,404</sup>. Ces périodes critiques représentent des fenêtres temporelles de très hautes plasticités synaptiques se déroulant pendant l'enfance/adolescence et au cours desquelles l'expérience peut produire des bouleversements permanents dans les circuits neuronaux. Ainsi, en régulant la plasticité synaptique lors des périodes critiques, les interneurons GABAergiques producteurs de parvalbumine influencent la manière dont l'expérience affecte le développement des complexes réseaux neuronaux. Il est aisé d'envisager que leurs altérations engendrent des anomalies dans les trajectoires développementales de tels circuits et puissent résulter en des déficits comportementaux et cognitifs. Notre travail à tirer profit de la souris mutante *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>*, permettant l'obtention de l'haploinsuffisance de *Syngap1* spécifiquement dans les interneurons GABAergiques issus de l'éminence ganglionnaire médiale. Ces derniers incluent les cellules productrices de parvalbumine et celles exprimant la somatostatine<sup>234</sup>. Ainsi les déficits dans le développement synaptique et la cognition de la souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>*, et par extension *Syngap1<sup>+/-</sup>* peuvent être issues d'altération des interneurons exprimant la somatostatine. Afin de circonscrire cette hypothèse, nous proposons de croiser les souris *Syngap1<sup>flox/flox</sup>* avec les souris *Som-IRES-Cre* (Jackson lab #013044) et de procéder aux mêmes expérimentations que réalisées avec la souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>flox/+</sup>*. Nous supposons obtenir des altérations dans l'innervation GABAergique, la neurotransmission inhibitrice ainsi que dans les tâches cognitives chez les souris *Som-IRES-Cre;Syngap1<sup>flox/+</sup>* comparé à leurs congénères contrôles.



SYNGAP1 restreint l'insertion synaptique des récepteurs AMPA des cellules pyramidales en réprimant la synthèse protéique<sup>405</sup>. En effet l'utilisation d'un siRNA contre SYNGAP1 augmente l'amplitude des mEPSC, la synthèse protéique, active la voie intracellulaire de mTOR comme suggéré par la hausse de l'activité de Rheb et de phosphorylation de p70SK6. L'administration de rapamycine (inhibiteur de mTORC1), d'anisomycine (inhibiteur de la synthèse protéique) ou encore de U0126 (inhibiteur d'ERK)<sup>405</sup> bloquent ces effets. Ceci suggère que SYNGAP1 affecte la force synaptique excitatrice en restreignant la synthèse des récepteurs AMPA et en agissant sur la fonction de mTOR *via* la suppression de l'activité de ERK. Si SYNGAP1 régule le développement et la fonction des interneurons GABAergiques par le même mécanisme reste toujours inconnu. Dans les interneurons des évidences prouvent l'activation de la voie intracellulaire de mTOR lors de la plasticité synaptique<sup>406,407</sup>. Nous explorerons cette question en déterminant si la diminution de l'expression de SYNGAP1 dans les interneurons GABAergiques altère l'architecture axonale et le développement synaptique *via* l'activation de mTOR. Nous réaliserons des tranches organotypiques issues de souris *Syngap1<sup>flox/+</sup>* ou *Syngap1<sup>flox/flox</sup>* transfectées biolistiquement le plasmide *pGAD<sub>67</sub>-cre-gfp* et effectuerons une immunohistochimie contre la protéine pS6, un marqueur de l'activité de mTOR. Nous prévoyons obtenir une augmentation de l'intensité de pS6 détecté dans les cellules GABAergiques *Syngap1<sup>+/-</sup>* ou *Syngap1<sup>-/-</sup>*. Si et seulement si la voie intracellulaire de mTOR est dérégulée par le retrait de SYNGAP1 dans les interneurons, nous utiliserons une approche pharmacologique afin d'investiguer les conséquences sur le développement de l'innervation GABAergique. Nous transfecterons biolistiquement le plasmide *pGAD<sub>67</sub>-cre-gfp* dans des cultures organotypiques issues de souris *Syngap1<sup>flox/flox</sup>* puis administrerons la rapamycine lors de la période de développement de l'innervation GABAergique (EP 18 – EP 24). Une autre possibilité est de traiter à la rapamycine des tranches issues de souris *Tg(Nkx2.1);Syngap1<sup>flox/+</sup>* transfectées préalablement avec le plasmide *pGAD<sub>67</sub>-gfp*. Nous prédisons obtenir la restauration au moins partielle de l'expression de pS6 ainsi que des déficits dans le développement de l'innervation périsomatique GABAergique à la suite de l'administration de rapamycine.

## Perspectives

**De quelle(s) façon(s) les mutations pathogéniques dans le gène *SYNGAP1* affectent le développement des synapses, la fonction des circuits neuronaux, le comportement et la cognition ?**

### **1 - Morphologie des épines dendritiques et développement de l'innervation GABAergique**

La morphologie des épines dendritiques sera inspectée au sein de cellules pyramidales excitatrices corticales en utilisant la culture organotypique. La transfection biolistique de pCMV-GFP sera réalisée dans les tranches organotypiques issues de souris contrôles, *Syngap1*<sup>+/-</sup>, Tg(*Nkx2.1*-Cre) ; *Syngap1*<sup>fllox/+</sup>, ou simplement en effectuant des cultures issues de souris possédant le génotype *Syngap1*<sup>+/-</sup>;Thy1-EGFP (les souris Thy1-EGFP expriment de hauts niveaux de GFP dans quelques cellules pyramidales isolées; Jackson lab # 007788; nous sommes en sa possession). Nous envisageons démontré une augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « *mushroom* » dans les cellules pyramidales hippocampiques ou corticales issues des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et *Syngap1*<sup>+/-</sup>;Thy1-EGFP en comparaison de celles issues de souris *Syngap1*<sup>+/+</sup> <sup>140</sup>. Si l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* est restreinte aux cellules GABAergiques dérivées de l'éminence ganglionnaire médiale, constaterons nous des changements dans la morphologie des épines dendritiques des cellules excitatrices ? Si aucune forme de compensation n'intervient, nous ne prédisons aucune altération dans la morphologie des épines dendritiques des cellules pyramidales chez la souris Tg(*Nkx2.1*-Cre) ; *Syngap1*<sup>fllox/+</sup>. Le développement de l'innervation périsonomatique GABAergique sera inspectée telle qu'exposée dans le deuxième article de cette thèse. Nous avons précédemment démontré (dans le second exposé dans cette thèse) les déficits dans l'innervation périsonomatique GABAergique chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et Tg(*Nkx2.1*-Cre) ; *Syngap1*<sup>fllox/+</sup>. Nous testerons alors si l'application des différentes drogues adaptées (exposées plus tard) permettent de rétablir la morphologie de la synapse dendritique lorsqu'administrées lors de ou après la maturation des synapses glutamatergique, processus se déroulant au cours de la première et deuxième semaine *in vitro*. Nous tenterons également de rétablir les altérations dans le développement

de l'innervation GABAergique observées chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> à cette pharmacopée. Nous en profiterons pour examiner les potentiels effets des drogues à long terme *id est* deux semaines après leurs retraits du milieu de culture.

## 2 - Etudes des courants efférents aux interneurons GABAergiques

Nous avons précédemment démontré que les mIPSCs enregistrées au niveau des cellules pyramidales hippocampique et corticale sont affectées par la réduction de la production de la protéine chez les souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> et *Syngap1*<sup>+/-</sup> en comparaison d'individus contrôles. Corroborant ces déficits, l'amplitude des oIPSCs corticaux (IPSC évoqués au moyen de l'optogénétique) chez la souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> est significativement diminuée par rapport aux enregistrements obtenus chez la souris *Tg(Nkx2.1-Cre)*. Afin d'examiner l'impact de l'haploinsuffisance de *Syngap1* sur la cellule GABAergique nous procéderons à l'enregistrement et l'analyse des courants postsynaptiques (miniatures et évoqués, excitateurs et inhibiteurs, excitateurs dépendant des récepteurs AMPA et dépendant des récepteurs NMDA) à l'instar des stratégies utilisées dans le second article présenté dans cette thèse. Dans le but d'être en capacité d'identifier et d'enregistrer les courants postsynaptiques afférents à un interneurone GABAergique, nous réaliserons ces expériences sur les souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> et également sur les souris porteuses du génotype *Syngap1*<sup>+/-</sup>; *Tg(Nkx2.1-Cre)* dans lesquelles nous injecterons l'adénovirus, décrit dans le second article (exprimant la protéine fluorescente YFP). Nous prédisons de constater des déficits dans la neurotransmission excitatrice enregistrée sur les interneurons GABAergiques corticaux des souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> et *Syngap1*<sup>+/-</sup> probablement causés par un excès de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique des interneurons GABAergiques. Nous envisageons démontrer des altérations dans la neurotransmission inhibitrice, renforçant l'hypothèse de l'atteinte des interneurons GABAergiques dans les phénotypes cellulaires associés à l'haploinsuffisance de *Syngap1*. Le potentiel thérapeutique de drogues adéquates (suggérées ci dessous) sera examiné grâce aux études des neurotransmissions excitatrices ainsi qu'inhibitrices.

## Quel est le rôle de SYNGAP1 dans la plasticité du cortex visuel

Bien que l'existence des périodes critiques aient été démontré dans les cortex sensoriel ou moteurs, la plupart de nos connaissances sur les mécanismes d'initiation, opérant ou encore terminant ces fenêtres de temps proviennent d'études réalisées sur le cortex visuel. Les neurones du cortex visuel primaire sont activés à divers degrés par les stimuli visuels présentés à un œil ou à l'autre, une propriété nommée la dominance oculaire. De clore un œil au cours d'une période spécifique du développement postnatal résulte en la perte irréversible de l'activité des neurones du cortex visuel de l'œil déprivé et à une drastique augmentation du nombre de neurones répondant aux stimuli de l'œil ouvert. Au contraire de ces dramatiques conséquences sur le jeune animal, même la clôturation prolongée de l'œil n'a que peu d'effets chez l'individu adulte. La privation monoculaire de stimuli lors de la période critique résulte en la perte de l'acuité visuelle des neurones de l'œil clos. Nous proposons de caractériser l'implication de *Syngap1* dans le développement des circuits neuronaux en fonction de l'expérience. A la suite de l'ouverture des paupières de l'œil précédemment clos, la relative contribution des yeux à la réponse visuelle corticale sera définie par le ratio de l'amplitude des réponses de l'œil contralatéral *versus* celle de l'œil ipsilatérale. Il est probable que l'activation soutenue de la voie intracellulaire Ras-ERK affecte la plasticité synaptique du cortex visuel chez les souris haploinsuffisantes pour *Syngap1*. En effet l'inhibition de ERK bloque la dominance oculaire induite par la privation visuelle de stimuli<sup>408</sup>. Son hyperactivité devrait ainsi la faciliter ! Par ailleurs, les circuits GABAergiques locaux contrôlent la fenêtre de plasticité synaptique dépendante de l'expérience dans le cortex visuel<sup>328</sup>. En particulier, la réduction de l'inhibition GABAergique conduit au délai de clôturation de cette spécifique période critique<sup>409</sup>. Au vue de nos résultats nous prévoyons un prolongement de cette fenêtre temporelle de plasticité synaptique dépendante de l'expérience dans le cortex visuel des souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1<sup>fllox/+</sup>*.

## Quel est l'impact de l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* sur la cognition ?

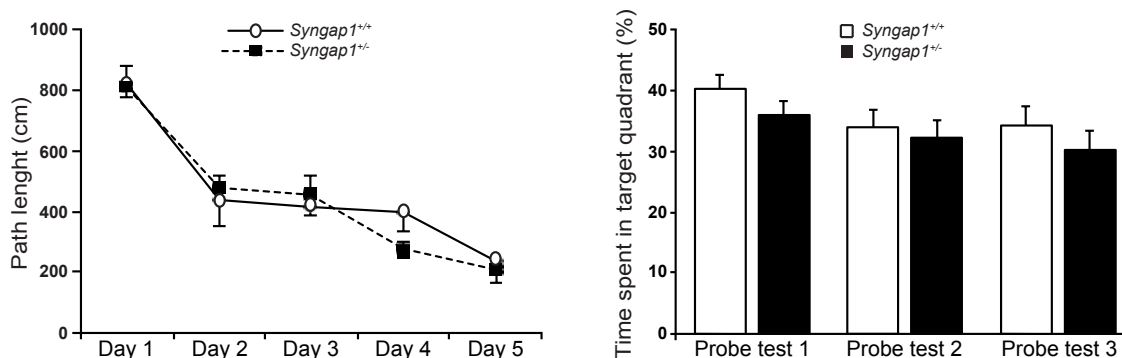
Nous avons tout d'abord reproduit les phénotypes comportementaux (hyperactivité, réduction du niveau relatif à l'anxiété, altérations de la mémoire de reconnaissance sociale et de la mémoire spatiale de travail) observés chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> avant d'exposer et révéler de solides évidences selon lesquelles l'haploinsuffisance de *Syngap1* restreinte aux interneurons GABAergiques dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale récapitulent certains déficits cognitifs de la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. Afin de tenter de restaurer les déficits cognitifs associés à l'haploinsuffisance de *Syngap1*, nous suggérons d'injecter les souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> et *Syngap1*<sup>+/-</sup> avec les drogues adaptées mentionnées au prochain chapitre et d'évaluer les performances de ces souris dans la batterie de tests comportementaux utilisés dans le second article présenté dans ce travail.

Par ailleurs il serait intéressant d'affiner le phénotype de nos souris mutantes haploinsuffisantes pour *Syngap1* dans le conditionnement à la peur. Aucune différence dans le temps de tétanie n'a été répertoriée chez les individus *Syngap1*<sup>+/-</sup> dans la version du conditionnement à la peur associé au contexte *a contrario* des résultats obtenus dans la version de ce test par indices<sup>197</sup>. Ces observations suggèrent d'importantes altérations dans l'apprentissage associatif lié au conditionnement par indices chez la souris *Syngap1* hétérozygotes. En connaissance du rôle des mécanismes GABAergiques dans les processus de conditionnement à la peur<sup>410</sup>, nous proposons d'examiner les performances des souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> dans ces deux versions du conditionnement à la peur. Nous prévoyons récapituler les données précédemment publiées pour les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. Dans le cas d'altérations dans la réponse sensorielle-motrice des souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup>, ceci révélera la contribution des interneurons GABAergiques dans ce phénotype. Si tel, nous tenterons de restaurer les éventuels déficits à l'aide de la pharmacopée proposée ci-haut.

Afin d'examiner le comportement de répétition, nous soumettrons les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> et leurs congénères contrôles au test

d'enfouissement de billes (*marble burying test*). Ce dernier utilisé à succès dans un modèle murin d'autisme<sup>406</sup>, consiste à placer individuellement les souris dans un nouvel environnement et de comptabiliser le nombre de billes enfouies en un temps limité. Nous prédisons que nos mutants murins de *Syngap1* enfouissent plus de billes que les souris contrôles soulignant un comportement compulsif à la répétition faisant partie du spectre phénotypique de l'autisme.

Nous avons évalué les performances d'apprentissage et de mémorisation spatiale grâce au test du *Morris water maze*. Les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> autant que *Syngap1*<sup>+/+</sup> réduisent significativement le temps destiné à l'accès à la plateforme ne soulignant aucun déficit d'apprentissage spatial (Figure Annexe 1), récapitulant les observations d'autres groupes<sup>136,151</sup>.



**Figure 7: L'haploinsuffisance de *Syngap1* ne résulte en aucun déficit dans l'apprentissage et la mémoire spatiale.**

Les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et leurs congénères contrôles ont été soumises au test du Morris water maze. Quelque soit le génotype, les souris réduisent la distance de nage nécessaire à la découverte de la plateforme au fil de l'entraînement (graphique de gauche). Les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> comme *Syngap1*<sup>+/+</sup> diminuent le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible au fur et à mesure des probe test (graphique de droite). n = 10 pour chaque génotype.

La réalisation de *probe test* 2h, 7 et 14 jours après le dernier entraînement révèle que quelque soit le génotype les souris démontrent une réduction du temps consacré à la recherche

de la plateforme dans le quadrant cible indiquant que les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> possèdent un niveau d'effacement de la trace mnésique équivalent à celui de leurs congénères contrôles (confère figure 7). Ceci est en accord avec les données précédemment publiées pour un *probe test* réalisé 24 heures après l'entraînement<sup>136</sup>. Il semble approprié d'inspecter le comportement des souris *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> dans ce même test d'apprentissage et de mémorisation. Il est par ailleurs pertinent d'évaluer dans des tests requérant des performances cognitives plus complexes telles que la capacité de flexibilité mnésique souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup>. Ces tests élucident la capacité d'un individu à comprendre le nouvel objectif en oblitérant les possibles interférences propres à l'ancienne trace mnésique. Par le test du *reversal learning* effectué au moyen du *Morris water maze*, une étude a démontré des anomalies dans la flexibilité de la cognition chez la souris dont l'haploinsuffisance pour SYNGAP1 est induite à l'âge adulte (souris *Syngap1*<sup>fllox/fllox</sup> injectées avec rAAV-EGFP-Cre). Il serait également informatif d'évaluer les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>, *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> via cet exercice.

Afin d'investiguer la façon dont les altérations du développement cérébral de la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> affectent une des fonctions du système nerveux central adulte, des analyses électroencéphalographiques ont été entreprises. Les traces corticales électroencéphalographiques pariétales et temporales issues de souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> révèlent de fréquentes décharges épileptiformes avec occasionnellement des sursauts myocloniques<sup>137</sup>. De plus nous avons démontré dans le second article adjoint à cette thèse la réduction de l'intensité des oscillations gamma chez nos souris mutantes *Syngap1* conditionnelles (*Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup>) en comparaison de leurs contrôles. Il serait intéressant de répéter ces expériences après l'administration des drogues évoquées plus tard afin de rétablir les déficits dans le patron des oscillations cérébrales chez les mutants *Syngap1*.

## Essais thérapeutiques

L'objectif ultime, ou encore final, est de développer une stratégie pour un rétablissement des déficits cellulaires et cognitifs associés à l'haploinsuffisance de *Syngap1*. A

raison car ce gène représente une excellente cible pour ce type d'approche. Plusieurs arguments conduisent, soutiennent et facilitent le développement d'un traitement pharmacologique raisonné. Notre ambition est de nous diriger vers une cure des phénotypes cellulaires et cognitifs associés à l'haploinsuffisance de *Syngap1*.

- ❖ Même si la prévalence des mutations dans le gène *SYNGAPI* nécessite l'analyse d'autres et de plus grandes cohortes de patients atteints de déficience intellectuelle non syndromique, nos données indiquent que l'atteinte de *SYNGAPI* retrouvée dans 3 à 4% des cas sporadiques, est une cause commune de cette condition. Or la cause la plus fréquente des formes monogéniques de déficience intellectuelle est le syndrome de l'X fragile affectant 2% des garçons, et la prévalence des autres gènes associés à la déficience intellectuelle n'excède pas 1%.
- ❖ En culture organotypique, la validation de l'impact fonctionnel de mutations dans *SYNGAPI* au sein de neurones excitateurs suggèrent que les variants alléliques *de novo* faux-sens (au moins p.W362R et p.P562L), ainsi que le variant tronquant p.R579X résultent en la perte de la fonction de la protéine. Ceci souligne l'idée selon laquelle les mutations dans *SYNGAPI* causent la déficience intellectuelle non syndromique par un mécanisme d'haploinsuffisance.
- ❖ Une augmentation des capacités mnésiques liées à l'apprentissage et à la mémorisation a été constatée dans de nombreux modèles murins<sup>411</sup>. Des études électrophysiologiques révèlent une augmentation de la magnitude de la LTP pour la grande majorité de ces mutants<sup>412,413</sup>. Il est ainsi concevable que des manipulations génétiques ou pharmacologiques des voies intracellulaires impliquées dans la plasticité synaptique puissent réguler l'apprentissage ou les processus de mémorisation. En effet, diverses stratégies pharmacologiques ciblant des protéines de la plasticité synaptique ont permis l'amélioration de la cognition chez des souris modèles pour la neurofibromatose 1, les syndromes de Down, de Rubinstein-Taybi, de l'X fragile ou encore pour la sclérose tubéreuse<sup>101</sup>.

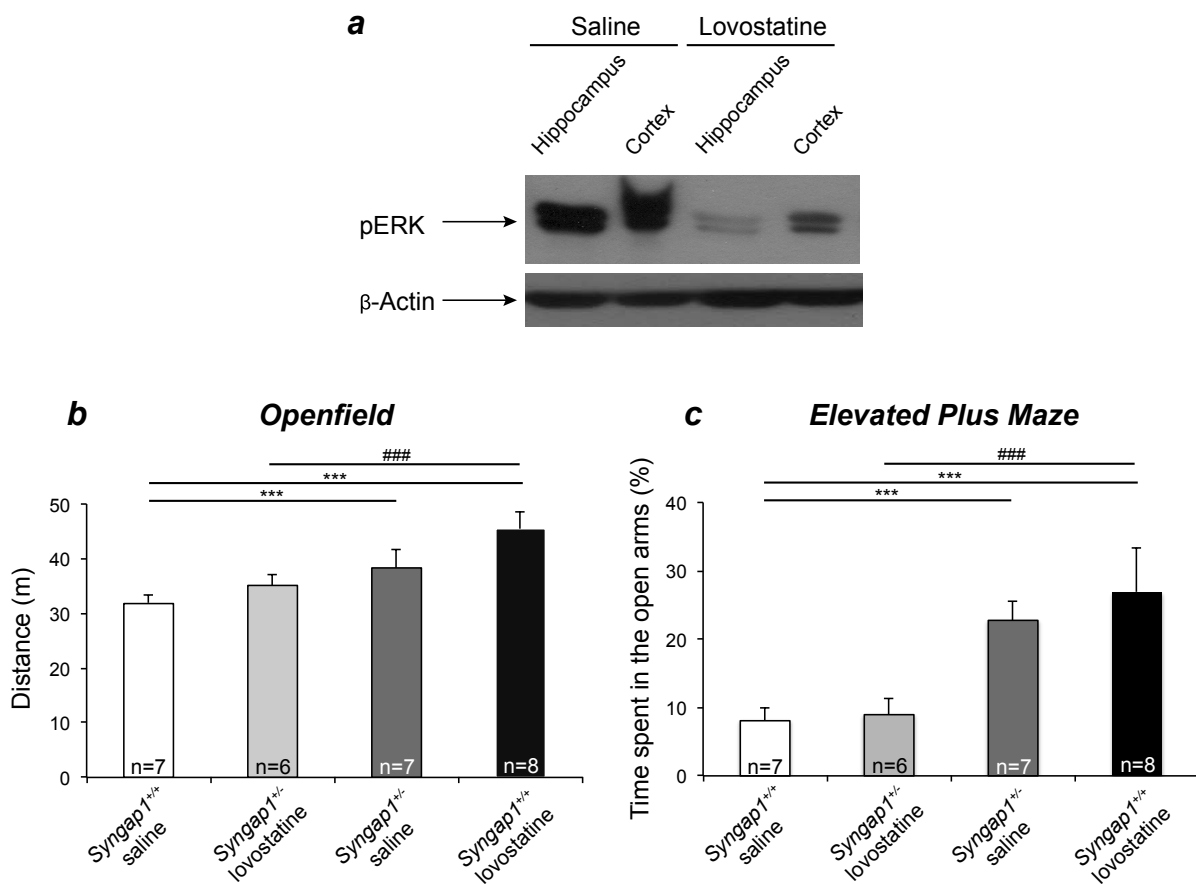


- ❖ L'haploinsuffisance de *Syngap1* chez l'humain ou chez la souris n'est pas associée à d'importants défauts dans la structure cérébrale<sup>134</sup> pouvant éventuellement entraver l'impact de molécules pharmacologiques.
- ❖ Il existe une bonne corrélation entre les niveaux d'expression de *Syngap1* et la sévérité du phénotype murin<sup>134</sup>, laissant penser qu'une légère augmentation de la production de SYNGAP1 puisse être suffisant pour un rétablissement, au moins partiel, de la cognition.
- ❖ Outre l'atteinte des neurones glutamatergiques, nos travaux suggèrent que les déficits dans le développement et dans la fonction des cellules GABAergiques dérivés de l'éminence ganglionnaire médiale peuvent contribuer aux phénotypes cognitifs causés par l'haploinsuffisance de *SYNGAP1*. La connaissance détaillée et la dissection de la fonction de SYNGAP1 au sein des différentes populations neuronales nous guidera vers des cures pharmacologiques plus ciblées et donc plus efficaces.
- ❖ A l'instar de l'haploinsuffisance de *SYNGAP1*, plusieurs conditions syndromiques, partageant des similarités phénotypiques telles que des déficits cognitifs, sont associées à l'accroissement d'activité de la voie intracellulaire Ras-ERK. Ces conditions incluent les syndromes de Noonan, Costello, LEOPARD, cardio-facial-cutanée ou encore de la neurofibromatose de type 1. De plus la signalisation empruntant la voie Ras-PI3K-PKB est altérée chez une souris modélisant le syndrome de l'X fragile<sup>414</sup>. Ces observations soulignent l'importance primordiale de la voie intracellulaire Ras-ERK dans la cognition. Ainsi les stratégies efficaces au rétablissement des déficits constatés chez la souris mutante pour *Syngap1* peuvent être appliquées pour le traitement d'autres conditions neurodéveloppementales associées à une signalisation aberrante dans la plasticité synaptique et dans la voie intracellulaire de Ras.

Ces arguments suggèrent qu'une approche thérapeutique des déficits cognitifs et synaptiques dus à l'haploinsuffisance de *Syngap1* est concevable.

L'activation soutenue de Ras apparaît comme l'élément central des anomalies cellulaires et cognitives identifiées chez la souris mutantes constitutives *Syngap1*<sup>+/-</sup>. L'inhibition de la voie intracellulaire de Ras peut ainsi concourir à rétablir leur phénotype.

Des stratégies similaires ont été développées pour d'autres protéines GAP associées à la déficience intellectuelle non syndromique<sup>101,221,224,415</sup>. De récentes études ont démontré que la lovostatine inhibe l'activité d'au moins deux isoformes de Ras (H-Ras et N-Ras) en réprimant leurs farnétylation post transcriptionnelle<sup>416,417</sup>. Il faut noter que la lovostatine est initialement connue comme étant un inhibiteur de la réductase du HMG-CoA prescrit chez l'enfant comme chez l'adulte en cas d'hyperlipidémie. Nous avons administré de la lovostatine au souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> selon un protocole permettant la restauration des phénotypes dans un modèle murin de déficience intellectuelle<sup>224,221</sup>. Tel que prévu, l'injection de lovostatine aux souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> (PND 22) résulte en la diminution de la production de phospho-ERK dans l'hippocampe ainsi que dans le cortex (confère figure 8).



**Figure 8: La lovostatine ne rétablit pas l'hyperactivité ni les niveaux relatifs à l'anxiété chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>.**

(a) *western blot* montrant une réduction de la phosphorylation de ERK dans l'hippocampe et dans le cortex de souris *Syngap1*<sup>+/+</sup> (WT) après l'administration de lovostatine. Dans l'openfield (b), les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> démontrent une hyperactivité indépendamment de la lovostatine (One-way ANOVA \*\*\*p<0.001 *versus* WT saline; ###p<0.001 *versus* WT lovostatin). Dans l'elevated plus maze (c), les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> passent plus de temps dans le bras ouvert du dispositif, de façon indépendante de la lovostatine (One-way ANOVA \*\*\*p<0.001 *versus* WT saline; ###p<0.001 *versus* WT lovostatin).

Malgré cela, nos résultats préliminaires ne semblent démontrer aucun effet de ce traitement sur l'hyperactivité (test de l'openfield) ou sur les niveaux d'anxiété (test de l'elevated plus maze) (Figure 8). Il faut noter que la lovostatine a été administrée à l'âge adulte et sur une courte période. Hors SYNGAP1 détient une importance cruciale dans le développement synaptique néonatal, laissant entrevoir et soutenant l'idée qu'une tentative plus précoce de restauration des déficits puisse être fructueuse.

Une deuxième stratégie de rétablissement des déficits cellulaires et cognitifs causés par l'haploinsuffisance de *Syngap1* cible l'activité des récepteurs AMPA. SYNGAP1 inhibe l'insertion des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique des neurones excitateurs. En effet, la surexpression de *Syngap1* dans des neurones hippocampiques de rat résulte en la diminution des courants excitateurs postsynaptiques excitateurs médiés par les récepteurs AMPA (AMPA) ainsi qu'à une réduction significative du trafic des récepteurs AMPA. Réciproquement, la transmission synaptique est accrue dans des neurones hippocampiques issus de souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et dans des cultures neuronales traitées avec un petit ARN interférant (siRNA) contre *Syngap1*<sup>171</sup>. L'augmentation du trafic des récepteurs AMPA peut être à l'origine au moins d'une fraction des manifestations phénotypiques associées à l'haploinsuffisance de SYNGAP1. Il est possible que l'excès des récepteurs synaptiques AMPA puisse altérer l'expression de la LTP en restreignant la magnitude de son expression. Chez les êtres humains et les souris hétérozygotes pour SYNGAP1, l'augmentation de la

transmission synaptique peut également contribuer à la susceptibilité face à l'épilepsie. Pour preuve certains patients possédant des mutations dans le gène *SYNGAP1* répondent efficacement aux traitements tels que le valproate ou le topiramate, molécules réprimant l'insertion synaptique et l'activité des récepteurs AMPA<sup>418,419</sup>. Nous proposons alors de traiter les souris jeunes adultes *Syngap1*<sup>+/-</sup> avec une drogue inhibant l'activité des récepteurs AMPA et de déterminer si celle ci peut rétablir les déficits cellulaires et cognitifs de ces souris. Nous utiliserions un antagoniste allostérique des récepteurs AMPA le perampanel ayant démontré son efficacité en tant qu'anti-épileptique<sup>420,421</sup>. Dans le but de ne pas perturber mais de maintenir un traitement de l'information cérébrale adéquat, l'utilisation d'un antagoniste allostérique est cruciale afin de réduire et non supprimer la transmission excitatrice. Nous supposons observer une diminution des mEPSCS dépendant des récepteurs AMPA à la suite de l'administration de perampanel. Pourtant, il est envisageable que la restauration des niveaux normaux de l'activité des récepteurs AMPA ne soit pas suffisante à l'amélioration des déficits cellulaires et cognitifs, possiblement car l'activation soutenue de Ras chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> affecte d'autres processus tels que la morphogenèse synaptique.

Une troisième éventuelle stratégie de restauration des déficits cellulaires et cognitifs de la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> découle de nos observations suggérant que la diminution de *Syngap1* dans les cellules inhibitrices issues de l'éminence ganglionnaire médiale affectent l'innervation, la neurotransmission et la fonction GABAergique. L'injection d'agoniste du GABA a permis de rétablir des altérations dans le comportement social et de conditionnement à la peur chez la souris *Scn1a*<sup>+/-</sup>, un modèle du syndrome de Dravet<sup>422</sup>. Nous proposons d'injecter les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> et *Tg(Nkx2.1-Cre);Syngap1*<sup>fllox/+</sup> avec une benzodiazépine, le clonazepam, un modulateur allostérique positif des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Les benzodiazépines n'ont pas d'effets sur la cinétique d'ouverture des récepteurs GABA<sub>A</sub> mais agissent seulement lorsque le GABA présynaptique est relâché en haussant la signalisation GABAergique<sup>422</sup>. Par ailleurs, l'utilisation des benzodiazépines peut mener à la sédation, suggérant d'adapter entre autre la dose prescrite à l'âge et à la souche de l'animal testé. D'augmenter la neurotransmission GABAergique au cours des périodes critiques de développement promeut la maturation de la synapse GABAergique<sup>329</sup>. Ainsi il est envisageable qu'un traitement précoce chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup> ou *Tg(Nkx2.1-*

*Cre*);*Syngap1*<sup>fllox/+</sup> puisse avoir la capacité de faciliter le développement des synapses GABAergiques.

Les tentatives de rétablissement des phénotypes cellulaires et cognitifs par un inhibiteur de Ras, un antagoniste non compétitif des récepteurs AMPA, une benzodiazépine peuvent échouer à cause de la réduction de la plasticité synaptique chez les souris âgées. Nous proposons ainsi de tirer profit de stratégies augmentant la plasticité chez la souris adulte. En effet de récentes études indiquent que l'administration d'inhibiteurs de la désacétylase d'histone (HDAC) tels que la trichostatine A, le sodium butyrate ou le vorinostat augmente la plasticité synaptique, les performances mnésiques chez la souris *wild-type* aussi bien que dans des modèles murins de neurodégénérescence et réactive la plasticité visuelle chez le rat<sup>423-425</sup>. De façon intéressante la souris homozygote pour des mutations dans les gènes *Creb* ou *Cbp* est réfractaire aux effets des inhibiteurs de HDAC, suggérant que les modulateurs du remodelage de la chromatine influencent ces processus *via* une activation de CREB et CBP<sup>426</sup>. Comme la voie intracellulaire Ras-ERK peut moduler celle impliquant CREB et CBP, la question est de savoir si les inhibiteurs de HDAC ont la capacité de restaurer les phénotypes observés chez les mutants de *Syngap1*.

Sept des onze patients pourvus de mutations *de novo* ponctuels dans le gène *SYNGAP1* souffrent d'épilepsie généralisée associée à des absences et des crises myocloniques ou tonique-cloniques. Tous les patients épileptiques pour lesquels nous disposons des enregistrements électroencéphalographiques (patients avec les mutations p.Q893Rfs, p.K108Vfs, p.K138X, p.R579X, p.W362R, c.283dupC) démontrent une hyperactivité prédominante dans les régions occipitales. Ces patients répondent adéquatement aux traitements par le valproate (inhibiteur de la GABA transaminase) ou au topiramate (antagoniste des récepteurs AMPA et potentialisateur des récepteurs GABA) à l'exception des patients détenant les mutations c.283dupC et p.P562L. Même si ces observations indiquent que l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* peut résulter en différentes formes d'épilepsies généralisées, l'acide valproïque et le topiramate peuvent être d'éventuels choix pour la thérapie des déficits répertoriés chez la souris mutante pour *Syngap1*.

Afin de circonscrire le probable stress dû à la manipulation des injections répétées pouvant interférer dans les résultats comportementaux, il est possible d'effectuer la pose sous-cutanée d'une minipompe (Alzet®) diffusant constamment le traitement curatif désiré.

Si aucun traitement n'aboutit à quelque amélioration, avec multiples précautions la combinaison de plusieurs drogues est envisageable. Les altérations dues à l'haploinsuffisance de *Syngap1* aux stades précoces du développement embryonnaire affectent et influencent très certainement à long terme la structure des circuits neuronaux, réduisant l'impact d'une thérapie pharmacologique. Ainsi hormis la dose, la forme d'administration ou encore la latence entre l'administration et les expériences, une possible explication d'un échec de tel traitement peut être l'âge de l'individu. En effet, à la vue de la fonction de *Syngap1* dans la maturation des neurones excitateurs aux stades néonataux<sup>159</sup>, il se peut que l'administration de la pharmacopée suggérée, à des étapes plus précoces du développement soit plus adéquate. Si l'un des traitements précoces proposés est un succès, ceci renforcera les preuves de l'existence d'une période critique du développement lors de laquelle il est possible de rétablir les altérations cognitives et comportementales causées par l'haploinsuffisance de *Syngap1*. Néanmoins une étude récente a démontré que le knockout spécifique de SYNGAP1 dans l'hippocampe murin obtenu à l'âge adulte, récapitule certains phénotypes cellulaires et comportementaux observés chez les souris *Syngap1*<sup>+/-</sup><sup>136</sup>. Même partiel, un rétablissement de ces déficits suite à l'administration, par exemple, de clonazepam signifierait et renforcerait l'hypothèse de la contribution des interneurons GABAergiques dans le phénotype cognitif observé chez la souris *Syngap1*<sup>+/-</sup>. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que seuls certains phénotypes soient rétablis.

## Conclusion

La compréhension des mécanismes cellulaires et de la fonction du gène *SYNGAP1* offre l'opportunité de développer des traitements rationnels et appropriés à des patients affectés de déficience intellectuelle non syndromique. Néanmoins une complète cure par des remèdes pharmacologiques de cette condition semble encore inaccessible. De restaurer ne serait ce que partiellement ces troubles peut faire la différence entre un individu nécessitant une institutionnalisation permanente, d'un autre capable de vivre ou travailler en sollicitant un recours minimal à une assistance. Ainsi une thérapie aussi minime soit elle peut engendrer d'importants bouleversements dans le quotidien de patients atteints d'haploinsuffisance pour *SYNGAP1*. De plus, les stratégies dédiées à une telle cure seront adaptées dans le traitement d'autres conditions associées à une aberrante activité de la voie intracellulaire de Ras (syndrome de Noonan, neurofibromatose de type 1, X-fragile...) ou encore dans les désordres neurodéveloppementaux liés à la plasticité synaptique.

## Bibliographie

- 1 Leonard, H. & Wen, X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* **8**, 117-134, doi:10.1002/mrdd.10031 (2002).
- 2 McLaren, J. & Bryson, S. E. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *American journal of mental retardation : AJMR* **92**, 243-254 (1987).
- 3 Drews, C. D., Yeargin-Allsopp, M., Decoufle, P. & Murphy, C. C. Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. *American journal of public health* **85**, 329-334 (1995).
- 4 Roeleveld, N., Zielhuis, G. A. & Gabreels, F. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Developmental medicine and child neurology* **39**, 125-132 (1997).
- 5 Durkin, M. S., Hasan, Z. M. & Hasan, K. Z. Prevalence and correlates of mental retardation among children in Karachi, Pakistan. *American journal of epidemiology* **147**, 281-288 (1998).
- 6 Chakrabarti, S. & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *The American journal of psychiatry* **162**, 1133-1141, doi:10.1176/appi.ajp.162.6.1133 (2005).
- 7 Emerson, E. & Hatton, C. Poverty, socio-economic position, social capital and the health of children and adolescents with intellectual disabilities in Britain: a replication. *Journal of intellectual disability research : JIDR* **51**, 866-874, doi:10.1111/j.1365-2788.2007.00951.x (2007).
- 8 Emerson, E. *et al.* Socioeconomic circumstances and risk of psychiatric disorders among parents of children with early cognitive delay. *American journal on intellectual and developmental disabilities* **115**, 30-42, doi:10.1352/1944-7558-115.1.30 (2010).



- 9 Emerson, E., Einfeld, S. & Stancliffe, R. J. The mental health of young children with intellectual disabilities or borderline intellectual functioning. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology* **45**, 579-587, doi:10.1007/s00127-009-0100-y (2010).
- 10 Verma, R., Mina, S. & Sachdeva, A. Auto cannibalism in mental retardation. *Journal of pediatric neurosciences* **9**, 60-62, doi:10.4103/1817-1745.131491 (2014).
- 11 Pardo, C. A., Vargas, D. L. & Zimmerman, A. W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *International review of psychiatry (Abingdon, England)* **17**, 485-495, doi:10.1080/02646830500381930 (2005).
- 12 Daily, D. K., Ardinger, H. H. & Holmes, G. E. Identification and evaluation of mental retardation. *American family physician* **61**, 1059-1067, 1070 (2000).
- 13 Nie, L. H. *et al.* Blood lead levels and cumulative blood lead index (CBLI) as predictors of late neurodevelopment in lead poisoned children. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* **16**, 517-524, doi:10.3109/1354750x.2011.604133 (2011).
- 14 Caravanos, J. *et al.* Blood lead levels in Mexico and pediatric burden of disease implications. *Annals of global health* **80**, 269-277, doi:10.1016/j.aogh.2014.08.002 (2014).
- 15 May, P. A. & Gossage, J. P. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* **25**, 159-167 (2001).
- 16 Niccols, A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain and cognition* **65**, 135-142, doi:10.1016/j.bandc.2007.02.009 (2007).
- 17 Singh, S. M., Laufer, B. I. & Kapalanga, J. Fetal alcohol and the right to be born healthy. *Frontiers in genetics* **5**, 356, doi:10.3389/fgene.2014.00356 (2014).
- 18 Perez-Lopez, F. R. Iodine and thyroid hormones during pregnancy and postpartum. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* **23**, 414-428, doi:10.1080/09513590701464092 (2007).
- 19 Faber, S., Zinn, G. M., Kern, J. C., 2nd & Kingston, H. M. The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* **14**, 171-180, doi:10.1080/13547500902783747 (2009).

- 20 Huster, D. Wilson disease. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **24**, 531-539, doi:10.1016/j.bpg.2010.07.014 (2010).
- 21 Majnemer, A. & Shevell, M. I. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. *The Journal of pediatrics* **127**, 193-199 (1995).
- 22 Lejeune, J., Turpin, R. & Gautier, M. [Chromosomal diagnosis of mongolism]. *Archives francaises de pediatrie* **16**, 962-963 (1959).
- 23 Lejeune, J., Turpin, R. & Gautier, M. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* **143**, 256-265 (1959).
- 24 Sebat, J. *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**, 525-528, doi:10.1126/science.1098918 (2004).
- 25 Redon, R. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**, 444-454, doi:10.1038/nature05329 (2006).
- 26 Locke, D. P. *et al.* Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* **79**, 275-290, doi:10.1086/505653 (2006).
- 27 Williams, N. M. *et al.* Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet* **376**, 1401-1408, doi:10.1016/s0140-6736(10)61109-9 (2010).
- 28 Zahir, F. & Friedman, J. M. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clin Genet* **72**, 271-287, doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00847.x (2007).
- 29 Knight, S. J. *et al.* Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* **354**, 1676-1681, doi:10.1016/s0140-6736(99)03070-6 (1999).
- 30 Marshall, C. R. *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **82**, 477-488, doi:10.1016/j.ajhg.2007.12.009 (2008).
- 31 Stefansson, H. *et al.* Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* **455**, 232-236, doi:10.1038/nature07229 (2008).
- 32 Kim, S. J. *et al.* Unique and atypical deletions in Prader-Willi syndrome reveal distinct phenotypes. *European journal of human genetics : EJHG* **20**, 283-290, doi:10.1038/ejhg.2011.187 (2012).

- 33 Kuroda, Y. *et al.* Deletion of UBE3A in brothers with Angelman syndrome at the breakpoint with an inversion at 15q11.2. *American journal of medical genetics. Part A* **164a**, 2873-2878, doi:10.1002/ajmg.a.36704 (2014).
- 34 Lai, A. H. *et al.* A submicroscopic deletion involving part of the CREBBP gene detected by array-CGH in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome. *Gene* **499**, 182-185, doi:10.1016/j.gene.2012.02.043 (2012).
- 35 Kitsiou-Tzeli, S. *et al.* Detection of 22q11.2 deletion among 139 patients with Di George/Velocardiofacial syndrome features. *In vivo (Athens, Greece)* **18**, 603-608 (2004).
- 36 Honda, S. *et al.* Novel deletion at Xq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation. *J Hum Genet* **55**, 244-247, doi:10.1038/jhg.2010.14 (2010).
- 37 de Leeuw, N. *et al.* UBE2A deficiency syndrome: Mild to severe intellectual disability accompanied by seizures, absent speech, urogenital, and skin anomalies in male patients. *American journal of medical genetics. Part A* **152a**, 3084-3090, doi:10.1002/ajmg.a.33743 (2010).
- 38 Helbig, I. *et al.* 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* **41**, 160-162, doi:10.1038/ng.292 (2009).
- 39 Pagnamenta, A. T. *et al.* A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *European journal of human genetics : EJHG* **17**, 687-692, doi:10.1038/ejhg.2008.228 (2009).
- 40 Rauch, A. *et al.* Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American journal of medical genetics. Part A* **140**, 2063-2074, doi:10.1002/ajmg.a.31416 (2006).
- 41 Veltman, J. A. & Brunner, H. G. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **13**, 565-575, doi:10.1038/nrg3241 (2012).
- 42 de Ligt, J. *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* **367**, 1921-1929, doi:10.1056/NEJMoa1206524 (2012).
- 43 Ropers, H. H. & Hamel, B. C. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* **6**, 46-57, doi:10.1038/nrg1501 (2005).
- 44 Ropers, H. H. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annual review of genomics and human genetics* **11**, 161-187, doi:10.1146/annurev-genom-082509-141640 (2010).

- 45 Fishburn, J., Turner, G., Daniel, A. & Brookwell, R. The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. *American journal of medical genetics* **14**, 713-724, doi:10.1002/ajmg.1320140413 (1983).
- 46 Loesch, D. Z., Huggins, R. M. & Hagerman, R. J. Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* **10**, 31-41, doi:10.1002/mrdd.20006 (2004).
- 47 Orrico, A. *et al.* MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* **481**, 285-288 (2000).
- 48 Villard, L. *et al.* Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular findings. *Neurology* **55**, 1188-1193 (2000).
- 49 Watson, P. *et al.* Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* **38**, 224-228 (2001).
- 50 Kleefstra, T. *et al.* De novo MECP2 frameshift mutation in a boy with moderate mental retardation, obesity and gynaecomastia. *Clin Genet* **61**, 359-362 (2002).
- 51 Meloni, I. *et al.* A mutation in the rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet* **67**, 982-985, doi:10.1086/303078 (2000).
- 52 Chiurazzi, P., Schwartz, C. E., Gecz, J. & Neri, G. XLMR genes: update 2007. *European journal of human genetics : EJHG* **16**, 422-434, doi:10.1038/sj.ejhg.5201994 (2008).
- 53 Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H. & van Oost, B. A. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* **262**, 578-580 (1993).
- 54 Govek, E. E. *et al.* The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* **7**, 364-372, doi:10.1038/nn1210 (2004).
- 55 Garcia, C. C. *et al.* Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet* **41**, 183-186 (2004).
- 56 Allen, K. M. *et al.* PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* **20**, 25-30, doi:10.1038/1675 (1998).

- 57 Laumonnier, F. *et al.* X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* **74**, 552-557, doi:10.1086/382137 (2004).
- 58 Tarpey, P. *et al.* Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **75**, 318-324, doi:10.1086/422703 (2004).
- 59 Ribe, E. M. *et al.* Neuronal caspase 2 activity and function requires RAIDD, but not PIDD. *The Biochemical journal* **444**, 591-599, doi:10.1042/bj20111588 (2012).
- 60 Puffenberger, E. G. *et al.* Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases. *PLoS One* **7**, e28936, doi:10.1371/journal.pone.0028936 (2012).
- 61 Garshasbi, M. *et al.* A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* **82**, 1158-1164, doi:10.1016/j.ajhg.2008.03.018 (2008).
- 62 Schulze, A. Creatine deficiency syndromes. *Handbook of clinical neurology* **113**, 1837-1843, doi:10.1016/b978-0-444-59565-2.00053-8 (2013).
- 63 Graziano, C. *et al.* Syndromic intellectual disability: a new phenotype caused by an aromatic amino acid decarboxylase gene (DDC) variant. *Gene* **559**, 144-148, doi:10.1016/j.gene.2015.01.026 (2015).
- 64 Jameel, M. *et al.* A novel AP4M1 mutation in autosomal recessive cerebral palsy syndrome and clinical expansion of AP-4 deficiency. *BMC medical genetics* **15**, 133, doi:10.1186/s12881-014-0133-2 (2014).
- 65 Orraca-Castillo, M., Estevez-Perez, N. & Reigosa-Crespo, V. Neurocognitive profiles of learning disabled children with neurofibromatosis type 1. *Frontiers in human neuroscience* **8**, 386, doi:10.3389/fnhum.2014.00386 (2014).
- 66 Gipson, T. T. *et al.* Early neurodevelopmental screening in tuberous sclerosis complex: a potential window of opportunity. *Pediatric neurology* **51**, 398-402, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.04.028 (2014).
- 67 Bird, T. D. in *GeneReviews(R)* (eds R. A. Pagon *et al.*) (University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. All rights reserved., 1993).
- 68 Hamdan, F. F. *et al.* Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N Engl J Med* **360**, 599-605, doi:10.1056/NEJMoa0805392 (2009).

- 69 Hamdan, F. F. *et al.* De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Annals of neurology* **65**, 748-753, doi:10.1002/ana.21625 (2009).
- 70 Hamdan, F. F. *et al.* Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *American journal of human genetics* **88**, 306-316, doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.001 (2011).
- 71 Rauch, A. *et al.* Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* **380**, 1674-1682, doi:10.1016/s0140-6736(12)61480-9 (2012).
- 72 Pan, F., Aldridge, G. M., Greenough, W. T. & Gan, W. B. Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17768-17773, doi:10.1073/pnas.1012496107 (2010).
- 73 Qiu, S., Anderson, C. T., Levitt, P. & Shepherd, G. M. Circuit-specific intracortical hyperconnectivity in mice with deletion of the autism-associated Met receptor tyrosine kinase. *J Neurosci* **31**, 5855-5864, doi:10.1523/jneurosci.6569-10.2011 (2011).
- 74 Purpura, D. P. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science* **186**, 1126-1128 (1974).
- 75 Kaufmann, W. E. & Moser, H. W. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **10**, 981-991 (2000).
- 76 Fiala, J. C., Spacek, J. & Harris, K. M. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain research. Brain research reviews* **39**, 29-54 (2002).
- 77 Verkerk, A. J. *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905-914 (1991).
- 78 Zang, J. B. *et al.* A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. *PLoS Genet* **5**, e1000758, doi:10.1371/journal.pgen.1000758 (2009).
- 79 Auerbach, B. D., Osterweil, E. K. & Bear, M. F. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* **480**, 63-68, doi:10.1038/nature10658 (2011).

- 80 Weiler, I. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5395-5400 (1997).
- 81 Bassell, G. J. & Warren, S. T. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**, 201-214, doi:10.1016/j.neuron.2008.10.004 (2008).
- 82 Pfeiffer, B. E. & Huber, K. M. The state of synapses in fragile X syndrome. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **15**, 549-567, doi:10.1177/1073858409333075 (2009).
- 83 Olmos-Serrano, J. L. *et al.* Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* **30**, 9929-9938, doi:10.1523/jneurosci.1714-10.2010 (2010).
- 84 McGill, B. E. *et al.* Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased Crh expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18267-18272, doi:10.1073/pnas.0608702103 (2006).
- 85 Zhubi, A. *et al.* Increased binding of MeCP2 to the GAD1 and RELN promoters may be mediated by an enrichment of 5-hmC in autism spectrum disorder (ASD) cerebellum. *Translational psychiatry* **4**, e349, doi:10.1038/tp.2013.123 (2014).
- 86 Zhong, X., Li, H. & Chang, Q. MeCP2 phosphorylation is required for modulating synaptic scaling through mGluR5. *J Neurosci* **32**, 12841-12847, doi:10.1523/jneurosci.2784-12.2012 (2012).
- 87 Chapleau, C. A., Larimore, J. L., Theibert, A. & Pozzo-Miller, L. Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. *Journal of neurodevelopmental disorders* **1**, 185-196, doi:10.1007/s11689-009-9027-6 (2009).
- 88 Armstrong, D. D. The neuropathology of Rett syndrome--overview 1994. *Neuropediatrics* **26**, 100-104, doi:10.1055/s-2007-979736 (1995).

- 89 Chapleau, C. A. *et al.* Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* **35**, 219-233, doi:10.1016/j.nbd.2009.05.001 (2009).
- 90 Li, W. & Pozzo-Miller, L. Beyond Widespread Deletions to Model Rett Syndrome: Conditional Spatio-Temporal Knockout, Single-Point Mutations and Transgenic Rescue Mice. *Autism-open access* **2012**, 5, doi:10.4172/2165-7890.s1-005 (2012).
- 91 Xu, X., Miller, E. C. & Pozzo-Miller, L. Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome. *Frontiers in neuroanatomy* **8**, 97, doi:10.3389/fnana.2014.00097 (2014).
- 92 Chao, H. T. *et al.* Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* **468**, 263-269, doi:10.1038/nature09582 (2010).
- 93 Osborne, J. P., Fryer, A. & Webb, D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **615**, 125-127 (1991).
- 94 Curatolo, P., Bombardieri, R. & Jozwiak, S. Tuberous sclerosis. *Lancet* **372**, 657-668, doi:10.1016/s0140-6736(08)61279-9 (2008).
- 95 Hunt, A. & Dennis, J. Psychiatric disorder among children with tuberous sclerosis. *Developmental medicine and child neurology* **29**, 190-198 (1987).
- 96 van Sleightenhorst, M. *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* **277**, 805-808 (1997).
- 97 Kandt, R. S. *et al.* Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nat Genet* **2**, 37-41, doi:10.1038/ng0992-37 (1992).
- 98 Garami, A. *et al.* Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular cell* **11**, 1457-1466 (2003).
- 99 Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J. & Sabatini, B. L. Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* **8**, 1727-1734, doi:10.1038/nm1566 (2005).
- 100 Zeng, L. H. *et al.* Abnormal glutamate homeostasis and impaired synaptic plasticity and learning in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis* **28**, 184-196, doi:10.1016/j.nbd.2007.07.015 (2007).
- 101 Ehninger, D. *et al.* Reversal of learning deficits in a Tsc2<sup>+/-</sup> mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med* **14**, 843-848, doi:10.1038/nm1788 (2008).



- 102 Fu, C. *et al.* GABAergic interneuron development and function is modulated by the Tsc1 gene. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **22**, 2111-2119, doi:10.1093/cercor/bhr300 (2012).
- 103 Hamdan, F. F. *et al.* Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet* **88**, 306-316, doi:10.1016/j.ajhg.2011.02.001 (2011).
- 104 Kim, J. H., Liao, D., Lau, L. F. & Huganir, R. L. SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* **20**, 683-691 (1998).
- 105 Chen, H. J., Rojas-Soto, M., Oguni, A. & Kennedy, M. B. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* **20**, 895-904 (1998).
- 106 Porter, K., Komiyama, N. H., Vitalis, T., Kind, P. C. & Grant, S. G. Differential expression of two NMDA receptor interacting proteins, PSD-95 and SynGAP during mouse development. *Eur J Neurosci* **21**, 351-362, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03874.x (2005).
- 107 Pena, V. *et al.* The C2 domain of SynGAP is essential for stimulation of the Rap GTPase reaction. *EMBO Rep* **9**, 350-355, doi:10.1038/embor.2008.20 (2008).
- 108 Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S. & Clapham, D. E. SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* **43**, 563-574, doi:10.1016/j.neuron.2004.08.003 (2004).
- 109 Berryer, M. H. *et al.* Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism, and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency. *Hum Mutat* **34**, 385-394, doi:10.1002/humu.22248 (2013).
- 110 Yoshimura, Y. *et al.* Identification of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications* **290**, 948-954, doi:10.1006/bbrc.2001.6320 (2002).
- 111 Song, B., Meng, F., Yan, X., Guo, J. & Zhang, G. Cerebral ischemia immediately increases serine phosphorylation of the synaptic RAS-GTPase activating protein

- SynGAP by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in hippocampus of rats. *Neurosci Lett* **349**, 183-186 (2003).
- 112 Oh, J. S., Manzerra, P. & Kennedy, M. B. Regulation of the neuron-specific Ras GTPase-activating protein, synGAP, by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **279**, 17980-17988, doi:10.1074/jbc.M314109200 (2004).
- 113 Lipscombe, D. Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 358-363, doi:10.1016/j.conb.2005.04.002 (2005).
- 114 Davuluri, R. V., Suzuki, Y., Sugano, S., Plass, C. & Huang, T. H. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet* **24**, 167-177, doi:10.1016/j.tig.2008.01.008 (2008).
- 115 McMahan, A. C. *et al.* SynGAP isoforms exert opposing effects on synaptic strength. *Nat Commun* **3**, 900, doi:10.1038/ncomms1900 (2012).
- 116 Rumbaugh, G., Adams, J. P., Kim, J. H. & Huganir, R. L. SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4344-4351, doi:10.1073/pnas.0600084103 (2006).
- 117 Vazquez, L. E., Chen, H. J., Sokolova, I., Knuesel, I. & Kennedy, M. B. SynGAP regulates spine formation. *J Neurosci* **24**, 8862-8872, doi:10.1523/jneurosci.3213-04.2004 (2004).
- 118 Li, W. *et al.* Characterization of a novel synGAP isoform, synGAP-beta. *J Biol Chem* **276**, 21417-21424, doi:10.1074/jbc.M010744200 (2001).
- 119 Moon, I. S., Sakagami, H., Nakayama, J. & Suzuki, T. Differential distribution of synGAP alpha1 and synGAP beta isoforms in rat neurons. *Brain Res* **1241**, 62-75, doi:10.1016/j.brainres.2008.09.033 (2008).
- 120 Hamdan, F. F. *et al.* De novo SYNGAP1 mutations in nonsyndromic intellectual disability and autism. *Biol Psychiatry* **69**, 898-901, doi:10.1016/j.biopsych.2010.11.015 (2011).
- 121 Vissers, L. E. *et al.* A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* **42**, 1109-1112, doi:10.1038/ng.712 (2010).
- 122 Carvill, G. L. *et al.* Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature genetics* **45**, 825-830, doi:10.1038/ng.2646 (2013).

- 123 Redin, C. *et al.* Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* **51**, 724-736, doi:10.1136/jmedgenet-2014-102554 (2014).
- 124 O'Roak, B. J. *et al.* Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat Commun* **5**, 5595, doi:10.1038/ncomms6595 (2014).
- 125 De Rubeis, S. *et al.* Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**, 209-215, doi:10.1038/nature13772 (2014).
- 126 Iossifov, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216-221, doi:10.1038/nature13908 (2014).
- 127 Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* **519**, 223-228, doi:10.1038/nature14135 (2015).
- 128 Parker, M. J. *et al.* De novo, heterozygous, loss-of-function mutations in SYNGAP1 cause a syndromic form of intellectual disability. *American journal of medical genetics. Part A* **167**, 2231-2237, doi:10.1002/ajmg.a.37189 (2015).
- 129 Krepischi, A. C. *et al.* A novel de novo microdeletion spanning the SYNGAP1 gene on the short arm of chromosome 6 associated with mental retardation. *American journal of medical genetics. Part A* **152a**, 2376-2378, doi:10.1002/ajmg.a.33554 (2010).
- 130 Pinto, D. *et al.* Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**, 368-372, doi:10.1038/nature09146 (2010).
- 131 Zollino, M. *et al.* Integrated analysis of clinical signs and literature data for the diagnosis and therapy of a previously undescribed 6p21.3 deletion syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* **19**, 239-242, doi:10.1038/ejhg.2010.172 (2011).
- 132 Writzl, K. & Knegt, A. C. 6p21.3 microdeletion involving the SYNGAP1 gene in a patient with intellectual disability, seizures, and severe speech impairment. *American journal of medical genetics. Part A* **161a**, 1682-1685, doi:10.1002/ajmg.a.35930 (2013).
- 133 Klitten, L. L. *et al.* A balanced translocation disrupts SYNGAP1 in a patient with intellectual disability, speech impairment, and epilepsy with myoclonic absences (EMA). *Epilepsia* **52**, e190-193, doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03304.x (2011).

- 134 Knuesel, I., Elliott, A., Chen, H.-J. J., Mansuy, I. M. & Kennedy, M. B. A role for synGAP in regulating neuronal apoptosis. *The European journal of neuroscience* **21**, 611-621, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03908.x (2005).
- 135 Zhang, W., Vazquez, L., Apperson, M. & Kennedy, M. B. Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *J Neurosci* **19**, 96-108 (1999).
- 136 Muhia, M. *et al.* Molecular and behavioral changes associated with adult hippocampus-specific SynGAP1 knockout. *Learn Mem* **19**, 268-281, doi:10.1101/lm.026351.112 (2012).
- 137 Ozkan, E. D. *et al.* Reduced cognition in Syngap1 mutants is caused by isolated damage within developing forebrain excitatory neurons. *Neuron* **82**, 1317-1333, doi:10.1016/j.neuron.2014.05.015 (2014).
- 138 Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 327-335 (2001).
- 139 Kim, M. J., Dunah, A. W., Wang, Y. T. & Sheng, M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* **46**, 745-760, doi:10.1016/j.neuron.2005.04.031 (2005).
- 140 Carlisle, H. J., Manzerra, P., Marcora, E. & Kennedy, M. B. SynGAP regulates steady-state and activity-dependent phosphorylation of cofilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 13673-13683, doi:10.1523/jneurosci.4695-08.2008 (2008).
- 141 Araki, Y., Zeng, M., Zhang, M. & Huganir, R. L. Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP. *Neuron* **85**, 173-189, doi:10.1016/j.neuron.2014.12.023 (2015).
- 142 Wang, C. C., Held, R. G. & Hall, B. J. SynGAP regulates protein synthesis and homeostatic synaptic plasticity in developing cortical networks. *PLoS One* **8**, e83941, doi:10.1371/journal.pone.0083941 (2013).
- 143 Aceti, M. *et al.* Syngap1 haploinsufficiency damages a postnatal critical period of pyramidal cell structural maturation linked to cortical circuit assembly. *Biol Psychiatry* **77**, 805-815, doi:10.1016/j.biopsych.2014.08.001 (2015).

- 144 Tolias, K. F. *et al.* The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* **45**, 525-538, doi:10.1016/j.neuron.2005.01.024 (2005).
- 145 Lambert, J. M. *et al.* Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* **4**, 621-625, doi:10.1038/ncb833 (2002).
- 146 Penzes, P. *et al.* The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron* **29**, 229-242 (2001).
- 147 Xie, Z. *et al.* Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* **56**, 640-656, doi:10.1016/j.neuron.2007.10.005 (2007).
- 148 Symons, M. & Settleman, J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* **10**, 415-419 (2000).
- 149 Carlisle, H. J. & Kennedy, M. B. Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **28**, 182-187, doi:10.1016/j.tins.2005.01.008 (2005).
- 150 Yang, Y., Tao-Cheng, J. H., Reese, T. S. & Dosemeci, A. SynGAP moves out of the core of the postsynaptic density upon depolarization. *Neuroscience* **192**, 132-139, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.061 (2011).
- 151 Komiyama, N. H. *et al.* SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 9721-9732 (2002).
- 152 Kim, J. H., Lee, H.-K. K., Takamiya, K. & Huganir, R. L. The role of synaptic GTPase-activating protein in neuronal development and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 1119-1124 (2003).
- 153 Bergstrom, D. E. *et al.* Overlapping deletions spanning the proximal two-thirds of the mouse t complex. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **14**, 817-829, doi:10.1007/s00335-003-2298-4 (2003).
- 154 Howell, G. R., Bergstrom, R. A., Munroe, R. J., Masse, J. & Schimenti, J. C. Identification of a cryptic lethal mutation in the mouse t(w73) haplotype. *Genetical research* **84**, 153-159 (2004).

- 155 Flachs, P. *et al.* Interallelic and intergenic incompatibilities of the Prdm9 (Hst1) gene in mouse hybrid sterility. *PLoS Genet* **8**, e1003044, doi:10.1371/journal.pgen.1003044 (2012).
- 156 Lakso, M. *et al.* Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6232-6236 (1992).
- 157 Lobe, C. G. & Nagy, A. Conditional genome alteration in mice. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**, 200-208, doi:10.1002/(sici)1521-1878(199803)20:3<200::aid-bies3>3.0.co;2-v (1998).
- 158 Nagy, A. & Rossant, J. Chimaeras and mosaics for dissecting complex mutant phenotypes. *Int J Dev Biol* **45**, 577-582 (2001).
- 159 Clement, J. P. *et al.* Pathogenic SYNGAP1 mutations impair cognitive development by disrupting maturation of dendritic spine synapses. *Cell* **151**, 709-723, doi:10.1016/j.cell.2012.08.045 (2012).
- 160 Song, I. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **25**, 578-588 (2002).
- 161 Malinow, R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**, 707-714, doi:10.1098/rstb.2002.1233 (2003).
- 162 Barnett, M. W. *et al.* Synaptic Ras GTPase activating protein regulates pattern formation in the trigeminal system of mice. *J Neurosci* **26**, 1355-1365, doi:10.1523/jneurosci.3164-05.2006 (2006).
- 163 Crair, M. C. & Malenka, R. C. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* **375**, 325-328, doi:10.1038/375325a0 (1995).
- 164 Blakemore, C. & Hillman, P. An attempt to assess the effects of monocular deprivation and strabismus on synaptic efficiency in the kitten's visual cortex. *Experimental brain research* **30**, 187-202 (1977).
- 165 Durand, G. M., Kovalchuk, Y. & Konnerth, A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* **381**, 71-75, doi:10.1038/381071a0 (1996).
- 166 Isaac, J. T., Crair, M. C., Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* **18**, 269-280 (1997).

- 167 Rumpel, S., Hatt, H. & Gottmann, K. Silent synapses in the developing rat visual cortex: evidence for postsynaptic expression of synaptic plasticity. *J Neurosci* **18**, 8863-8874 (1998).
- 168 Petralia, R. S. *et al.* Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci* **2**, 31-36, doi:10.1038/4532 (1999).
- 169 Ashby, M. C. & Isaac, J. T. Maturation of a recurrent excitatory neocortical circuit by experience-dependent unsilencing of newly formed dendritic spines. *Neuron* **70**, 510-521, doi:10.1016/j.neuron.2011.02.057 (2011).
- 170 Clement, J. P., Ozkan, E. D., Aceti, M., Miller, C. A. & Rumbaugh, G. SYNGAP1 links the maturation rate of excitatory synapses to the duration of critical-period synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 10447-10452, doi:10.1523/jneurosci.0765-13.2013 (2013).
- 171 Rumbaugh, G., Adams, J. P., Kim, J. H. & Huganir, R. L. SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4344-4351, doi:10.1073/pnas.0600084103 (2006).
- 172 Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J. & Kasai, H. Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J Neurosci* **28**, 13592-13608, doi:10.1523/jneurosci.0603-08.2008 (2008).
- 173 Holtmaat, A. J. *et al.* Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* **45**, 279-291, doi:10.1016/j.neuron.2005.01.003 (2005).
- 174 Jaffer, S., Vorobyov, V., Kind, P. C. & Sengpiel, F. Experience-dependent regulation of functional maps and synaptic protein expression in the cat visual cortex. *Eur J Neurosci* **35**, 1281-1294, doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08044.x (2012).
- 175 Blake, D. T., Byl, N. N. & Merzenich, M. M. Representation of the hand in the cerebral cortex. *Behav Brain Res* **135**, 179-184 (2002).
- 176 Lubke, J. & Feldmeyer, D. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* **212**, 3-17, doi:10.1007/s00429-007-0144-2 (2007).

- 177 Vazquez, L. E., Chen, H.-J. J., Sokolova, I., Knuesel, I. & Kennedy, M. B. SynGAP regulates spine formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 8862-8872, doi:10.1523/JNEUROSCI.3213-04.2004 (2004).
- 178 Muhia, M., Feldon, J., Knuesel, I. & Yee, B. K. Appetitively motivated instrumental learning in SynGAP heterozygous knockout mice. *Behavioral neuroscience* **123**, 1114-1128, doi:10.1037/a0017118 (2009).
- 179 Muhia, M., Yee, B. K., Feldon, J., Markopoulos, F. & Knuesel, I. Disruption of hippocampus-regulated behavioural and cognitive processes by heterozygous constitutive deletion of SynGAP. *The European journal of neuroscience* **31**, 529-543, doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07079.x (2010).
- 180 Brambilla, R. *et al.* A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature* **390**, 281-286, doi:10.1038/36849 (1997).
- 181 Kornhauser, J. M. & Greenberg, M. E. A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* **18**, 839-842 (1997).
- 182 Impey, S., Obrietan, K. & Storm, D. R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* **23**, 11-14 (1999).
- 183 Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39, doi:10.1038/361031a0 (1993).
- 184 Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **377**, 115-118, doi:10.1038/377115a0 (1995).
- 185 Thomas, G. M. & Huganir, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**, 173-183, doi:10.1038/nrn1346 (2004).
- 186 Kessels, H. W. & Malinow, R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**, 340-350, doi:10.1016/j.neuron.2009.01.015 (2009).
- 187 Patterson, M. A., Szatmari, E. M. & Yasuda, R. AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15951-15956, doi:10.1073/pnas.0913875107 (2010).
- 188 Anggono, V. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **22**, 461-469, doi:10.1016/j.conb.2011.12.006 (2012).



- 189 Yang, Y., Tao-Cheng, J. H., Bayer, K. U., Reese, T. S. & Dosemeci, A. Camkii-mediated phosphorylation regulates distributions of Syngap-alpha1 and -alpha2 at the postsynaptic density. *PLoS One* **8**, e71795, doi:10.1371/journal.pone.0071795 (2013).
- 190 Hensch, T. K. Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci* **27**, 549-579, doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327 (2004).
- 191 Nakazawa, K. *et al.* Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* **297**, 211-218, doi:10.1126/science.1071795 (2002).
- 192 Niewoehner, B. *et al.* Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **25**, 837-846, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05312.x (2007).
- 193 McHugh, S. B., Niewoehner, B., Rawlins, J. N. & Bannerman, D. M. Dorsal hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors underlie spatial working memory performance during non-matching to place testing on the T-maze. *Behav Brain Res* **186**, 41-47, doi:10.1016/j.bbr.2007.07.021 (2008).
- 194 Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. & Koller, B. H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* **98**, 427-436 (1999).
- 195 Dvorkin, A., Benjamini, Y. & Golani, I. Mouse cognition-related behavior in the open-field: emergence of places of attraction. *PLoS computational biology* **4**, e1000027, doi:10.1371/journal.pcbi.1000027 (2008).
- 196 Daenen, E. W., Wolterink, G., Gerrits, M. A. & Van Ree, J. M. Amygdala or ventral hippocampal lesions at two early stages of life differentially affect open field behaviour later in life; an animal model of neurodevelopmental psychopathological disorders. *Behav Brain Res* **131**, 67-78 (2002).
- 197 Guo, X. *et al.* Reduced expression of the NMDA receptor-interacting protein SynGAP causes behavioral abnormalities that model symptoms of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**, 1659-1672, doi:10.1038/npp.2008.223 (2009).
- 198 Sahay, A. *et al.* Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**, 466-470, doi:10.1038/nature09817 (2011).

- 199 Floresco, S. B., Seamans, J. K. & Phillips, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* **17**, 1880-1890 (1997).
- 200 Deacon, R. M. & Rawlins, J. N. T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols* **1**, 7-12, doi:10.1038/nprot.2006.2 (2005).
- 201 Lalonde, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 91-104 (2002).
- 202 Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **24**, 21-44, doi:10.1080/02699050500284218 (2006).
- 203 Tartaglia, M. *et al.* Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* **29**, 465-468, doi:10.1038/ng772 (2001).
- 204 Schubbert, S. *et al.* Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* **38**, 331-336, doi:10.1038/ng1748 (2006).
- 205 Roberts, A. E. *et al.* Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* **39**, 70-74, doi:10.1038/ng1926 (2007).
- 206 Tartaglia, M. *et al.* Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* **39**, 75-79, doi:10.1038/ng1939 (2007).
- 207 Pandit, B. *et al.* Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **39**, 1007-1012, doi:10.1038/ng2073 (2007).
- 208 Razzaque, M. A. *et al.* Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* **39**, 1013-1017, doi:10.1038/ng2078 (2007).
- 209 Lee, Y. S. *et al.* Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nat Neurosci* **17**, 1736-1743, doi:10.1038/nn.3863 (2014).
- 210 Gibbs, J. B., Sigal, I. S., Poe, M. & Scolnick, E. M. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5704-5708 (1984).
- 211 Rauen, K. A. HRAS and the Costello syndrome. *Clin Genet* **71**, 101-108, doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00743.x (2007).

- 212 Legius, E. *et al.* PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J Med Genet* **39**, 571-574 (2002).
- 213 Kontaridis, M. I., Swanson, K. D., David, F. S., Barford, D. & Neel, B. G. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem* **281**, 6785-6792, doi:10.1074/jbc.M513068200 (2006).
- 214 Oishi, K. *et al.* Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during Drosophila development. *Hum Mol Genet* **18**, 193-201, doi:10.1093/hmg/ddn336 (2009).
- 215 Wakioka, T. *et al.* Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* **412**, 647-651, doi:10.1038/35088082 (2001).
- 216 Niihori, T. *et al.* Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* **38**, 294-296, doi:10.1038/ng1749 (2006).
- 217 Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* **311**, 1287-1290, doi:10.1126/science.1124642 (2006).
- 218 Hart, T. C. *et al.* A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* **70**, 943-954, doi:10.1086/339689 (2002).
- 219 Oliveira, J. B. *et al.* NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8953-8958, doi:10.1073/pnas.0702975104 (2007).
- 220 Eerola, I. *et al.* Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *Am J Hum Genet* **73**, 1240-1249, doi:10.1086/379793 (2003).
- 221 Costa, R. M. *et al.* Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature* **415**, 526-530, doi:10.1038/nature711 (2002).
- 222 Cui, Y. *et al.* Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell* **135**, 549-560, doi:10.1016/j.cell.2008.09.060 (2008).
- 223 Shilyansky, C. *et al.* Neurofibromin regulates corticostriatal inhibitory networks during working memory performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13141-13146, doi:10.1073/pnas.1004829107 (2010).

- 224 Li, W. *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Current biology : CB* **15**, 1961-1967, doi:10.1016/j.cub.2005.09.043 (2005).
- 225 Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**, 715-727, doi:10.1038/nrn919 (2002).
- 226 Whittington, M. A. & Traub, R. D. Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* **26**, 676-682, doi:10.1016/j.tins.2003.09.016 (2003).
- 227 Chattopadhyaya, B. *et al.* Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* **24**, 9598-9611, doi:10.1523/jneurosci.1851-04.2004 (2004).
- 228 Wang, X. J., Tegner, J., Constantinidis, C. & Goldman-Rakic, P. S. Division of labor among distinct subtypes of inhibitory neurons in a cortical microcircuit of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1368-1373, doi:10.1073/pnas.0305337101 (2004).
- 229 Hensch, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**, 877-888, doi:10.1038/nrn1787 (2005).
- 230 Chattopadhyaya, B. *et al.* GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* **54**, 889-903, doi:10.1016/j.neuron.2007.05.015 (2007).
- 231 Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793-807, doi:10.1038/nrn1519 (2004).
- 232 Nery, S., Fishell, G. & Corbin, J. G. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* **5**, 1279-1287, doi:10.1038/nn971 (2002).
- 233 Corbin, J. G., Rutlin, M., Gaiano, N. & Fishell, G. Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* **130**, 4895-4906, doi:10.1242/dev.00717 (2003).
- 234 Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J. L. & Anderson, S. A. Origins of cortical interneuron subtypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the*

- Society for Neuroscience* **24**, 2612-2622, doi:10.1523/JNEUROSCI.5667-03.2004 (2004).
- 235 Yozu, M., Tabata, H. & Nakajima, K. The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J Neurosci* **25**, 7268-7277, doi:10.1523/jneurosci.2072-05.2005 (2005).
- 236 Butt, S. J. *et al.* The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* **48**, 591-604, doi:10.1016/j.neuron.2005.09.034 (2005).
- 237 Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zagha, E., Fishell, G. & Rudy, B. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* **30**, 16796-16808, doi:10.1523/jneurosci.1869-10.2010 (2010).
- 238 Pleasure, S. J. *et al.* Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* **28**, 727-740 (2000).
- 239 Batista-Brito, R. *et al.* The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron development. *Neuron* **63**, 466-481, doi:10.1016/j.neuron.2009.08.005 (2009).
- 240 Butt, S. J. *et al.* The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* **59**, 722-732, doi:10.1016/j.neuron.2008.07.031 (2008).
- 241 Liodis, P. *et al.* Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* **27**, 3078-3089, doi:10.1523/jneurosci.3055-06.2007 (2007).
- 242 Wang, Y. *et al.* Dlx5 and Dlx6 regulate the development of parvalbumin-expressing cortical interneurons. *J Neurosci* **30**, 5334-5345, doi:10.1523/jneurosci.5963-09.2010 (2010).
- 243 Xu, X., Roby, K. D. & Callaway, E. M. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J Comp Neurol* **499**, 144-160, doi:10.1002/cne.21101 (2006).
- 244 Miyoshi, G. *et al.* Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* **30**, 1582-1594, doi:10.1523/jneurosci.4515-09.2010 (2010).

- 245 Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G. & Alvarez-Buylla, A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* **128**, 3759-3771 (2001).
- 246 Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. & Rubenstein, J. L. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* **128**, 353-363 (2001).
- 247 Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. & Rubenstein, J. L. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370 (1999).
- 248 Jimenez, D., Lopez-Mascaraque, L. M., Valverde, F. & De Carlos, J. A. Tangential migration in neocortical development. *Dev Biol* **244**, 155-169, doi:10.1006/dbio.2002.0586 (2002).
- 249 Flames, N. *et al.* Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* **27**, 9682-9695, doi:10.1523/jneurosci.2750-07.2007 (2007).
- 250 Gelman, D. M. *et al.* The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* **29**, 9380-9389, doi:10.1523/jneurosci.0604-09.2009 (2009).
- 251 Marin, O. & Rubenstein, J. L. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* **2**, 780-790, doi:10.1038/35097509 (2001).
- 252 Wonders, C. P. & Anderson, S. A. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* **7**, 687-696, doi:10.1038/nrn1954 (2006).
- 253 Tanaka, D. H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development* **133**, 2167-2176, doi:10.1242/dev.02382 (2006).
- 254 Tanaka, D. H. *et al.* Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J Neurosci* **29**, 1300-1311, doi:10.1523/jneurosci.5446-08.2009 (2009).

- 255 Marin, O. & Rubenstein, J. L. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* **26**, 441-483, doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058 (2003).
- 256 Bortone, D. & Polleux, F. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* **62**, 53-71, doi:10.1016/j.neuron.2009.01.034 (2009).
- 257 Pla, R., Borrell, V., Flames, N. & Marin, O. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci* **26**, 6924-6934, doi:10.1523/jneurosci.0245-06.2006 (2006).
- 258 Lodato, S. *et al.* Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* **69**, 763-779, doi:10.1016/j.neuron.2011.01.015 (2011).
- 259 De Marco Garcia, N. V., Karayannis, T. & Fishell, G. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* **472**, 351-355, doi:10.1038/nature09865 (2011).
- 260 Anderson, S. A., Classey, J. D., Conde, F., Lund, J. S. & Lewis, D. A. Synchronous development of pyramidal neuron dendritic spines and parvalbumin-immunoreactive chandelier neuron axon terminals in layer III of monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* **67**, 7-22 (1995).
- 261 Cobos, I. *et al.* Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* **8**, 1059-1068, doi:10.1038/nn1499 (2005).
- 262 Close, J. *et al.* *Satb1* is an activity-modulated transcription factor required for the terminal differentiation and connectivity of medial ganglionic eminence-derived cortical interneurons. *J Neurosci* **32**, 17690-17705, doi:10.1523/jneurosci.3583-12.2012 (2012).
- 263 Eggan, S. M. *et al.* Cortical glutamic acid decarboxylase 67 deficiency results in lower cannabinoid 1 receptor messenger RNA expression: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* **71**, 114-119, doi:10.1016/j.biopsych.2011.09.014 (2012).
- 264 Huang, Z. J. *et al.* BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* **98**, 739-755 (1999).

- 265 Baho, E. & Di Cristo, G. Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner. *J Neurosci* **32**, 911-918, doi:10.1523/jneurosci.4352-11.2012 (2012).
- 266 Pillai-Nair, N. *et al.* Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *J Neurosci* **25**, 4659-4671, doi:10.1523/jneurosci.0565-05.2005 (2005).
- 267 Chattopadhyaya, B., Baho, E., Huang, Z. J., Schachner, M. & Di Cristo, G. Neural cell adhesion molecule-mediated Fyn activation promotes GABAergic synapse maturation in postnatal mouse cortex. *J Neurosci* **33**, 5957-5968, doi:10.1523/jneurosci.1306-12.2013 (2013).
- 268 Di Cristo, G. *et al.* Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs. *Nat Neurosci* **7**, 1184-1186, doi:10.1038/nn1334 (2004).
- 269 Xu, X., Roby, K. D. & Callaway, E. M. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* **518**, 389-404, doi:10.1002/cne.22229 (2010).
- 270 Uematsu, M. *et al.* Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **18**, 315-330, doi:10.1093/cercor/bhm056 (2008).
- 271 Helmstaedter, M., Sakmann, B. & Feldmeyer, D. Neuronal correlates of local, lateral, and translaminar inhibition with reference to cortical columns. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **19**, 926-937, doi:10.1093/cercor/bhn141 (2009).
- 272 Xu, X. & Callaway, E. M. Laminar specificity of functional input to distinct types of inhibitory cortical neurons. *J Neurosci* **29**, 70-85, doi:10.1523/jneurosci.4104-08.2009 (2009).
- 273 Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **7**, 476-486 (1997).
- 274 Pouille, F. & Scanziani, M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* **293**, 1159-1163, doi:10.1126/science.1060342 (2001).



- 275 Dong, H., Shao, Z., Nerbonne, J. M. & Burkhalter, A. Differential depression of inhibitory synaptic responses in feedforward and feedback circuits between different areas of mouse visual cortex. *J Comp Neurol* **475**, 361-373, doi:10.1002/cne.20164 (2004).
- 276 Gabernet, L., Jadhav, S. P., Feldman, D. E., Carandini, M. & Scanziani, M. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron* **48**, 315-327, doi:10.1016/j.neuron.2005.09.022 (2005).
- 277 Yoshimura, Y., Dantzker, J. L. & Callaway, E. M. Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* **433**, 868-873, doi:10.1038/nature03252 (2005).
- 278 Tamas, G., Buhl, E. H., Lorincz, A. & Somogyi, P. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* **3**, 366-371, doi:10.1038/73936 (2000).
- 279 Galarreta, M. & Hestrin, S. Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12438-12443, doi:10.1073/pnas.192159599 (2002).
- 280 Sohal, V. S. Insights into cortical oscillations arising from optogenetic studies. *Biol Psychiatry* **71**, 1039-1045, doi:10.1016/j.biopsych.2012.01.024 (2012).
- 281 Gonzalez-Burgos, G., Cho, R. Y. & Lewis, D. A. Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **77**, 1031-1040, doi:10.1016/j.biopsych.2015.03.010 (2015).
- 282 Taniguchi, H., Lu, J. & Huang, Z. J. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* **339**, 70-74, doi:10.1126/science.1227622 (2013).
- 283 Woodruff, A., Xu, Q., Anderson, S. A. & Yuste, R. Depolarizing effect of neocortical chandelier neurons. *Frontiers in neural circuits* **3**, 15, doi:10.3389/neuro.04.015.2009 (2009).
- 284 Karube, F., Kubota, Y. & Kawaguchi, Y. Axon branching and synaptic bouton phenotypes in GABAergic nonpyramidal cell subtypes. *J Neurosci* **24**, 2853-2865, doi:10.1523/jneurosci.4814-03.2004 (2004).
- 285 Dumitriu, D., Cossart, R., Huang, J. & Yuste, R. Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **17**, 81-91, doi:10.1093/cercor/bhj126 (2007).

- 286 Wang, Y. *et al.* Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* **561**, 65-90, doi:10.1113/jphysiol.2004.073353 (2004).
- 287 Fanselow, E. E., Richardson, K. A. & Connors, B. W. Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol* **100**, 2640-2652, doi:10.1152/jn.90691.2008 (2008).
- 288 Hull, C., Adesnik, H. & Scanziani, M. Neocortical disynaptic inhibition requires somatodendritic integration in interneurons. *J Neurosci* **29**, 8991-8995, doi:10.1523/jneurosci.5717-08.2009 (2009).
- 289 Silberberg, G. & Markram, H. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* **53**, 735-746, doi:10.1016/j.neuron.2007.02.012 (2007).
- 290 Ma, Y., Hu, H., Berrebi, A. S., Mathers, P. H. & Agmon, A. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci* **26**, 5069-5082, doi:10.1523/jneurosci.0661-06.2006 (2006).
- 291 Freund, T. F. & Katona, I. Perisomatic inhibition. *Neuron* **56**, 33-42, doi:10.1016/j.neuron.2007.09.012 (2007).
- 292 Seillier, A., Martinez, A. A. & Giuffrida, A. Phencyclidine-induced social withdrawal results from deficient stimulation of cannabinoid CB(1) receptors: implications for schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **38**, 1816-1824, doi:10.1038/npp.2013.81 (2013).
- 293 Cea-del Rio, C. A. *et al.* M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *J Neurosci* **30**, 6011-6024, doi:10.1523/jneurosci.5040-09.2010 (2010).
- 294 David, C., Schleicher, A., Zuschratter, W. & Staiger, J. F. The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat. *Eur J Neurosci* **25**, 2329-2340, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05496.x (2007).
- 295 Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J. & Scanziani, M. Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* **16**, 1068-1076, doi:10.1038/nn.3446 (2013).

- 296 Lee, S., Kruglikov, I., Huang, Z. J., Fishell, G. & Rudy, B. A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* **16**, 1662-1670, doi:10.1038/nn.3544 (2013).
- 297 Fu, Y., Kaneko, M., Tang, Y., Alvarez-Buylla, A. & Stryker, M. P. A cortical disinhibitory circuit for enhancing adult plasticity. *eLife* **4**, e05558, doi:10.7554/eLife.05558 (2015).
- 298 Pi, H.-J. J. *et al.* Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* **503**, 521-524, doi:10.1038/nature12676 (2013).
- 299 Kubota, Y. *et al.* Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **21**, 1803-1817, doi:10.1093/cercor/bhq252 (2011).
- 300 Fuentealba, P. *et al.* Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* **57**, 917-929, doi:10.1016/j.neuron.2008.01.034 (2008).
- 301 Higo, S., Akashi, K., Sakimura, K. & Tamamaki, N. Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Frontiers in neuroanatomy* **3**, 25, doi:10.3389/neuro.05.025.2009 (2009).
- 302 Kilduff, T. S., Cauli, B. & Gerashchenko, D. Activation of cortical interneurons during sleep: an anatomical link to homeostatic sleep regulation? *Trends Neurosci* **34**, 10-19, doi:10.1016/j.tins.2010.09.005 (2011).
- 303 Danglot, L., Triller, A. & Marty, S. The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* **16**, 1032-1060, doi:10.1002/hipo.20225 (2006).
- 304 Hennou, S., Khalilov, I., Diabira, D., Ben-Ari, Y. & Gozlan, H. Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* **16**, 197-208 (2002).
- 305 Gozlan, H. & Ben-Ari, Y. Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **13**, 684-692 (2003).
- 306 Tyzio, R. *et al.* The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci* **19**, 10372-10382 (1999).

- 307 Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* **28**, 5547-5558, doi:10.1523/jneurosci.5599-07.2008 (2008).
- 308 Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological reviews* **87**, 1215-1284, doi:10.1152/physrev.00017.2006 (2007).
- 309 Miyoshi, G. & Fishell, G. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **21**, 845-852, doi:10.1093/cercor/bhq155 (2011).
- 310 Kaila, K., Price, T. J., Payne, J. A., Puskarjov, M. & Voipio, J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 637-654, doi:10.1038/nrn3819 (2014).
- 311 Bonifazi, P. *et al.* GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* **326**, 1419-1424, doi:10.1126/science.1175509 (2009).
- 312 Basu, J. *et al.* A cortico-hippocampal learning rule shapes inhibitory microcircuit activity to enhance hippocampal information flow. *Neuron* **79**, 1208-1221, doi:10.1016/j.neuron.2013.07.001 (2013).
- 313 Glickfeld, L. L. & Scanziani, M. Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat Neurosci* **9**, 807-815, doi:10.1038/nn1688 (2006).
- 314 Stokes, C. C. & Isaacson, J. S. From dendrite to soma: dynamic routing of inhibition by complementary interneuron microcircuits in olfactory cortex. *Neuron* **67**, 452-465, doi:10.1016/j.neuron.2010.06.029 (2010).
- 315 Wehr, M. & Zador, A. M. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* **426**, 442-446, doi:10.1038/nature02116 (2003).
- 316 Owen, S. F. *et al.* Oxytocin enhances hippocampal spike transmission by modulating fast-spiking interneurons. *Nature* **500**, 458-462, doi:10.1038/nature12330 (2013).
- 317 Lee, S. H., Kwan, A. C. & Dan, Y. Interneuron subtypes and orientation tuning. *Nature* **508**, E1-2, doi:10.1038/nature13128 (2014).

- 318 Bartho, P. *et al.* Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *J Neurophysiol* **92**, 600-608, doi:10.1152/jn.01170.2003 (2004).
- 319 Maurer, A. P., Cowen, S. L., Burke, S. N., Barnes, C. A. & McNaughton, B. L. Phase precession in hippocampal interneurons showing strong functional coupling to individual pyramidal cells. *J Neurosci* **26**, 13485-13492, doi:10.1523/jneurosci.2882-06.2006 (2006).
- 320 Zaitsev, A. V. & Lewis, D. A. Functional properties and short-term dynamics of unidirectional and reciprocal synaptic connections between layer 2/3 pyramidal cells and fast-spiking interneurons in juvenile rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* **38**, 2988-2998, doi:10.1111/ejn.12294 (2013).
- 321 Adesnik, H., Bruns, W., Taniguchi, H., Huang, Z. J. & Scanziani, M. A neural circuit for spatial summation in visual cortex. *Nature* **490**, 226-231, doi:10.1038/nature11526 (2012).
- 322 Letzkus, J. J. *et al.* A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* **480**, 331-335, doi:10.1038/nature10674 (2011).
- 323 Xu, H., Jeong, H. Y., Tremblay, R. & Rudy, B. Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron* **77**, 155-167, doi:10.1016/j.neuron.2012.11.004 (2013).
- 324 Pi, H. J. *et al.* Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* **503**, 521-524, doi:10.1038/nature12676 (2013).
- 325 Hu, H., Ma, Y. & Agmon, A. Submillisecond firing synchrony between different subtypes of cortical interneurons connected chemically but not electrically. *J Neurosci* **31**, 3351-3361, doi:10.1523/jneurosci.4881-10.2011 (2011).
- 326 Wiesel, T. N. & Hubel, D. H. EFFECTS OF VISUAL DEPRIVATION ON MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF CELLS IN THE CATS LATERAL GENICULATE BODY. *J Neurophysiol* **26**, 978-993 (1963).
- 327 Reiter, H. O. & Stryker, M. P. Neural plasticity without postsynaptic action potentials: less-active inputs become dominant when kitten visual cortical cells are pharmacologically inhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3623-3627 (1988).

- 328 Hensch, T. K. *et al.* Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* **282**, 1504-1508 (1998).
- 329 Fagiolini, M. & Hensch, T. K. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* **404**, 183-186, doi:10.1038/35004582 (2000).
- 330 Pollock, G. S. *et al.* Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. *J Neurosci* **21**, 3923-3931 (2001).
- 331 Pizzorusso, T. *et al.* Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* **298**, 1248-1251, doi:10.1126/science.1072699 (2002).
- 332 Harauzov, A. *et al.* Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci* **30**, 361-371, doi:10.1523/jneurosci.2233-09.2010 (2010).
- 333 Southwell, D. G., Froemke, R. C., Alvarez-Buylla, A., Stryker, M. P. & Gandhi, S. P. Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation. *Science* **327**, 1145-1148, doi:10.1126/science.1183962 (2010).
- 334 Maffei, A., Nelson, S. B. & Turrigiano, G. G. Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat Neurosci* **7**, 1353-1359, doi:10.1038/nn1351 (2004).
- 335 Carvalho, T. P. & Buonomano, D. V. Differential effects of excitatory and inhibitory plasticity on synaptically driven neuronal input-output functions. *Neuron* **61**, 774-785, doi:10.1016/j.neuron.2009.01.013 (2009).
- 336 Miller, K. D. Understanding layer 4 of the cortical circuit: a model based on cat V1. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **13**, 73-82 (2003).
- 337 Wilson, N. R., Runyan, C. A., Wang, F. L. & Sur, M. Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature* **488**, 343-348, doi:10.1038/nature11347 (2012).
- 338 Atallah, B. V., Bruns, W., Carandini, M. & Scanziani, M. Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* **73**, 159-170, doi:10.1016/j.neuron.2011.12.013 (2012).
- 339 Lee, S. H. *et al.* Activation of specific interneurons improves V1 feature selectivity and visual perception. *Nature* **488**, 379-383, doi:10.1038/nature11312 (2012).

- 340 Kuhlman, S. J. *et al.* A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in  
the visual cortex. *Nature* **501**, 543-546, doi:10.1038/nature12485 (2013).
- 341 Donato, F., Rompani, S. B. & Caroni, P. Parvalbumin-expressing basket-cell network  
plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* **504**, 272-276,  
doi:10.1038/nature12866 (2013).
- 342 Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K. D. & Buzsaki, G. Mechanisms of gamma  
oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* **37**, 311-322 (2003).
- 343 Hajos, N. *et al.* Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during  
hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci* **24**, 9127-9137,  
doi:10.1523/jneurosci.2113-04.2004 (2004).
- 344 Whittington, M. A., Traub, R. D. & Jefferys, J. G. Synchronized oscillations in  
interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*  
**373**, 612-615, doi:10.1038/373612a0 (1995).
- 345 Fuchs, E. C. *et al.* Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines  
hippocampal function and associated behavior. *Neuron* **53**, 591-604,  
doi:10.1016/j.neuron.2007.01.031 (2007).
- 346 Cardin, J. A. *et al.* Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls  
sensory responses. *Nature* **459**, 663-667, doi:10.1038/nature08002 (2009).
- 347 Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. Parvalbumin neurons and gamma  
rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* **459**, 698-702,  
doi:10.1038/nature07991 (2009).
- 348 Dumont, J. R. & Taube, J. S. The neural correlates of navigation beyond the  
hippocampus. *Prog Brain Res* **219**, 83-102, doi:10.1016/bs.pbr.2015.03.004 (2015).
- 349 Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B. & Moser, E. I. Microstructure of a  
spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* **436**, 801-806, doi:10.1038/nature03721  
(2005).
- 350 Alme, C. B. *et al.* Place cells in the hippocampus: eleven maps for eleven rooms. *Proc  
Natl Acad Sci U S A* **111**, 18428-18435, doi:10.1073/pnas.1421056111 (2014).
- 351 Lovett-Barron, M. *et al.* Regulation of neuronal input transformations by tunable  
dendritic inhibition. *Nat Neurosci* **15**, 423-430, s421-423, doi:10.1038/nn.3024 (2012).

- 352 Bueterfering, C., Allen, K. & Monyer, H. Parvalbumin interneurons provide grid cell-driven recurrent inhibition in the medial entorhinal cortex. *Nat Neurosci* **17**, 710-718, doi:10.1038/nn.3696 (2014).
- 353 Li, H. *et al.* Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nat Neurosci* **16**, 332-339, doi:10.1038/nn.3322 (2013).
- 354 Courtin, J. *et al.* Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* **505**, 92-96, doi:10.1038/nature12755 (2014).
- 355 Gentet, L. J. *et al.* Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* **15**, 607-612, doi:10.1038/nn.3051 (2012).
- 356 Sachidhanandam, S., Sreenivasan, V., Kyriakatos, A., Kremer, Y. & Petersen, C. C. Membrane potential correlates of sensory perception in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* **16**, 1671-1677, doi:10.1038/nn.3532 (2013).
- 357 Alonso, M. *et al.* Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nat Neurosci* **15**, 897-904, doi:10.1038/nn.3108 (2012).
- 358 Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R. & Volk, D. W. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci* **35**, 57-67, doi:10.1016/j.tins.2011.10.004 (2012).
- 359 Zhang, Z. J. & Reynolds, G. P. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophrenia research* **55**, 1-10 (2002).
- 360 Glausier, J. R. & Lewis, D. A. Selective pyramidal cell reduction of GABA(A) receptor alpha1 subunit messenger RNA expression in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **36**, 2103-2110, doi:10.1038/npp.2011.102 (2011).
- 361 Uhlhaas, P. J. & Singer, W. Neuronal dynamics and neuropsychiatric disorders: toward a translational paradigm for dysfunctional large-scale networks. *Neuron* **75**, 963-980, doi:10.1016/j.neuron.2012.09.004 (2012).
- 362 Straub, R. E. *et al.* Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**, 337-348, doi:10.1086/341750 (2002).



- 363 Weickert, C. S. *et al.* Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Archives of general psychiatry* **61**, 544-555, doi:10.1001/archpsyc.61.6.544 (2004).
- 364 Buxbaum, J. D. *et al.* Molecular dissection of NRG1-ERBB4 signaling implicates PTPRZ1 as a potential schizophrenia susceptibility gene. *Mol Psychiatry* **13**, 162-172, doi:10.1038/sj.mp.4001991 (2008).
- 365 Fazzari, P. *et al.* Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* **464**, 1376-1380, doi:10.1038/nature08928 (2010).
- 366 Zheng, K. *et al.* TrkB signaling in parvalbumin-positive interneurons is critical for gamma-band network synchronization in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17201-17206, doi:10.1073/pnas.1114241108 (2011).
- 367 Addington, A. M. *et al.* GAD1 (2q31.1), which encodes glutamic acid decarboxylase (GAD67), is associated with childhood-onset schizophrenia and cortical gray matter volume loss. *Mol Psychiatry* **10**, 581-588, doi:10.1038/sj.mp.4001599 (2005).
- 368 Gillberg, C. & Billstedt, E. Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. *Acta psychiatrica Scandinavica* **102**, 321-330 (2000).
- 369 Fatemi, S. H. *et al.* Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry* **52**, 805-810 (2002).
- 370 Yip, J., Soghomonian, J. J. & Blatt, G. J. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. *Acta neuropathologica* **113**, 559-568, doi:10.1007/s00401-006-0176-3 (2007).
- 371 Fatemi, S. H. *et al.* mRNA and protein levels for GABAAalpha4, alpha5, beta1 and GABABR1 receptors are altered in brains from subjects with autism. *Journal of autism and developmental disorders* **40**, 743-750, doi:10.1007/s10803-009-0924-z (2010).
- 372 Oblak, A. L., Gibbs, T. T. & Blatt, G. J. Reduced GABAA receptors and benzodiazepine binding sites in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Brain Res* **1380**, 218-228, doi:10.1016/j.brainres.2010.09.021 (2011).
- 373 Campbell, D. B., Li, C., Sutcliffe, J. S., Persico, A. M. & Levitt, P. Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **1**, 159-168, doi:10.1002/aur.27 (2008).

- 374 Powell, E. M. *et al.* Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioral dysfunction. *J Neurosci* **23**, 622-631 (2003).
- 375 Chih, B., Engelman, H. & Scheiffele, P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* **307**, 1324-1328, doi:10.1126/science.1107470 (2005).
- 376 Tabuchi, K. *et al.* A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* **318**, 71-76, doi:10.1126/science.1146221 (2007).
- 377 Gogolla, N. *et al.* Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of neurodevelopmental disorders* **1**, 172-181, doi:10.1007/s11689-009-9023-x (2009).
- 378 Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. & Rubenstein, J. L. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* **278**, 474-476 (1997).
- 379 Liu, X. *et al.* The *DLX1* and *DLX2* genes and susceptibility to autism spectrum disorders. *European journal of human genetics : EJHG* **17**, 228-235, doi:10.1038/ejhg.2008.148 (2009).
- 380 Clayton-Smith, J. & Laan, L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* **40**, 87-95 (2003).
- 381 Samaco, R. C., Hogart, A. & LaSalle, J. M. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: *MECP2* deficiency causes reduced expression of *UBE3A* and *GABRB3*. *Hum Mol Genet* **14**, 483-492, doi:10.1093/hmg/ddi045 (2005).
- 382 Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J. F. & Kohwi-Shigematsu, T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of *DLX5* in Rett syndrome. *Nat Genet* **37**, 31-40, doi:10.1038/ng1491 (2005).
- 383 Sarihi, A. *et al.* Metabotropic glutamate receptor type 5-dependent long-term potentiation of excitatory synapses on fast-spiking GABAergic neurons in mouse visual cortex. *J Neurosci* **28**, 1224-1235, doi:10.1523/jneurosci.4928-07.2008 (2008).

- 384 Selby, L., Zhang, C. & Sun, Q. Q. Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett* **412**, 227-232, doi:10.1016/j.neulet.2006.11.062 (2007).
- 385 D'Hulst, C. *et al.* Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Res* **1121**, 238-245, doi:10.1016/j.brainres.2006.08.115 (2006).
- 386 Temkin, N. R. Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: meta-analysis of controlled trials. *Epilepsia* **42**, 515-524 (2001).
- 387 Shinnar, S. *et al.* Phenomenology of prolonged febrile seizures: results of the FEBSTAT study. *Neurology* **71**, 170-176, doi:10.1212/01.wnl.0000310774.01185.97 (2008).
- 388 Chioza, B. *et al.* Association between the alpha(1a) calcium channel gene CACNA1A and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* **56**, 1245-1246 (2001).
- 389 Lo Iacono, N. *et al.* Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Development* **135**, 1377-1388, doi:10.1242/dev.011759 (2008).
- 390 Kananura, C. *et al.* A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Archives of neurology* **59**, 1137-1141 (2002).
- 391 Shoubridge, C., Fullston, T. & Gecz, J. ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology. *Hum Mutat* **31**, 889-900, doi:10.1002/humu.21288 (2010).
- 392 Hunt, R. F., Boychuk, J. A. & Smith, B. N. Neural circuit mechanisms of post-traumatic epilepsy. *Front Cell Neurosci* **7**, 89, doi:10.3389/fncel.2013.00089 (2013).
- 393 Scheffer, I. E. & Berkovic, S. F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain : a journal of neurology* **120 ( Pt 3)**, 479-490 (1997).
- 394 Wallace, R. H. *et al.* Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* **19**, 366-370, doi:10.1038/1252 (1998).
- 395 Escayg, A. *et al.* Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* **24**, 343-345, doi:10.1038/74159 (2000).

- 396 Baulac, S. *et al.* First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* **28**, 46-48, doi:10.1038/88254 (2001).
- 397 Escayg, A. & Goldin, A. L. Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. *Epilepsia* **51**, 1650-1658, doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02640.x (2010).
- 398 Ogiwara, I. *et al.* Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci* **27**, 5903-5914, doi:10.1523/jneurosci.5270-06.2007 (2007).
- 399 Rubenstein, J. L. & Merzenich, M. M. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* **2**, 255-267 (2003).
- 400 Yizhar, O. *et al.* Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**, 171-178, doi:10.1038/nature10360 (2011).
- 401 Cardin, J. A. *et al.* Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* **459**, 663-667, doi:10.1038/nature08002 (2009).
- 402 Isaacson, J. S. & Scanziani, M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* **72**, 231-243, doi:10.1016/j.neuron.2011.09.027 (2011).
- 403 Hensch, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 877-888, doi:10.1038/nrn1787 (2005).
- 404 Fagiolini, M. *et al.* Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1681-1683, doi:10.1126/science.1091032 (2004).
- 405 Wang, C.-C. C., Held, R. G. & Hall, B. J. SynGAP regulates protein synthesis and homeostatic synaptic plasticity in developing cortical networks. *PloS one* **8**, doi:10.1371/journal.pone.0083941 (2012).
- 406 Gkogkas, C. G. *et al.* Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* **493**, 371-377, doi:10.1038/nature11628 (2013).
- 407 Bidinosti, M. *et al.* Postnatal deamidation of 4E-BP2 in brain enhances its association with raptor and alters kinetics of excitatory synaptic transmission. *Molecular cell* **37**, 797-808, doi:10.1016/j.molcel.2010.02.022 (2010).
- 408 Di Cristo, G. *et al.* Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* **292**, 2337-2340, doi:10.1126/science.1059075 (2001).

- 409 Sale, A., Berardi, N., Spolidoro, M., Baroncelli, L. & Maffei, L. GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. *Front Cell Neurosci* **4**, 10, doi:10.3389/fncel.2010.00010 (2010).
- 410 Holmes, A. & Chen, A. GABA receptors in a state of fear. *Nat Neurosci* **18**, 1194-1196, doi:10.1038/nn.4098 (2015).
- 411 Lee, Y. S. & Silva, A. J. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci* **10**, 126-140, doi:10.1038/nrn2572 (2009).
- 412 Costa-Mattioli, M. *et al.* Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* **436**, 1166-1173, doi:10.1038/nature03897 (2005).
- 413 Costa-Mattioli, M. *et al.* eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **129**, 195-206, doi:10.1016/j.cell.2007.01.050 (2007).
- 414 Hu, H. *et al.* Ras signaling mechanisms underlying impaired GluR1-dependent plasticity associated with fragile X syndrome. *J Neurosci* **28**, 7847-7862, doi:10.1523/jneurosci.1496-08.2008 (2008).
- 415 Kwiatkowski, D. J. & Manning, B. D. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R251-258, doi:10.1093/hmg/ddi260 (2005).
- 416 Sebti, S. M., Tkalcevic, G. T. & Jani, J. P. Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer communications* **3**, 141-147 (1991).
- 417 Mendola, C. E. & Backer, J. M. Lovastatin blocks N-ras oncogene-induced neuronal differentiation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **1**, 499-502 (1990).
- 418 Angehagen, M., Ronnback, L., Hansson, E. & Ben-Menachem, E. Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *Journal of neurochemistry* **94**, 1124-1130, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03259.x (2005).

- 419 Du, J. *et al.* Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci* **24**, 6578-6589, doi:10.1523/jneurosci.1258-04.2004 (2004).
- 420 Hanada, T. *et al.* Perampanel: a novel, orally active, noncompetitive AMPA-receptor antagonist that reduces seizure activity in rodent models of epilepsy. *Epilepsia* **52**, 1331-1340, doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03109.x (2011).
- 421 Krauss, G. L. *et al.* Tolerability and safety of perampanel: two randomized dose-escalation studies. *Acta neurologica Scandinavica* **125**, 8-15, doi:10.1111/j.1600-0404.2011.01588.x (2012).
- 422 Han, S. *et al.* Autistic-like behaviour in Scn1a<sup>+/-</sup> mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* **489**, 385-390, doi:10.1038/nature11356 (2012).
- 423 Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M. & Tsai, L. H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* **447**, 178-182, doi:10.1038/nature05772 (2007).
- 424 Putignano, E. *et al.* Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* **53**, 747-759, doi:10.1016/j.neuron.2007.02.007 (2007).
- 425 Guan, J. S. *et al.* HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459**, 55-60, doi:10.1038/nature07925 (2009).
- 426 Vecsey, C. G. *et al.* Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* **27**, 6128-6140, doi:10.1523/jneurosci.0296-07.2007 (2007).