

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Rôles de la voie de signalisation mTORC1 dans le développement des
cellules GABAergiques exprimant la parvalbumine**

Par
Clara Akofa Amegandjin

Département de Neurosciences
Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Neurosciences

AOÛT, 2021

© Clara Amegandjin, 2021

Université de Montréal
Département de neurosciences, Faculté de médecine

Cette thèse de doctorat intitulée :
Rôles de la voie de signalisation mTORC1 dans le développement des cellules
GABAergiques exprimant la parvalbumine

Présentée par :

Clara Akofa Amegandjin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nicole Leclerc, Ph.D
Présidente-rapportrice

Graziella Di Cristo, Ph. D
Directrice de recherche

Christine Vande Velde, Ph. D
Membre du jury

Jean-François Cloutier, Ph. D
Examineur externe

Hélène Girouard, Ph. D
Représentante du doyen

RÉSUMÉ

La voie de signalisation mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) est cruciale pour la croissance de l'organisme. Dans les neurones matures, mTORC1 régule la synthèse des protéines ainsi que la plasticité synaptique à la base de l'apprentissage et de la formation de la mémoire. Des dérégulations de mTOR constituent la cause de plusieurs maladies monogéniques (mTORpathies) et sont impliquées aussi bien dans des troubles neurodéveloppementaux que neuropsychiatriques. L'une des mTORpathies, la sclérose tubéreuse, est causée par des mutations des gènes codant pour les inhibiteurs de mTORC1, les complexes 1 et 2 de la sclérose tubéreuse (*Tsc1* et *Tsc2*). Elle est associée à l'épilepsie, l'autisme et aux déficiences intellectuelles. Le rôle de mTORC1 dans les neurones excitateurs est largement connu, pourtant, son implication dans la modulation des circuits inhibiteurs corticaux a été très peu investiguée.

Dans le cerveau, les interneurons inhibiteurs GABAergiques (cellules produisant l'acide gamma-aminobutyrique) sont caractérisés par leur grande diversité de morphologies, connectivités et propriétés électrophysiologiques. Les *Basket Cells* qui expriment la parvalbumine (PV) ciblent spécifiquement le soma et les dendrites proximales de centaines de neurones excitateurs. Cela étant, les cellules PV sont positionnées de façon stratégique pour contrôler la génération des potentiels d'actions. En particulier, l'arborisation axonale ainsi que la densité synaptique des cellules PV subissent des changements drastiques dans le jeune cerveau en développement. Par ailleurs, des altérations dans le fonctionnement des cellules PV ont été associées aux maladies du spectre de l'autisme. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents le développement de la connectivité des cellules PV sont très peu investigués. En particulier, dans quelle mesure et comment une dérégulation de la voie de signalisation mTORC1 affecterait le développement des cellules PV est inconnue. D'un autre côté, il a été rapporté qu'en plus de dysfonctionnements cognitifs, les maladies du spectre de

l'autisme sont également caractérisées par des déficits dans le traitement sensoriel. Environ 90% des patients de cette pathologie subissent des expériences sensorielles atypiques telles qu'une hyper et hypo-réactivité et des réponses anormales aux stimuli tactiles. À cet égard, les anomalies sensorielles font désormais partie intégrante des critères de diagnostic de l'autisme. Pourtant, les mécanismes neurobiologiques à l'origine des déficits sensoriels demeurent encore mal connus. Vu l'importance de la voie mTORC1-TSC1 dans la physiologie neuronale et du fait que les mutations de *TSC1* génèrent des traits autistiques, nous proposons l'hypothèse selon laquelle la dérégulation Tsc1-dépendante de la voie mTOR dans les cellules PV engendre une perturbation de la connectivité de ces dernières, provoquant une altération des comportements relatifs à la sclérose tubéreuse.

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent qu'une haploinsuffisance ou une absence totale de *TSC1* soit dans des cellules PV isolées, en cultures organotypiques, ou dans toute la population de cellules PV *in vivo* entraîne une croissance précoce des branchements axonaux et de la densité des boutons synaptiques formés par les cellules mutantes, ce qui est suivie par une perte exagérée de leur innervation chez les souris adultes. Par ailleurs, les souris hétérozygotes *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* et *knock-out PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* comparativement aux souris saines présentaient des déficits dans les comportements sociaux. Aussi, nous avons identifié les dysfonctionnements dans l'autophagie comme mécanismes moléculaires sous-jacents la perte des synapses PV chez les souris mutantes. Enfin, nous avons démontré l'existence d'une période critique se situant entre les 2^e et 3^e semaines postnatales durant laquelle un traitement à la Rapamycine qui inhibe l'hyperactivation de mTORC1 découlant de l'haploinsuffisance de *TSC1* est suffisante pour renverser de façon permanente les déficits synaptiques et comportementaux des animaux mutants.

Aussi, l'haploinsuffisance de *TSC1* dans les cellules PV entraîne une augmentation de la discrimination tactile chez les animaux mutants. Par ailleurs, nous avons trouvé que les

connectivités glutamatergiques aussi bien intra-corticales que thalamocorticales sur les cellules PV sont réduites chez les adultes mutants comparativement aux contrôles alors que chez les souris pré-adolescentes, elles ne sont pas affectées. Finalement, une restriction sensorielle par l'intermédiaire de la coupe de moustaches pendant la fenêtre critique identifiée est suffisante pour renverser le phénotype d'hypersensibilité de ces animaux.

Dans son ensemble, cette thèse apporte les preuves du rôle particulier de la signalisation mTORC1 dans la régulation du développement et du maintien de la connectivité des cellules PV et établit le ciblage de ces dernières comme bases mécanistiques d'un renversement des déficits dans les comportements sociaux et la discrimination sensorielle relatifs à l'autisme dans la sclérose tubéreuse.

MOTS CLÉS : Interneurones corticaux, TSC1, Parvalbumine, mTOR, Période critique, Déficits sociaux, Déficits sensoriels, Rapamycine.

SUMMARY

Mechanistic target of rapamycin (mTORC1) is a central player in cell growth throughout the organism. However, mTORC1 takes on additional, more specialized roles in the brain, for example, regulating neuron differentiation and glutamatergic synapse formation. In addition, in mature neuron, mTORC1 regulates protein synthesis-dependent and synaptic plastic changes underlying learning and memory. mTOR dysfunctions are the root cause of several monogenetic disorders (mTORopathies) and are implicated in both neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. One of the most studied mTORopathy is Tuberous Sclerosis, which is caused by mutations in the mTORC1-negative regulators Tuberous Sclerosis Complex 1 or 2 (*TSC1* or *TSC2*). Tuberous Sclerosis is associated with neurological problems, including epilepsy, autism and intellectual disabilities. The role of mTORC1 in excitatory neurons has been extensively investigated, on the other hand whether and how it modulates cortical inhibitory circuit formation is not known.

Within the forebrain, inhibitory GABAergic (γ -aminobutyric acid producing) interneurons possess the largest diversity in morphology, connectivity, and physiological properties. Cortical parvalbumin (PV)-positive basket cells (BC) specifically target the soma and proximal dendrites of excitatory neurons. PV cells are strategically positioned to control the generation of action potentials and are also strongly interconnected, which promotes their synchronous activity. The correct development of inhibitory interneurons is crucial for functional circuits. In particular, the axonal arborisation and synapse density of PV interneurons change in the postnatal brain. Interestingly, altered PV cells function has been associated to neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorders (ASDs), both in human and animal models. How and whether mTORC1 signaling affects PV cell development is unknown.

In addition to cognitive impairments, ASDs often result in sensory processing deficits. About 90% of ASD individuals have atypical sensory experiences, described as both hyper- and hypo-reactivity, with abnormal responses to tactile stimulation representing a very frequent finding. In fact, sensory abnormalities are now commonly recognized as diagnostic criteria in ASDs. However, the neurobiological mechanisms that underlie impaired sensory processing associated with ASDs are poorly understood. Mindful of the importance of TSC1-mTOR pathway for neuronal physiology and since mutations in *Tsc1* give rise to autistic traits, we questioned whether and how *Tsc1* deletion selectively in PV cells affects their connectivity, and whether and to what extent these alterations in cortical PV cell circuits might be contributing to changes in behaviours downstream of altered mTOR signaling.

The results presented in this thesis show that *Tsc1* haploinsufficiency causes a premature increase in terminal axonal branching and bouton density formed by mutant PV cells, followed by a loss of perisomatic innervation in adult mice. Further PV cell-restricted *Tsc1* haploinsufficient and knockout mice, respectively *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* and *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* mice show deficits in social behaviour. Moreover, we identify autophagy dysfunctions as molecular mechanisms underlying PV synapses loss in *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* and *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* mice. Finally, we identify a sensitive period during the third postnatal week during which treatment with the mTOR inhibitor Rapamycin rescues deficits in both PV cell innervation and behavioral deficits in adult conditional haploinsufficient mice.

We further find that *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice show increased texture discrimination. Our data also demonstrate that mutant PV cells show reduced cortical and thalamocortical glutamatergic inputs in adult mice, whereas they do not exhibit any alterations of these inputs in pre-adolescent mice. Finally sensory modulation by whisker trimming during the third postnatal week rescues texture discrimination hypersensitivity in adult conditional haploinsufficient mice.

Altogether, this thesis demonstrates the crucial role of mTORC1 signaling in the regulation of the developmental time course and maintenance of cortical PV cell connectivity and support a mechanistic basis for the targeted rescue of social behaviors and sensory processing in disorders associated with deregulated mTORC1 signaling.

KEY WORDS: Cortical interneurons, Parvalbumin, mTOR, Critical period, Social deficits, Sensory deficits, Rapamycin.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	III
SUMMARY	VI
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES TABLEAUX	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVII
REMERCIEMENTS	XXII
CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1. LA VOIE DE SIGNALISATION mTOR	2
1.1.1. Le complexe mTORC1	3
1.1.1.1. Structure protéique du complexe mTORC1	5
1.1.1.2. Régulation de mTORC1	7
a. Régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance.....	9
b. Régulation de mTORC1 par les niveaux d'énergie et d'oxygène	11
c. Régulation de mTORC1 par les acides aminés	12
d. Régulation de mTORC1 par l'activité neuronale	13
1.1.1.3. Mécanismes d'action de mTORC1	14
a. La synthèse des protéines	15
b. La synthèse des lipides	17
c. Régulation de l'autophagie par mTORC1	19
1.1.2. Rôles physiologiques de la voie mTOR dans le cerveau.....	22
1.1.2.1. Implication de mTOR dans le développement neuronal	23
1.1.2.2. Implication de mTOR dans la formation des circuits neuronaux	26
1.1.2.3. Implication de mTOR dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire	29
1.1.3. Neuropathologies de mTOR.....	34
1.1.3.1. La sclérose tubéreuse.....	36
1.1.3.2. Autres neuropathologies relatives à mTOR.....	41
1.2. LES CELLULES GABAERGIQUES DU CORTEX	41

1.2.1. Développement des cellules GABAergiques du cortex	43
1.2.1.1. Diversité des interneurons.....	44
1.2.1.2. Spécification et migration des interneurons.....	46
1.2.1.3. Établissement des synapses.....	50
a. Régulation du développement des synapses inhibitrices par la signalisation GABA	51
b. Régulation du développement des synapses inhibitrices par les molécules d'adhésion	52
1.2.2. Rôles des interneurons GABAergiques.....	57
1.2.2.1. Rôles des interneurons GABAergiques au cours du développement.....	57
1.2.2.2. Rôles des interneurons PV chez l'adulte.....	59
a. Implication des cellules PV dans les comportements sociaux	64
b. Les déficits sensoriels tactiles dans l'autisme : les cellules PV y sont-elles impliquées?	67
1.3. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE LA THESE	70
CHAPITRE II : PREMIER ARTICLE	72
2.1. ABSTRACT	75
2.2. INTRODUCTION	76
2.3. RESULTS.....	78
2.3.1. TSC1 haploinsufficiency in postnatal PV cells reduced PV cell connectivity and altered social behavior in adulthood.....	78
2.3.2. mTORC1 hyperactivation in single PV cells induced a premature increase in bouton density and axon branching, subsequently followed by excessive bouton pruning.	81
2.3.3. Tsc1 deletion in GABAergic cells causes transient autophagy dysfunction in adolescent mice.....	84
2.3.4. Short-term administration of Rapamycin rescues long-term loss of PV cell innervation in <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/+</i> mice.....	86
2.4. DISCUSSION.....	89
2.5. ACKNOWLEDGEMENTS	93
2.6. AUTHORS CONTRIBUTION.....	94
2.7. COMPETING INTERESTS.....	94
2.8. METHODS.....	95

2.8.1. Animals.....	95
2.8.2. Mice Genotyping	95
2.8.3. Slice culture and biolistic transfection.....	95
2.8.4. Immunohistochemistry	96
2.8.5. Confocal Imaging and Quantitative analysis.....	97
2.8.6. Electron microscopy	99
2.8.7. Western Blot	100
2.8.8. Rapamycin treatment.....	101
2.8.9. Mouse behavior tests	103
2.8.10. Statistics and reproducibility	104
2.9. DATA AVAILABILITY	104
2.10. REFERENCES	105
2.11. FIGURES	105
2.12. SUPPLEMENTARY TABLE	128
2.13. SUPPLEMENTARY FIGURES	129
CHAPITRE III : SECOND ARTICLE.....	146
3.1. ABSTRACT	149
3.2. INTRODUCTION	150
3.3. MATERIALS AND METHODS	152
3.3.1. Animals.....	152
3.3.2. Mice Genotyping	153
3.3.3. Mouse behavior tests	154
3.3.4. Rapamycin treatment.....	155
3.3.5. Sensory deprivation	155
3.3.6. Immunohistochemistry	155
3.3.7. Confocal Imaging and Quantitative analysis.....	156
3.3.8. Electron microscopy	156
3.3.9. Surgery for electrode implant	158
3.3.10. EEG recording	158
3.3.11. Data preprocessing	159
3.3.12. Data Analysis.....	159
3.3.13. Statistics and reproducibility	160

3.4. DATA AVAILABILITY	160
3.5. RESULTS	160
3.5.1. Short-term rapamycin treatment rescued aberrant tactile perception caused by PV-cell specific Tsc1 haploinsufficiency	160
3.5.2. PV-cell specific Tsc1 haploinsufficient mice showed increased cortical responses to whisker stimulation.	161
3.5.3. Tsc1 haploinsufficient PV cells show age-specific alterations of glutamatergic inputs	162
3.5.4. Short-term whisker deprivation during the third postnatal week rescued connectivity deficits and aberrant tactile perception in <i>PV-Cre;Tsc1flox/+</i> mice	163
3.6. DISCUSSION	164
3.7. ACKNOWLEDGEMENTS	168
3.8. AUTHORS CONTRIBUTION	168
3.9. COMPETING INTERESTS	168
3.10. REFERENCES	169
3.11. FIGURES	174
CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE	187
4.1. ALTÉRATIONS DE LA CONNECTIVITÉ DES CELLULES PV DANS LA SCLÉROSE TUBÉREUSE	189
4.2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES SOUS-JACENTS LA PERTE SYNAPTIQUE	192
a. Autophagie	192
b. Les mitochondries	195
c. Implication des microglies dans la sclérose tubéreuse.....	198
4.3. LA SCLÉROSE TUBÉREUSE : UN TROUBLE DE PÉRIODE CRITIQUE?	199
4.4. LES ANOMALIES DU TRAITEMENT SENSORIEL TACTILE DANS LA SCLÉROSE TUBÉREUSE	202
4.5. MÉCANISMES SE TROUVANT EN ARRIÈRE DU DÉFICIT SENSORIEL DANS LA SCLÉROSE TUBÉREUSE	204
4.6. LE NIVEAU D'ACTIVITÉ DES CELLULES PV : ÉLÉMENT CENTRAL DU PHÉNOTYPE DES SOURIS <i>PV-CRE;TSC1^{LOX?}</i>	207

CHAPITRE V : CONCLUSIONS.....	210
BIBLIOGRAPHIE.....	214

LISTE DES FIGURES

Chapitre I: Introduction générale

Figure 1 : Structure de la kinase mTOR et les constituants de ses complexes protéiques.....	5
Figure 2 : Le complexe mTORC1.....	7
Figure 3 : La voie de signalisation mTOR.....	8
Figure 4 : Les cibles de mTOR et ses mécanismes d'action cellulaires	15
Figure 5 : Différentes pathologies génétiques découlent d'un changement d'activité de la voie mTOR.....	35
Figure 6 : Critères de classification des interneurons	43
Figure 7 : Diversité des neurones GABAergiques dans le cortex.....	46
Figure 8 : Divers facteurs de transcription régulent le développement des interneurons	50
Figure 9 : Régulation du développement des synapses inhibitrices et de leur motifs de connectivité par GABA	56
Figure 10 : Coordination et contrôle du recrutement des flux	63
Figure 11 : Perte de l'équilibre excitation-inhibition dans la schizophrénie	64

Chapitre II: Sensitive period for rescuing parvalbumin interneurons connectivity and social behavior deficits caused by *TSC1* loss.

Figure 1 : pS6 expression levels increase specifically in PV cells between the second and fourth postnatal weeks	111
Figure 2 : <i>Tsc1</i> knockout in PV cells causes PV cell hypo-connectivity and social behavioral deficits in young adult mice.....	112
Figure 3 : <i>Tsc1</i> knockout in single PV neurons causes a premature increase in axonal terminal branching and bouton density followed by excessive pruning.....	114
Figure 4 : PV cells show prematurely rich perisomatic innervation in <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/flox</i> and <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/+</i> mice at EP18.....	116
Figure 5 : PV interneurons show significantly reduced perisomatic innervation in <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/flox</i> and <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/+</i> mice at EP34.....	118
Figure 6 : <i>Tsc1</i> deletion in GABAergic cells causes transient autophagy dysfunctions in adolescent mice.....	120
Figure 7 : Late-onset <i>Tsc1</i> deletion in PV cells does not affect their innervation.....	122

Figure 8: Postnatal onset of <i>Tsc1</i> haploinsufficiency in PV cells induces premature putative synapse formation.....	123
Figure 9: Short term Rapamycin treatment rescues the premature increase of PV cell perisomatic innervation caused by <i>Tsc1</i> haploinsufficiency	124
Figure 10: Short term rapamycin treatment rescues loss of PV cell connectivity and social behavior deficits in adult heterozygous mutant mice.	126
Supplementary Figure 1: Cortical PV cells show increased mTOR activity and somatic hypertrophy in <i>PV-Cre;Tsc1flox/flox</i> mice.....	129
Supplementary Figure 2: <i>Tsc1</i> knockout in single PV cells leads to increase in mTOR activity and somatic hypertrophy	130
Supplementary Figure 3: <i>Tsc1</i> haploinsufficiency in single PV cells causes a premature increase in axon terminal branching and bouton density.	131
Supplementary Figure 4: Premature increase in perisomatic innervation by <i>Tsc1</i> ^{-/-} PV cells is mTORC1 dependent	132
Supplementary Figure 5: PV <i>Tsc1</i> ^{-/-} cell innervations at EP24 are morphologically indistinguishable from age-matched controls.....	134
Supplementary Figure 6: Cortical PV cells from <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/flox</i> mice show increased mTOR activity and somatic hypertrophy	135
Supplementary Figure 7: <i>Tsc1</i> knockout in MGE derived neurons leads to social behavioral deficits in young adult mice.....	137
Supplementary Figure 8: <i>Tsc1</i> knockout in MGE-derived neurons leads to a significant reduction of GABAergic synapses in the olfactory bulb of adult mice.....	139
Supplementary Figure 9: Short term Rapamycin treatment rescues loss of perisomatic innervation in <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/+</i> mice at EP34.	140
Supplementary Figure 10: Short term Rapamycin treatment does not rescue loss of perisomatic innervations in <i>Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/flox</i> mice at EP34.....	142
Supplementary Figure 11: Short term Rapamycin treatment does not rescue cerebellar abnormalities in adult homozygous mice.	142

Chapitre III: Sensory input modulation rescues alterations in parvalbumin cell connectivity and texture discrimination caused by *Tsc1* haploinsufficiency

Figure 1: Adult mice with <i>TSC1</i> haploinsufficiency in PV cells show aberrant texture discrimination	175
--	-----

Figure 2: PV-specific TSC1 knockdown induces alterations in evoked oscillatory activity following whisker stimulation without difference in ERP profiles 176

Figure 3: Adult mice with Tsc1 haploinsufficient PV cells show reduced density of excitatory inputs 178

Figure 4: Adult mice with PV cell-specific TSC1 haploinsufficiency show reduced density in thalamo-cortical inputs onto PV cell somata 180

Figure 5: Thalamo-cortical and cortico-cortical inputs onto PV cell somata are altered by TSC1 haploinsufficiency in P21 mice 181

Figure 6: Sensory deprivation during a sensitive time window rescues PV cells perisomatic connectivity in young mutant mice 181

Figure 7: Sensory deprivation during a sensitive time window rescues PV cells perisomatic connectivity and textured novel object discrimination deficits in adult mutant mice 181

LISTE DES TABLEAUX

Supplementary Table 1: List of primers used for mouse genotyping. 142

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

APO: Aire préoptique

Arc: Cytoskeletal-associated protein

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ARNt: Acide ribonucléique de transfert

ARNm: Acide ribonucléique messenger

Arx: Aristaless-related homeobox gene

AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase

AMP: Adenosine 5'-monophosphate

ATP: Adenosine 5'-triphosphate

ATG1/ULK1: Autophagy-related protein 1/Unc-51 like autophagy activating kinase

ATG7: Autophagy-related protein 7

ATG13: Autophagy-related protein 13

ATG101: Autophagy-related protein 101

ATG14: Autophagy-related protein 14

BDNF: Brain derived neurotrophic factor

Cbln4: Cerebellin 4

C-terminale: Carboxy-terminale

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

CGR: Cellules ganglionnaires de la rétine

CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4

CXCR7: C-X-C chemokine receptor type 7

cENOs: Cortical early network oscillations

DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5

Dlx: Distal-less

DREADDs: Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs

4EBP: 4E binding protein

4EBP1: 4-Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1

eIF-4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E

eEF-2K: Eukaryotic elongation factor 2 Kinase

E-LTP: Early LTP

EGM: Éminence ganglionnaire médiane

EGC: Éminence ganglionnaire caudale

EGL: Éminence ganglionnaire latérale

ErbB4: V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4

EP: Equivalent postnatal day

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2

Deptor: DEP-domain-containing mTOR interacting protein

DHPG: 3,5-dihydroxyphenylglycine

Fgf13: Fibroblast growth factor 13

FRAP: FKBP12-rapamycin-associated

FRB: FKBP12-rapamycin binding domain

FMR1: Fragile X mental retardation 1

FIP200/ RB1CC1: Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa/RB1-inducible coiled-coil protein 1

GDPs: Giant depolarising potentials

GABA: Gamma-aminobutyric acid

Gad1: Glutamate Decarboxylase 1

Gad2: Glutamate Decarboxylase2

GAT1: GABA transporter 1

GDP: Guanosine-Diphosphate

GSK3-b: Glycogen synthase kinase 3b

GTP: Guanosine-Triphosphate

GluR1: Glutamate receptor 1

HEAT: Huntingtin, Elongation factor 3

HIF-1a: Hypoxia-inducible factor 1-alpha

5HT3aR: Récepteur 5-hydroxytryptamine 3a

IGF1: Insuline-like growth factor 1

iPSCs: Inducible pluripotent stem cells

IRS1: Insuline receptor substrate 1

kDa: Kilodalton

LTP: Long term potentiation

L-LTP: Late LTP

LTD: Long-term depression

Lgi2: Leucin-rich repeat LGI family member 2

LC3-II: Autophagosomal lipidated microtubule-associated protein 1 light chain 2

LGN: Lateral geniculate nucleus

Mash1: Mammalian achaete-scute homolog 1

MAP2: Microtubule-associated protein 2

MeCP2: Methyl-CpG binding protein 2

mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin

mTORC1: mTOR complex 1

mTORC2: mTOR complex 2

mLST8/GβL: Mammalian lethal with Sec 13 protein 8/G-protein β-protein subunit like

MHCI: Major histocompatibility complex

NCAM: Neural cell adhesion molecule

NMDA: N-methyl-D-aspartate

N-terminale: amino-terminale

P: Jour postnatal

PDCD4: Programmed Cell Death 4

PI3K: Kinase phosphatidylinositol -3

PRAS40: Proline rich Akt substrate 40 kDa

PIP3: Phosphoinositol (3, 4, 5)-triphosphate

PI3CIII: Phosphatidylinositol 3-kinase class III

PKC: Protéine kinase C

PTEN: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10

PSD95: Postsynaptic density protein 95

PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

PV: Parvalbumine

PAK3: P21-activated serine/threonine kinase

PSA: Polysialic acid

p62: Protein 62

PPAR-g: Peroxisome proliferator-activated receptor g

Raptor: Regulatory-associated protein of mTOR

REDD1: Regulated in development and DNA damage response 1

Rictor: Rapamycin insensitive companion of mTOR

RGCs: Retinal ganglion cells

Rheb: Ras homolog enriched in brain

SEGAs: Subependymal giant cell astrocytomas

S6K: Kinase ribosomale S6

SREBP: Sterol responsive element binding protein

SGK1: Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1

SNC: Système nerveux central

SHANK3: SH3 and multiple ankyrin repeat domain 3

SST: Somatostatine

Sox6: SRY-box 6

SPAs: Synchronous plateau assemblies

SNP: Système nerveux périphérique

Syngap1: Synaptic Ras-GTPase activating protein 1

TAND: TSC-associated neuropsychiatric disorders

TBC1D7: Tre2-Bub2-Cdc16 1 domain family member 7

TeNT-Lc : Tetanus Neurotoxin Type-Light chain

TFEB: Transcription factor EB

TORC1: Target of rapamycin complex 1

TSC: Tuberous Sclerosis Complex

5'-TOP: 5'-terminal oligopyrimidine

TRIM24: Tripartite Motif Containing 24

TNF- α : Tumor necrosis factor α

UVRAG: UV radiation resistance-associated gene product

VIP: Vasoactive intestinal peptide

REMERCIEMENTS

Cette thèse, couronnement d'un parcours débuté il y a cinq années n'aurait pas été possible sans la présence de ces merveilleuses personnes qui jour après jour ont partagé les moments heureux comme les plus difficiles rendant cette saison de ma vie plus que mémorable. La place manquerait pour mentionner individuellement chacune d'entre elles.

Je remercie profondément ma directrice de recherche, Graziella Di Cristo, pour m'avoir offert cette belle opportunité, elle qui n'a cessé d'être présente pour moi à tout moment. Sous sa direction, la chercheuse en moi a énormément mûri. Sa passion communicative pour la science, son dynamisme, son humanité, sa patience m'ont permises de profiter pleinement de ces années d'apprentissage mais aussi de devenir une meilleure personne. Elle a été et demeurera pour moi un modèle à suivre dans la prochaine étape de ma vie.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à mes collègues/ami(e)s du laboratoire. Leur aide a été déterminante dans l'accomplissement de ce projet. Les discussions entre deux expériences, les moments de joie partagés, l'esprit d'équipe et d'entraide ont fait du laboratoire un environnement de travail sain et agréable. Grâce à eux, aller au labo a été un plaisir du début à la fin. Si c'était à refaire, je ne demanderais rien d'autre que leur présence, ils n'ont eu de cesse que de me faire sentir spéciale.

Un merci particulier à mon ami Nicolas Lemmetti pour le grand soutien qu'il a été pour moi durant ces années, pour toutes les histoires drôles qu'il n'a cessées de me raconter, les petits plats partagés et les virées culinaires après les conférences. Ma reconnaissance va également à Marius Chiasseu pour ses précieux conseils et sa disponibilité.

Au-delà du diplôme qui me sera décerné en bout de ligne, je ressors de cette expérience énormément enrichie car j'ai pu réaliser que la science n'avance que parce qu'il y a des personnes qui mettent de côté leurs différences et bâtissent des ponts afin d'accomplir de grandes choses pour l'humanité. Ainsi, pour moi, cette thèse représente « une ode au travail d'équipe ».

À Prosper, Florence, Claver et Isabelle

Pour leur amour et support inconditionnels

“Alone we are smart, together we are brilliant”

Steven Anderson

« Si j'ai vu si loin, c'est que j'étais monté sur les épaules des géants »

Isaac Newton

Chapitre I

Introduction générale

1.1. La voie de signalisation mTOR

L'une des habiletés essentielles des organismes vivants, tant unicellulaires que multicellulaires est leur capacité à déceler les fluctuations en nutriments dans leur environnement et d'ajuster de façon conséquente leur consommation d'énergie. Cette capacité permet aux cellules de survivre pendant les périodes d'appauvrissement en nutriments ainsi que de croître et de pouvoir proliférer lorsque les nutriments sont abondants. L'adaptation des cellules à la dynamique et disponibilité des nutriments dépend d'une minutieuse coordination des processus de consommation d'énergie (anabolisme) avec ceux de production d'énergie (catabolisme). Au cœur même de cet équilibre se situe la voie de signalisation mTOR, qui originellement était définie comme « *Mammalian Target Of Rapamycin* », mais a été redéfinie comme « *Mechanistic Target Of Rapamycin* » [1]. Ainsi, la voie de signalisation mTOR (kinase Sérine/Thréonine et appartenant à la superfamille des protéines kinases relatives à la kinase phosphatidylinositol -3 (PI3K) connue sous le nom des PIKK), représente un centre crucial de signalisation cellulaire, qui, à l'instar du système nerveux, intègre et gère diverses informations internes et externes afin de contrôler l'homéostasie cellulaire. Pour ce faire, mTOR influence directement divers processus tels que la croissance, la synthèse protéique, la traduction d'ARNm (acide ribonucléique messenger), la transcription de gènes, l'autophagie, la balance métabolique et la biogenèse, ainsi que le maintien des organelles. L'importance de la voie de signalisation mTOR dans le bon fonctionnement du cerveau (incluant la prolifération des cellules souches neuronales, l'assemblage et la maintenance des circuits, la plasticité neuronale expérience-dépendante ainsi que la régulation de comportements complexes tels que la nutrition, le sommeil et les rythmes circadiens) est révélée par la myriade de pathologies dans laquelle un dysfonctionnement de la voie mTOR a été impliqué. De ce nombre, on compte les troubles du spectre de l'autisme, l'épilepsie ainsi que diverses maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives [2, 3].

Dans les cellules, le fonctionnement de mTOR passe par deux distincts et larges complexes biochimiques définis par leur composition protéique à savoir le *mTOR complex 1* (mTORC1) et le *mTOR complex 2* (mTORC2) [2, 4]. mTORC1 est impliqué dans le métabolisme cellulaire anabolique en réponse à la présence de facteurs de croissance, de nutriments et d'énergie et fonctionne donc comme le centre de contrôle de la croissance cellulaire. En revanche, bien que moins investigué et connu que mTORC1, mTORC2 a été décrit comme important pour le contrôle du métabolisme cellulaire, la survie cellulaire ainsi que l'organisation du cytosquelette d'actine [5].

Le rôle distinct de ces deux complexes leur est conféré par leur organisation moléculaire ainsi que les différents substrats qui les constituent.

1.1.1. Le complexe mTORC1

Le complexe mTOR est une kinase de 289 kDa (kilo Dalton) constituée de multiples domaines protéiques (**Figure 1**). Sa terminaison carboxy-terminale (C-terminale) a une séquence homologue au domaine catalytique de la famille des PI3K dont elle fait partie. Le domaine C-terminal contient ainsi des sites de phosphorylation tels que la thréonine 2446, la sérine 2448 et la sérine 2481 et est important à la régulation de l'activité de mTOR. La phosphorylation de la sérine 2481 représente une cible autocatalytique de mTOR. Quant au résidu sérine 2448, il est une cible de la voie AKt (protéine Kinase B, qui est une autre kinase sérine/thréonine) ainsi que de la kinase ribosomale p70S6 (p70S6K), alors que la thréonine 2446 est phosphorylée par les protéines kinase AMP (AMPK « *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* ») et p70S6K. La terminaison C-terminale contient également le domaine FRAP (*FKBP12-rapamycin-associated*), ainsi que le domaine FRB (*FKBP12-rapamycin binding domain*) qui représentent les sites d'interactions entre mTOR et la

rapamycine. Quant à la terminaison amino-terminale (N-terminale) de mTOR, elle contient un motif à répétition en tandem de la protéine HEAT (*Huntingtin, Elongation factor 3*). Ce motif permet une interaction protéique entre le complexe mTOR et les protéines régulatrices de mTOR que représentent Raptor (*Regulatory-associated protein of mTOR*, sensible à la rapamycine) et Rictor (*Rapamycin insensitive companion of mTOR*, relativement insensible à la rapamycine) et a été associé à la multimérisation de mTOR [6]. On note également la présence de la sous-unité mLST8/GβL (*mammalian lethal with Sec 13 protein 8/G-protein β-protein subunit like*) qui est requise pour le fonctionnement de l'un des complexes de mTOR [2, 7].

Bien que formant des unités distinctes (quoiqu'interconnectées par diverses voies de signalisation connexes), les complexes mTORC1 et mTORC2 partagent une organisation structurelle identique. Néanmoins, les deux complexes sont caractérisés par certaines spécificités notamment leurs sous-unités qui interagissent avec Raptor et Rictor [7].

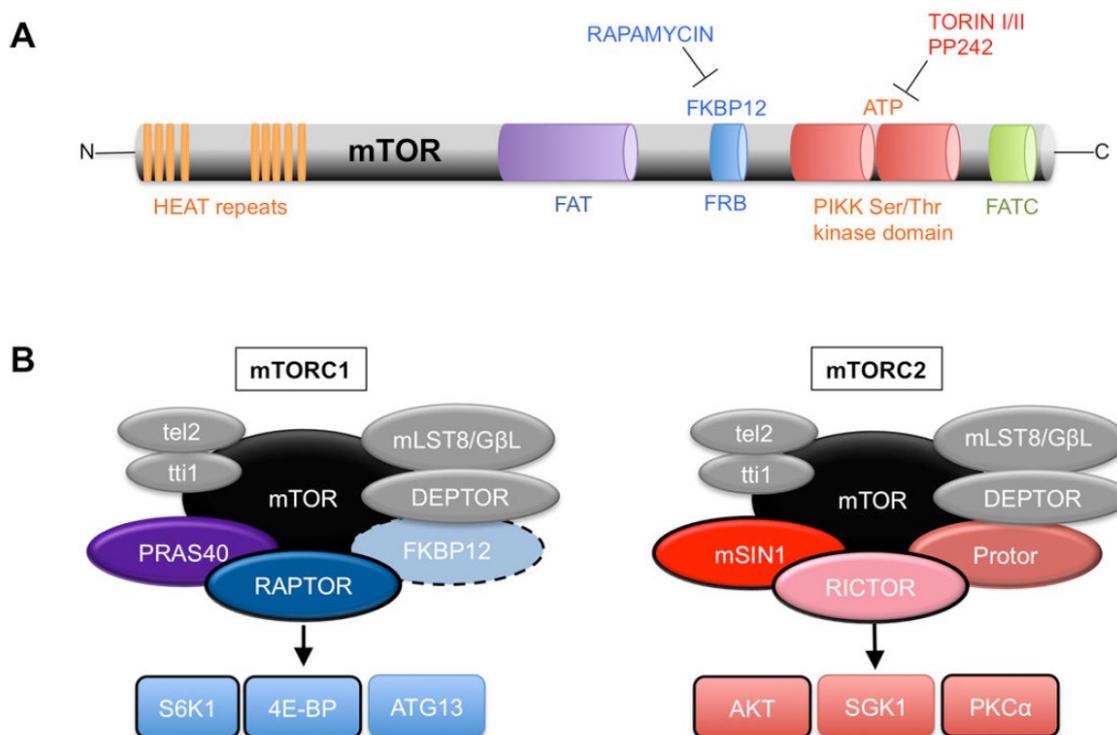


Figure 1 : Structure de la kinase mTOR et les constituants de ses complexes protéiques. **A-** la kinase mTOR est constituée de plusieurs domaines, on y distingue successivement le domaine HEAT permettant les interactions protéiques de mTOR avec Raptor et Rictor ainsi que d'autres protéines, le domaine FRB qui est le site de liaison de la rapamycine, le domaine de la kinase PIKK et finalement le FATC. **B-** les complexes mTORC1 et mTORC2 sont constitués de conglomérats protéiques, les uns leur étant communs alors que les autres comme Raptor et Rictor leurs sont spécifiques. Tirée de Lipton and Sahin (2014).

1.1.1.1. Structure protéique du complexe mTORC1

Des deux complexes formant la voie mTOR, le complexe mTORC1 est celui qui est le plus étudié. Ainsi sa constitution protéique est la mieux connue. Diverses études structurales de ce complexe ont permis de dévoiler sa constitution, sa fonction ainsi que sa perturbation par la rapamycine (inhibiteur de mTORC1). Les reconstructions d'images obtenues à l'aide de la cryo-microscopie électronique de mTORC1 et TORC1 (*Target of rapamycin complex 1*) de la levure ont révélées que le complexe forme un dimère en forme de losange (1000 kDa), avec une interface de dimérisation formée par des zones de contacts entre les domaines à répétition HEAT de mTOR ainsi qu'entre Raptor et mTOR. De plus, la structure cristalline du domaine kinase de mTOR lié au domaine mLST8 a montré que le complexe rapamycine-FKBP12 se lie au domaine FRB de mTOR afin de resserrer la clé catalytique et de partiellement exclure d'autres substrats du site actif. De nos connaissances actuelles, il en ressort que mTORC1 est formé de 5 sous-unités ayant chacune des rôles bien spécifiques. En premier lieu, nous retrouvons mTOR qui représente la sous-unité catalytique du complexe. Raptor (*Regulatory-associated protein of mTOR*) est la deuxième sous-unité et constitue une composante essentielle du complexe et a pour rôle le recrutement du substrat mTOR au complexe. Raptor est une protéine de liaison de 150 kDa qui peut se lier également au 4EBP1 (*4-Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*) ainsi qu'à la protéine p70S6K. La liaison de Raptor à mTOR est nécessaire à la phosphorylation de 4EBP1 *in vitro* mais augmente également l'activité de mTOR envers p70S6K. La troisième sous-unité est la « *Proline rich Akt substrate 40 kDa* »

(PRAS40). La PRAS40 est un partenaire de mTORC1 dont la liaison inhibe de façon compétitive la liaison de mTORC1 au Raptor. Une fois activé, mTOR peut phosphoryler directement PRAS40, entraînant sa dissociation d'avec mTORC1. Le complexe mTORC1 contient également le mLST8 dont le rôle exact dans le fonctionnement de mTORC1 n'est pas encore élucidé car sa délétion ne semble pas affecter l'activité du complexe. Une autre sous-unité de mTORC1 est le « *DEP-domain-containing mTOR interacting protein* » (Deptor). Deptor régule négativement l'activité de mTORC1, ainsi sa perte de fonction provoque une activation de mTORC1 [4-6]. En somme, Raptor et PRAS40 représentent les deux sous-unités spécifiques au mTORC1 [4]. PRAS40 et Deptor représentent des régulateurs négatifs de mTORC1. Ils sont directement phosphorylés par l'activation de mTORC1, ce qui réduit leur interaction physique avec le complexe. Par ailleurs, une stimulation de la voie mTOR avec de l'insuline provoque la dissociation de PRAS40 d'avec mTORC1 réprimant ainsi sa régulation négative [5, 8]. En revanche, sur la base de nos connaissances actuelles, mLST8/ GβL ne serait pas essentiel au fonctionnement du complexe [5] (**Figure 2**).

Une autre spécificité du complexe mTORC1 est qu'il est très sensible à un traitement à la rapamycine. En présence de la rapamycine, l'interaction mTOR–mLST8 est stable tandis que mTOR-Raptor devient très faible. L'activité de mTORC1 joue un rôle important dans la croissance cellulaire en promouvant la synthèse protéique, la biogenèse ribosomale, la synthèse lipidique et nucléotidique ainsi qu'en inhibant l'autophagie. Les deux cibles les mieux caractérisés de mTORC1 à savoir la kinase ribosomale S6 (p70S6K) ainsi que le facteur de traduction 4EBP « *4E binding protein* » régulent plusieurs de ces processus mTORC1-dépendant [1]. À titre informatif, mentionnons que la rapamycine n'est pas capable d'inhiber la phosphorylation de tous les substrats de mTORC1 de façon égale. Ainsi, la rapamycine abolit complètement la phosphorylation de S6K mais n'inhibe que partiellement la phosphorylation de 4EBP [5].

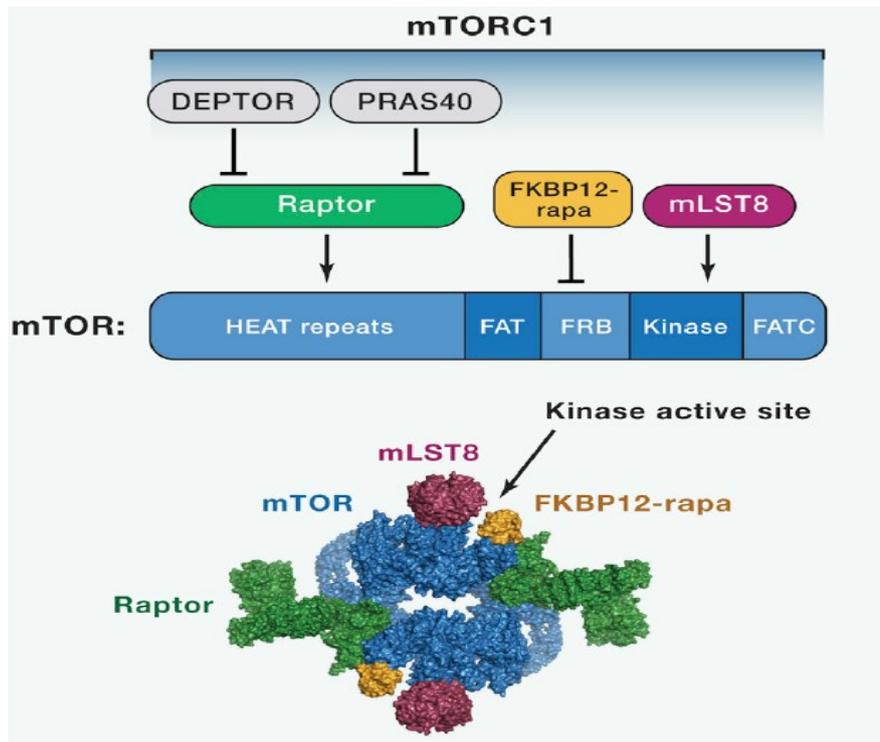


Figure 2 : Le complexe mTORC1. Les différentes sous-unités de mTORC1 avec leurs sites de liaison respectifs sur mTOR. L'image en bas représente l'organisation spatiale des sous-unités de mTORC1 obtenue par la cryo-microscopie électronique. Tirée de Saxton and Sabatini (2017).

1.1.1.2. Régulation de mTORC1

Des deux complexes formant la voie de signalisation mTOR, l'une des particularités de mTORC1 est le nombre des divers signaux en amont qu'il peut détecter. Le mTORC1 intègre des informations découlant de signaux intracellulaires et extracellulaires à savoir les facteurs de croissance, le stress, la réserve d'énergie, l'oxygène ainsi que les acides aminés. L'intégration de ces signaux par mTORC1 permet le contrôle de plusieurs processus biologiques tels que la synthèse protéique et lipidique ainsi que l'autophagie [9, 10]. Toutes les voies de signalisation qui activent mTORC1 (à l'exception des acides aminés) agissent par l'intermédiaire des protéines Tsc1 (harmatine) et Tsc2 (tubérine) ainsi que de la nouvelle sous-unité récemment découverte à savoir la TBC1D7 (*Tre2-Bub2-Cdc16 1 domain family member*

7) constituant le complexe de la sclérose tubéreuse (TSC) [11] (**Figure 3**). Une mutation dans le complexe Tsc1/2 entraîne la sclérose tubéreuse, une maladie caractérisée par une multitude de tumeurs bénignes. Le complexe Tsc1/2 régule négativement mTORC1 en convertissant la Rheb-GTP (*Ras homolog enriched in brain*) en sa forme inactive GDP (*Guanosine-Diphosphate*). Dans sa forme active, c'est-à-dire GTP (*Guanosine-Triphosphate*), Rheb interagit directement avec mTORC1 entraînant son activation. Soulignons que le mécanisme exact par lequel Rheb activerait mTOR est encore mal connu. Cependant, lorsque Tsc est phosphorylé, sa fonction répressive est abolie, de telle manière que Rheb peut activer mTORC1 [5, 8].

Tel que mentionné précédemment, l'activité de mTORC1 est régulée par une variété de signaux provenant de différentes voies en amont tels que les facteurs de croissance aussi bien que les acides aminés, le glucose et le niveau d'oxygène [10]

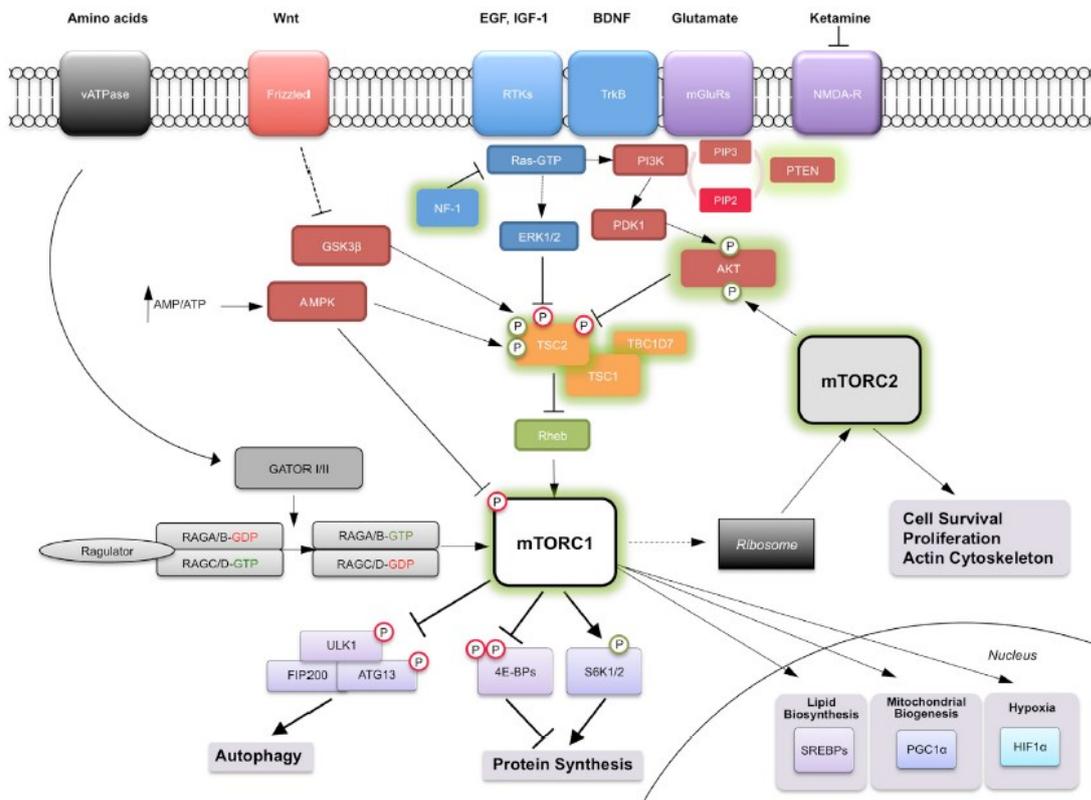


Figure 3: La voie de signalisation mTOR. Les complexes mTORC1 et mTORC2 intègrent les signaux provenant des nutriments, des facteurs de croissance, des cytokines en plus des signaux intracellulaires et déclenchent diverses réponses cellulaires cruciales pour développement. Tirée de Lipton and Sahin (2014).

a. Régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance sont capables d'influencer la voie de signalisation mTORC1. Dans le cerveau particulièrement, on retrouve divers facteurs tels que le BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), l'insuline, l'IGF1 (*Insuline-like growth factor 1*), le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), le glutamate ainsi que les molécules de guidage [2].

Ces facteurs de croissance, en particulier l'insuline et l'IGF ainsi que l'EGF représentent les signaux activateurs de mTORC1 dont les mécanismes d'actions sont bien connus. Mentionnons que tous ces facteurs de croissance signalent à mTORC1 majoritairement par l'intermédiaire de l'axe Tsc [2, 5]. Lorsque les nutriments sont disponibles, les facteurs de croissance tels que l'insuline et l'IGF-1 sont abondants et promeuvent les processus anaboliques de la cellule par mTORC1. Quand l'insuline se lie à son récepteur tyrosine kinase IRS1 (*Insulin substrate receptor 1*), ce dernier est recruté à la membrane plasmique et active PI3K, ce qui produit le phosphoinositol (3, 4, 5)-triphosphate (PIP3) et recrute AKt à la membrane pour une activation complète. Une fois recrutée, la voie AKt à son tour phosphoryle et inactive Tsc2 [8]. La voie Akt peut également signaler à la voie mTORC1 de manière Tsc1/2-indépendante en phosphorylant et provoquant la dissociation de Raptor d'avec PRAS40 [9]. Cependant, le processus par lequel la phosphorylation de Tsc2 mènerait à son inactivation demeure mal compris. Les facteurs de croissance activent également la voie mTORC1 au travers des effecteurs de la voie de signalisation Ras tels qu'ERK1/2 (« *Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2*») et la kinase 1 p90 ribosomale S6. À l'opposé, une diminution de facteurs de croissance aboutit à une répression de l'activité de mTORC1, ce qui mène à une

consommation faible d'énergie et de nutriments, favorisant ainsi une augmentation de la durée de vie de l'organisme [8].

D'un autre côté, l'hyperactivation de facteurs de croissance ou la perte de Tsc1 ou Tsc2 conduit à une activation inappropriée de mTORC1, provoquant diverses pathologies incluant le cancer, l'hypertrophie cardiaque ainsi qu'une dysfonction neuronale. Les facteurs de croissance peuvent également activer mTORC1 de façon Tsc-indépendante par l'intermédiaire de l'accumulation (de façon dépendante de la phospholipase-D) de l'acide phosphatidique qui se lie directement au domaine FRB de mTORC1 activant la signalisation en aval. Néanmoins, seul, l'acide phosphatidique n'est pas suffisant pour activer mTORC1, de plus il serait impossible d'affirmer avec certitude que le processus est réellement indépendant de Tsc dû à un manque de données sur le sujet [8-10, 12].

Au-delà des facteurs de croissance susmentionnés, mTORC1 peut également être activé par d'autres signaux promouvant la croissance à l'instar des cytokines pro-inflammatoires (exemple de la cytokine TNF- α (*Tumor necrosis factor α*)), ceci par un mécanisme conceptuellement similaire à celui décrit plus haut. De plus, la voie de signalisation canonique Wnt, qui est très importante pour la croissance cellulaire, la prolifération, la polarité, la différenciation ainsi que le développement, active également la voie mTORC1 au-travers de la régulation de Tsc1/2. Wnt inhibe le « *glycogen synthase kinase 3b* » (GSK3-b) qui en situation normale phosphoryle et provoque l'activation de Tsc2. En d'autres termes, lorsque la voie Wnt est activée, l'activation de Tsc2 dépendante de GSK3-b et de l'AMPK est abolie, résultant en une activation de mTORC1 [4, 9, 10, 12].

En conclusion, il est important de noter ici que le complexe Tsc1/2 intègre divers signaux de croissance aussi bien positifs que négatifs et ajuste l'activité de mTORC1 en accord avec le signal reçu [4].

b. Régulation de mTORC1 par les niveaux d'énergie et d'oxygène

La protéine mTOR répond également aux stress intracellulaires et environnementaux qui sont incompatibles avec la croissance. Ces conditions non favorables qui produisent un stress cellulaire telles qu'une privation de nutriments, l'hypoxie, l'ischémie, etc. diminuent les réserves d'énergie de la cellule.

Tout comme les signaux provenant des facteurs de croissance, mTORC1 peut également détecter le niveau d'énergie disponible dans la cellule. Plus spécifiquement, mTORC1 est activé lorsque le niveau d'énergie à l'intérieur de la cellule est élevé, en revanche, lorsque ce niveau est réduit, mTORC1 devient inactivé. Dans la cellule, l'AMPK constitue le senseur énergétique, son rôle étant de détecter le niveau d'énergie disponible et de relayer cette information à mTORC1 par l'intermédiaire de Tsc1/2. Un stress énergétique (découlant par exemple d'une privation de glucose) entraîne l'activation de l'AMPK par l'intermédiaire d'une augmentation du ratio AMP/ATP (Adénosine 5'-monophosphate/adénosine 5'-triphosphate). Activé, l'AMPK peut inhiber mTORC1 indirectement en phosphorylant Tsc2, ce qui augmente l'affinité de ce dernier avec le Rheb-GDP et active Tsc2, ou soit de façon directe en phosphorylant Raptor. Il est important de souligner ici que même dans des cellules dépourvues d'AMPK, une privation de glucose résulte également en une inhibition de mTORC1 grâce à l'inhibition des Rag GTPases. Cela suggère que mTORC1 détecte la disponibilité du glucose par plus d'un mécanisme [9, 10, 12-14].

De façon similaire, l'hypoxie (faible niveau d'oxygène) inhibe mTORC1 en provoquant l'activation du complexe Tsc par l'AMPK mais également par une inhibition et inactivation de Raptor. Par ailleurs, l'hypoxie induit également une activation de REDD1 (*Regulated in development and DNA damage response 1*), ce qui empêche l'interaction entre Tsc2 et les protéines 14-3-3 permettant l'inhibition de mTORC1 par Tsc1/2. Néanmoins, une interaction directe entre REDD1 et les protéines 14-3-3 demeurent un sujet à discussion [8].

c-Régulation de mTORC1 par les acides aminés

Une diminution de la disponibilité des acides aminés prive les cellules des substrats dont elles ont besoin pour la synthèse protéique, le déroulement du cycle de Krebs ainsi que d'autres processus métaboliques. De faibles niveaux en acides aminés provoquent l'inhibition de mTORC1 [10]. Les acides aminés, plus particulièrement la leucine active fortement mTORC1 [15].

L'évidence d'une régulation plus ou moins directe de mTORC1 par les acides aminés dans les cellules des mammifères provient de la découverte qu'un retrait pendant une à deux heures des acides aminés du milieu de culture résultait en une inhibition sélective de S6K1 et une déphosphorylation de 4EBP, rendant ces cibles de mTORC1 résistantes (non-répondantes) à l'insuline. Un rajout d'acides aminés, restauration du niveau basal, restaure l'activité de 4EBP et la phosphorylation de S6K1, tout en les rendant réactifs à l'insuline [8, 16]. Néanmoins, la signalisation des acides aminés à mTORC1 est encore très peu comprise, mais la lumière a commencé à se faire sur l'implication de quelques acteurs clés. Une étape essentielle semble être l'induction par les acides aminés du recrutement de mTORC1 aux membranes des lysosomes où ce dernier peut interagir avec un bassin de Rheb localisé dans ces compartiments [10]. À date, les Rag GTPases qui constituent le complexe *Ragulator* ainsi que les v-ATPases représentent les liens les mieux caractérisés entre les acides aminés et mTORC1 [5]. Cette activation de mTORC1 par les acides aminés semble être indépendante de Tsc car une signalisation des acides aminés à mTORC1 est présente même dans les cellules dépourvues de Tsc2 [17].

Outre tous ces facteurs précités, divers autres tels les stress génotoxiques résultant des dommages à l'ADN ainsi que l'acide phosphatidique peuvent également influencer l'activation de mTORC1.

d. Régulation de mTORC1 par l'activité neuronale

Un des facteurs clés dans le découpage des territoires synaptiques neuronaux dans le cerveau en développement est l'activité neuronale. Grâce à des décennies d'études, le rôle crucial de l'activité neuronale dans la transformation de circuits immatures en connexions bien organisées nécessaires au bon fonctionnement du cerveau a été établi [18]. En effet, le rôle essentiel de l'activité neuronale dans l'établissement du champ d'innervation des neurones a été extensivement étudié notamment dans le système visuel, à la jonction neuromusculaire ainsi que dans le cervelet [19-21]. Du nombre des médiateurs clés de l'activité neuronale, on retrouve les neurotransmetteurs qui, au-delà de leur rôle initial de transmission des informations entre les synapses, sont également impliqués dans la morphogenèse synaptique ainsi que leur raffinement [18].

Les changements activité-dépendante dans la force des connexions synaptiques sont fondamentales dans la formation et le maintien de la mémoire. L'efficacité de ces changements à l'instar de la potentialisation et de la dépression à long terme dans l'hippocampe dépendent grandement de la synthèse protéique découlant de la traduction de l'ARNm dans les divers compartiments neuronaux [22]. En d'autres mots, l'activité neuronale entraîne un changement dans le programme d'expression de gènes au travers de la régulation de la transcription et de la traduction. La voie de signalisation mTORC1 se trouve au cœur de la régulation de la traduction découlant de l'activation neuronale [23].

mTORC1 régule le rythme de traduction par l'intermédiaire de la phosphorylation de ses principales cibles en aval telles que les protéines 4E-BPs (4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3) ainsi que les kinases p70 S6Ks (S6K1 et S6K2). Rappelons brièvement ici que la phosphorylation des 4E-BPs provoque la dissociation de ces derniers d'avec eIF-4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) permettant la constitution du complexe eIF-4F, ce qui initie la traduction. Parallèlement à ce mécanisme, la phosphorylation des S6Ks par

mTORC1 régule également l'initiation et l'élongation de la traduction ainsi que la biogenèse des ribosomes en phosphorylant respectivement eIF-4B (un cofacteur de eIF-4A), le facteur d'élongation eEF-2K (*eukaryotic elongation factor 2 Kinase*) et la protéine ribosomale S6 [22, 23].

Par ailleurs, la modulation de l'activité synaptique s'est avérée être une bonne piste thérapeutique dans le traitement des maladies découlant d'une mutation de la voie mTORC1. Plus succinctement, il a été proposé que le ciblage de la synthèse protéique activité-dépendante constituerait une bonne stratégie thérapeutique sur la base des études ayant démontré l'efficacité des récepteurs métabotropiques du groupe I à l'instar de mGluR1 et mGluR5 dans l'amélioration de certains symptômes [24].

D'un autre côté, une hyperactivation de mTOR est souvent associée à une augmentation de la transmission synaptique et de la plasticité [25].

1.1.1.3. Mécanismes d'action de mTORC1

Dans le but de croître et se diviser, les cellules doivent augmenter leur production de protéines, de lipides ainsi que de nucléotides et doivent dans ce même temps procéder à la suppression des voies de signalisation cataboliques telles que l'autophagie. La voie mTORC1 joue un rôle central dans la régulation de tous ces processus, elle sert ainsi à équilibrer la balance entre l'anabolisme et le catabolisme en réponse aux stimuli environnementaux. De ce fait, mTORC1 régule en aval une panoplie de processus biologiques incluant la synthèse protéique, la synthèse lipidique, la synthèse du cholestérol, le métabolisme mitochondrial aussi bien que l'autophagie par une variété de mécanismes de transcription, de traduction et de post-traduction. La voie mTORC1 stimule l'augmentation de ces processus biosynthétiques, qui sinon, sont maintenus à un niveau basal, c'est-à-dire homéostatique. Par souci de concision, cette section va se limiter en la description de quelques-uns de ces processus à l'instar de la

synthèse des protéines, de la synthèse lipidique et de l'autophagie (mécanismes biologiques importants pour la croissance des cellules aussi bien que le développement des synapses) (Figure 4).

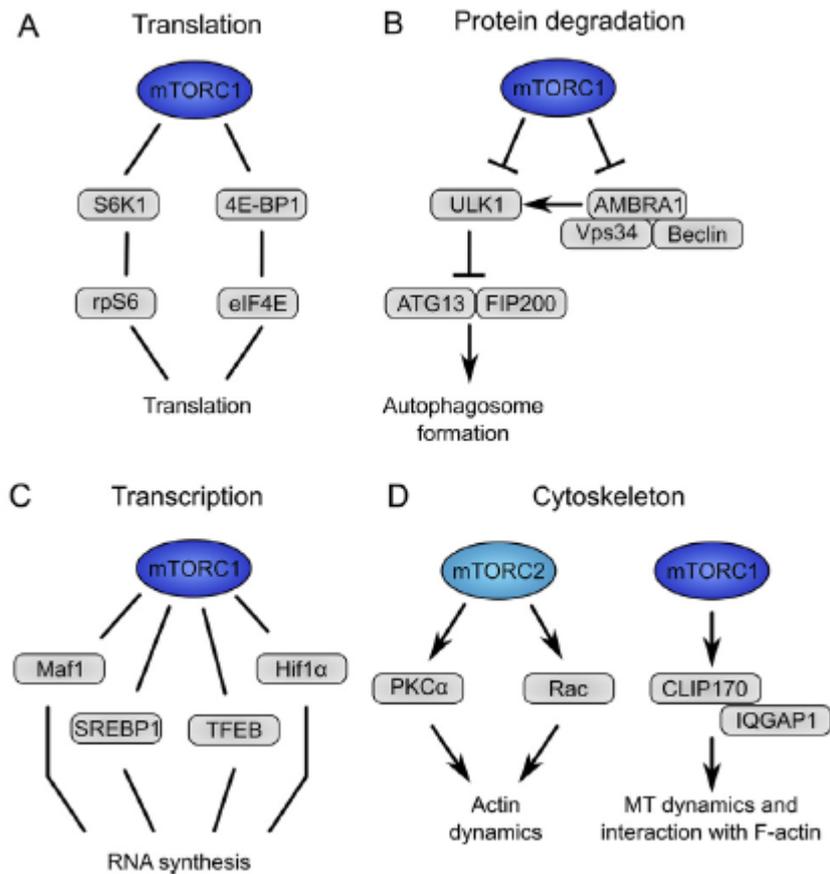


Figure 4: Les cibles de mTOR et ses mécanismes d'action cellulaires. En se liant à des cibles spécifiques, mTOR remplit diverses fonctions telles que la traduction de l'ARN (A), la dégradation des protéines (B), la transcription de l'ADN (C), les mouvements du cytosquelette et le transport des organelles (D). Tirée de Switon et al. (2017).

a. La synthèse des protéines

Le processus anabolique le mieux identifié qui est régulé par mTORC1 est la synthèse protéique. Les protéines représentent approximativement 50% de la biomasse des cellules, leur synthèse est énergivore, par conséquent très hautement régulée. L'activation de mTORC1

lorsque la présence des nutriments et des réserves d'énergie est optimale dans la cellule favorise la synthèse protéique [26, 27]. Les protéines ribosomiques p70S6K et 4EBP représentent les cibles principales de mTORC1 pouvant être phosphorylées au niveau de plusieurs sites de phosphorylation (p70S6K au niveau de la thréonine 389 ; 4EBP à divers sites de phosphorylation), favorisant une traduction d'ARNm, dépendante de la coiffe 5' [26].

mTORC1 phosphoryle directement 4EBP1 et 2 (qui sont des protéines se liant aux facteurs d'initiation de la traduction chez les eucaryotes), ce qui provoque la dissociation de 4EBP de son lien inhibiteur d'avec l'eIF4E à la coiffe 5' des ARNms. Cette dissociation d'avec l'eIF4E favorise une liaison avec les eIF4G et eIF4A (facteurs d'initiation 4G et 4A respectivement) pour former le complexe actif d'initiation de la traduction (eIF4F). Bien que mTORC1 puisse influencer la synthèse protéique globale, il contrôle plus précisément la traduction d'un sous-groupe d'ARNms possédant des séquences *5'-terminal oligopyrimidine* (5'-TOP). Des études récentes ont confirmé que la traduction des ARNms contenant des 5'-TOP ainsi que d'autres séquences similaires aux TOP est très sensible aux inhibiteurs de mTOR. La régulation sélective de la traduction des ARNms 5'-TOP par mTORC1 dépendrait de sa capacité à réguler les 4EBPs. Cependant, le mécanisme moléculaire sous-tendant cette sélectivité est pour le moment mal connu [27]. Par ailleurs, mTORC1 influence la machinerie de la synthèse protéique de diverses autres façons [9]. Dans un premier temps, il active la protéine TRIM24 (*Tripartite Motif Containing 24*), ce qui conduit à l'interaction de cette dernière avec l'ARN Polymerase I (Pol I) et à l'expression de l'ARN ribosomal (ARNr). Également, mTORC1 phosphoryle et inhibe la protéine Maf1, un répresseur de Pol III, ce qui induit la transcription de l'ARNr 5S et de l'ARN de transfert (ARNt). Globalement, le rôle de mTORC1 dans la régulation de la traduction d'ARN est très important car l'inhibition complète de mTORC1 (par l'intermédiaire d'une inhibition de ses sites actifs) résulte en une réduction significative du niveau de synthèse protéique dans les cellules en prolifération, en cultures [9].

L'augmentation de la biogenèse des ribosomes est l'une des fonctions majeures de mTORC1. Ainsi, les protéines kinases ribosomiques S6 à savoir S6K1 (constituées des isoformes p70 et p85) et S6K2 représentent également des cibles directes de mTORC1 qui, au travers de divers substrats, régulent différents aspects de la traduction d'ARNm [27]. Des études précédentes ont suggéré que l'activation de S6K1 régulerait la synthèse protéique par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine S6 de la sous-unité ribosomique 40S. Cette phosphorylation était supposée augmenter l'efficacité de la traduction des ARNms 5'-TOP. Néanmoins, ce modèle a été remis en question par des études récentes qui ont montrées que ni l'activité de S6K1, ni la phosphorylation de S6 n'étaient indispensables à la traduction des ARNms TOP [14]. Les nouvelles données montrent que S6K provoque l'activité de l'hélicase d'ARN d'eIF4A dans le complexe eIF4 par la phosphorylation et le recrutement de son partenaire de liaison eIF4B, ceci, par l'intermédiaire d'eIF3, mais aussi par la phosphorylation de la protéine PDCD4 (*Programmed Cell Death 4*), cette dernière ayant pour rôle de cibler l'eIF4A pour dégradation. Par ailleurs, S6K phosphoryle et inhibe également la kinase eEF2K du facteur d'élongation eucaryotique (eEF2), entraînant un arrêt de l'inhibition d'eEF2 par eEF2K, ce qui favorise l'élongation de la traduction. Finalement, S6K1 influence la maturation d'ARNm en phosphorylant et régulant les composés de la machinerie d'épissage [10, 14, 27].

b. La synthèse des lipides

La stimulation de la croissance cellulaire, aussi bien que la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses, est souvent accompagnée par une augmentation de la synthèse lipidique afin de subvenir à l'augmentation de la demande lipidique requise pour la biogenèse des membranes des organelles et plasmiques [27]. mTORC1 promeut la synthèse lipidique au travers des facteurs de transcription SREBP (*sterol responsive element binding protein*) qui contrôlent l'expression de gènes métaboliques impliqués dans la biosynthèse des acides gras et

du cholestérol [12]. mTORC1 semble jouer un rôle clé dans le relai des facteurs de croissance et des signaux oncogéniques aux régulateurs en aval de la synthèse lipidique. Les SREBPs (SREBP1a, 1c et 2) constituent une famille de facteurs de transcription dont le rôle est d'induire directement l'expression de gènes qui codent pour les enzymes lipogéniques majeures impliquées dans la synthèse des acides gras et des stérols [27]. mTORC1 augmente l'activité de SREBP-1 en entraînant sa régulation post-traductionnelle au travers de S6K1, ce qui à son tour conduit à une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse du stérol et du bras oxydatif de la voie des pentoses phosphates. En effet, une inhibition de mTORC1 avec la rapamycine bloque l'expression des gènes cibles de SREBP. La médiation de l'augmentation de l'activité de SREBP-1 par mTORC1 est requise pour la lipogenèse induite par la voie de signalisation Akt [10]. Dans son état inactif, SREBP-1 est localisé au niveau du réticulum endoplasmique et en réponse à un faible taux de stérol, d'insuline ou à une présence d'acides gras saturés, il est transporté à l'appareil de Golgi. Une fois activé, SREBP-1 est déplacé au noyau où il se lie aux promoteurs de gènes contenant les éléments régulateurs du stérol et les séquences de l'« *Enhancer Box* ».

À ce propos, les souris transgéniques ayant des mutations dans les protéines ribosomiques S6K1 ou 4EBPs développent de sévères troubles métaboliques. Les souris S6K1-*null* sont hypo-insulinémiques mais hyper-sensibles à la signalisation de l'insuline. Ces souris sont incapables d'accumuler de la graisse due à une augmentation de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux. À l'opposé, les souris 4EBP1 et 4EBP2 déficientes présentent un phénotype contraire à celui des souris S6K1-*null* [8].

Par ailleurs, mTORC1 peut également activer SREBP de façon indépendante de S6K1, ce processus se fait au travers de la phosphorylation d'un substrat additionnel, notamment la Lipin-1 qui inhibe SREBP en l'absence d'une activation de mTORC1 [12]. En phosphorylant la Lipin-1, mTORC1 empêche cette dernière d'entrer dans le noyau et de supprimer la fonction

ainsi que le niveau d'expression de SREBP1/2. De plus, il a été montré que mTORC1 promeut l'expression et l'activité du PPAR-g (*peroxisome proliferator-activated receptor g*) qui est le régulateur principal de l'adipogenèse [9].

L'importance du couplage d'une augmentation de la synthèse protéique à celle d'une synthèse lipidique avec une expansion de la membrane sous l'influence de mTORC1 a été très bien illustrée par des études démontrant qu'une perturbation de la synthèse lipidique dans le cadre de l'activation de mTORC1 peut mener à un stress du réticulum endoplasmique. En d'autres termes, l'activation de mTORC1 conduit à une coordination étroite de divers mécanismes en aval de la voie, conduisant à une biosynthèse de trois classes majeures de macromolécules à savoir les protéines, les nucléotides et les lipides [27].

Dans une perspective de prolifération et de croissance cellulaires et au-delà de la synthèse lipidique, il a été récemment montré que l'activation de mTORC1 augmente également la synthèse des nucléotides requises pour la réplication de l'ADN et pour la biogenèse des ribosomes [27]. De plus, mTORC1 représente un important régulateur du nombre et de la fonction des mitochondries [10, 28]. Par ailleurs, mTORC1 facilite la croissance en transformant le métabolisme du glucose, d'une phosphorylation oxydative à une glycolyse, ce qui facilite l'incorporation des nutriments dans la nouvelle biomasse [12].

c. Régulation de l'autophagie par mTORC1

Dans des conditions de baisse de nutriments, les cellules peuvent procéder à une dégradation des contenus cytoplasmiques par un mécanisme appelé « autophagie ». Au cours de l'autophagie, les macromolécules sont recyclées à l'intérieur d'une vacuole appelée autophagosome qui par la suite va se fusionner aux lysosomes pour la dégradation de leurs constituants. Ceci constitue un moyen de survie pour les organismes. mTORC1 régule de façon

négative l'induction de ce processus catabolique en bloquant partiellement le recyclage des acides aminés ainsi que des transporteurs de glucose. En d'autres termes, lorsque mTORC1 est inactif, l'autophagie se met en place, à l'opposé, elle est inhibée par une activation de mTORC1 [27, 29]. De fait, en tant que centre de détection de la disponibilité des nutriments, un stress provenant d'une baisse ou absence de nutriments conduit à une activation de l'AMPK et à l'inactivation de mTORC1. Directement en aval de mTORC1 se localisent diverses protéines qui sont requises pour l'exécution du programme autophagique, de ce nombre se trouve la kinase sérine/thréonine ATG1/ULK1 (*Autophagy-related protein 1/Unc-51 like autophagy activating kinase*) qui joue un rôle clé dans la formation du pré-autophagosome [10] (**Figure 4**). Les signaux AMPK et mTORC1 convergent, phosphorylent et régulent la kinase ULK1. ULK1 (ou l'autre proche membre de sa famille à savoir ULK2) représente le composé central du complexe autophagique régulé par ULK1/2. Ce complexe inclut des facteurs additionnels tels que l'ATG13 (*autophagy-related protein 13*), l'ATG101 (*autophagy-related protein 101*) et FIP200/ RB1CC1 (*Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa/RB1-inducible coiled-coil protein 1*). Une fois activé, le complexe ULK1/2 entraîne l'initiation de la formation de l'autophagosome, ce qui conduit à une augmentation du niveau d'autophagie. Ainsi, le complexe AMPK-mTORC1-ULK1/2 représente un point de contrôle critique, en aval de la cascade d'autophagie, et constitue une cible clé dans le développement des stratégies de manipulation de cette dernière dans les contextes biomédicaux [30]. L'inhibition de l'autophagie par mTORC1 requière divers mécanismes. La première étape est la phosphorylation d'ULK1/2 et de l'ATG13, ce qui conduit à une dissociation et inactivation du complexe pro-autophagie (constitué de ULK1/2, ATG13, ATG101 et FIP200/RB1CC1). Par la suite, mTORC1 phosphoryle ATG14 (*autophagy-related protein 14*) et UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene product*), ce qui inactive le complexe PI3CIII (*phosphatidylinositol 3-kinase class III*) durant les phases d'initiation et de maturation de

formation des autophagosomes. En revanche, l'activation d'ULK et de PI3KCIII dépend de leur phosphorylation par l'AMPK [26, 27].

En plus d'inhiber l'autophagie, mTORC1 régule aussi négativement la biogenèse des lysosomes qui sont des organelles multifonctionnelles possédant la capacité de dégrader la plupart des composants de la cellule. Un dernier mécanisme a été mis en évidence par une étude récente qui a indiqué que la régulation des lysosomes par mTORC1 se fait au travers du facteur de transcription TFEB (*transcription factor EB*), le TFEB est impliqué dans le contrôle de plusieurs gènes ayant des rôles clés dans la fonction lysosomale [26, 27]. Le mécanisme exact par lequel mTORC1 régulerait TFEB est encore mal connu et surtout est sujet à controverse. Une possibilité serait qu'en phosphorylant TFEB, mTORC1 empêche celui-ci de se déplacer au noyau, ce qui inhibe la traduction de plusieurs ATGs et autres protéines lysosomales [26]. Quel qu'en soit le cas, un consensus du domaine est que mTORC1 représente un régulateur important d'adaptation des lysosomes en conditions de privation en nutriments [9].

À l'opposé de mTORC1, la littérature portant sur mTORC2 est très peu étayée, très peu de choses sont connues sur la fonction de ses constituants, les signaux en amont qu'il doit intégrer ainsi que ses cibles moléculaires. Ceci découle principalement du fait que la délétion des protéines constituant mTORC2 conduit à la létalité des embryons, ce qui met au défi l'étude de cette voie, ajouté au fait qu'il n'existe aucun inhibiteur spécifique de mTORC2 [8]. Tel que mentionné précédemment, le complexe rapamycine-FKBP12 possède la capacité d'inhiber directement mTORC1 tandis que le complexe mTORC2 est caractérisé par sa relative insensibilité à un traitement à la rapamycine (spécialement en traitement aigu). Néanmoins, son application chronique peut inhiber indirectement mTORC2 en empêchant l'assemblage de toutes les sous-unités du complexe. Une autre particularité intéressante de mTORC2 à relever est qu'à l'opposé de mTORC1 qui est inhibé par le complexe Tsc1/2, ce dernier active

mTORC2 [5]. Somme toute, bien que moins compris que mTORC1, il n'en demeure pas néanmoins clair que mTORC2 est tout aussi important dans le fonctionnement de l'organisme en général et tout autant dans le développement et fonctionnement du système nerveux central (SNC) (voir **Figure 3**).

La complexité de sa structure protéique ainsi que l'importance des informations qu'elle doit intégrer laissent penser que la voie mTOR joue un rôle central dans le développement, la maturation et la connectivité des cellules hautement énergivores et à morphologie complexe à l'instar de celles du SNC. Comme nous le verrons ci-dessous, de multiples preuves scientifiques démontrent que mTOR joue un rôle clé dans le fonctionnement des cellules quiescentes au nombre desquelles se trouvent les neurones [31].

1.1.2. Rôles physiologiques de la voie mTOR dans le cerveau

L'on dit de mTOR qu'il « régule tout », et bien que ceci ne soit pas vrai, il serait judicieux de resouligner le grand nombre de processus majeurs nécessaires au développement et homéostasie de l'organisme que cette voie contrôle. Ceci n'est pas tout à fait surprenant considérant le fait que mTOR représente l'un des senseurs clés du statut nutritionnel de la cellule et de l'organisme [9]. La voie de signalisation mTOR joue par ailleurs un rôle important dans le développement ainsi que le vieillissement du SNC. mTOR est au cœur de la régulation du développement neuronal, de l'architecture corticale, de la morphologie neuronale, la formation des circuits neuronaux, la plasticité synaptique ainsi que la neurodégénérescence. Il n'est donc pas étonnant que la perturbation de la voie mTOR soit la cause de divers déficits dans les processus neurodéveloppementaux [32].

1.1.2.1. Implication de mTOR dans le développement neuronal

Plusieurs études ont démontré l'importance de mTOR au cours du développement du SNC. L'une d'entre elles a montré que les souris ayant une mutation dans mTOR, plus spécifiquement les mutantes « *flat-top* » étaient dépourvues de télencéphale. Le phénotype découlait d'un manque d'augmentation de la prolifération cellulaire dans le télencéphale ainsi qu'une inhabileté de maintien de l'expression de gènes dans le neuroectoderme du cerveau antérieur. De plus, ces souris mutantes mouraient à l'âge embryonnaire 12.5. De façon intéressante, un traitement à la rapamycine des femelles gestantes (5.5 jours de gestation) résultait en un phénotype identique à celui des mutantes décrites plus haut, révélant l'activité tératogène de la rapamycine. Tout ceci démontre le rôle critique de mTOR dans le développement du cerveau au cours de l'embryogenèse [2, 33]. Une perte de fonction de mTOR au cours du développement embryonnaire conduit à une diminution catastrophique des premières cellules progénitrices nécessaires au développement du cerveau. À l'opposé, une suractivation de mTOR provoque une baisse rapide des niches des cellules souches [34].

Ulérieurement, il a été généré des souris transgéniques exprimant une mutation gain-de-fonction de mTOR dans le cerveau antérieur (prosencephale), expression contrôlée de manière temporelle. L'étude de ces souris a révélé que mTORC1 joue des rôles bien distincts au cours du développement et à l'âge adulte. De fait, l'activation sélective de mTORC1 aux stades embryonnaires induit une atrophie corticale causée par une apoptose préminente des progéniteurs neuronaux, associée à une hyper-régulation du facteur de transcription HIF-1a (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*). À l'inverse, une activation de mTORC1 chez l'adulte conduit à une hypertrophie corticale suivie de sévères crises épileptiques. Cette activation chez l'adulte provoque également une rapide accumulation des inclusions cytoplasmiques et une activation des microglies, indiquant une neurodégénérescence progressive [31].

Au-delà de son implication dans la cyto-architecture globale du cerveau, mTOR est également important dans la formation des processus axonaux et dendritiques des neurones. Une augmentation de la signalisation mTOR provoquée par la perte du complexe Tsc1/2 ou PTEN (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) induit de profonds changements dans l'architecture neuronale et sa différenciation [2]. La diminution de l'expression de PTEN dans des populations neuronales différenciées dans le cortex cérébral et l'hippocampe de souris résulte en une macrocéphalie et une hypertrophie neuronale, incluant des dendrites et axones hypertrophiés et ectopiques avec une augmentation du nombre de synapses. Cette morphologie anormale était associée à l'activation de la voie AKt/mTOR/S6K et une inactivation de Gsk3b [35]. Ces observations corroborent une observation précédente selon laquelle une inactivation de *Tsc1* ou *Tsc2* dans des neurones pyramidaux de l'hippocampe de souris ou des rats induit une augmentation de la taille des somas et des épines dendritiques, accompagnée d'une altération des propriétés des synapses glutamatergiques. De plus, la perte d'une seule copie de *Tsc1* est suffisante pour perturber la structure des épines dendritiques. Ces changements morphologiques requièrent la régulation du facteur de dépolymérisation d'actine, la cofiline. Ainsi, Tsc1/2 régule la croissance et la fonction des synapses dans les neurones [36]. Par ailleurs, Tsc1 et Tsc2 remplissent des fonctions critiques dans la formation et la croissance des axones. Une surexpression de *Tsc1/2* supprime la formation des axones, alors qu'une absence de *Tsc1/2* induit une formation ectopique des axones des neurones en cultures [37]. Chez des souris mutantes *Tsc1*, les neurones corticaux, ceux de l'hippocampe ainsi que les astrocytes ont de plus grands somas et/ou sont dysplastiques, expriment fortement la phospho-S6 (associée à une surexpression de mTOR), et sont ectopiques [38, 39].

Dans le but de disséquer le rôle distinct de mTORC1 et mTORC2 dans le développement du cerveau, diverses études ont utilisé, respectivement, des souris Raptor et Rictor « *Knock-out* » [2]. L'inactivation de mTORC1 dans les souris s'est faite par la délétion

du gène codant pour Raptor dans les progéniteurs du SNC en développement. Les embryons arrivent à terme mais meurent quelques heures après leur naissance car elles ne peuvent pas se nourrir. Leurs cerveaux montrent une microcéphalie, débutant autour de l'âge embryonnaire E17.5, ce qui est une conséquence d'une réduction du nombre et de la taille des cellules. Des changements dans la longueur du cycle cellulaire durant la dernière phase de développement du cortex ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire sont à la base de cette réduction du nombre de cellules [40]. Une délétion de Rictor conduit à une inactivation de mTORC2 et il en résulte des neurones plus petits. Leur morphologie ainsi que leurs fonctions sont également très affectées. Les phénotypes étaient accompagnés par une inactivation d'AKt, PKC et SGK1 [41]. Malgré la similarité des phénotypes, la relation biochimique entre mTORC1 et mTORC2 dans le cerveau reste mal connu [2].

De plus, mTOR a été impliqué dans l'oligodendrogenèse et la myélinisation. Afin d'établir si l'impact de mTOR sur la myélinisation du SNC serait le résultat de fonctions spécifiques de mTORC1 ou mTORC2, Raptor et Rictor ont été supprimés dans les oligodendrocytes *in vivo*. Il a ainsi été montré que Raptor, de ce fait mTORC1, est un régulateur positif de la myélinisation au cours du développement du SNC, tandis que l'ablation de Rictor, de fait mTORC2, a un modeste effet positif sur la différenciation des oligodendrocytes et un tout petit effet sur la myélinisation. Par ailleurs, la perte de Raptor induit une démyélinisation dans certaines régions spécifiques du SNC, le plus grand impact se situant au niveau de la myélinisation de la moelle épinière. L'effet le plus prééminent sur la différenciation des oligodendrocytes était observé chez les animaux Raptor/Rictor double KO. Cela étant, bien que la régulation de la myélinisation par la signalisation mTOR soit dominée par mTORC1, il existe un effet synergétique de mTORC2 dans le développement de ces cellules critiques. De façon globale, ces études ont montré que mTOR est nécessaire à une bonne différenciation des oligodendrocytes et à la myélinisation dans la moelle épinière. Plus spécifiquement, la mutation

de la voie aboutissait à une réduction du nombre d'oligodendrocytes matures et un déficit dans l'initiation et le prolongement de la myéline durant le développement de la moelle épinière [2, 42, 43].

1.1.2.2. Implication de mTOR dans la formation des circuits neuronaux

Une perturbation de la voie mTOR affecte également la formation des circuits neuronaux [32]. Les modèles expérimentaux avec une signalisation mTOR défectueuse fournissent l'évidence d'un rôle prédominant de mTOR dans la formation de circuits neuronaux fonctionnels [2].

L'établissement des circuits neuronaux requiert une coordination précise entre l'extension des axones et les signaux de guidage axonal de l'environnement. L'une des projections axonales la mieux caractérisée dans le SNC est la projection des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) de l'œil à leurs cibles dans le cerveau. Plusieurs protéines telles que les neurotrophines, les sémaphorines, les slits et les éphrines régulent le guidage axonal de la rétine ainsi que la cartographie topographique dans des régions cibles. Une étude a identifié le rôle de Tsc1/2 dans le guidage axonal en utilisant comme modèle expérimental des souris Tsc2 hétérozygotes (Tsc2^{+/-}). Cette étude a rapporté que divers constituants de la voie mTOR étaient fortement exprimés dans les axones CGR en développement. Ce phénotype a été corroboré par les données *in vitro* qui ont montré que les CGR Tsc2^{+/-} étaient moins sensibles aux effets répulsifs de l'éphrine-A. Cette étude a mis en lumière un nouveau modèle de régulation de mTOR par les molécules présentes à la surface des cellules, à l'instar des récepteurs tyrosine kinases et révèle l'un des mécanismes par lequel le récepteur EphA contrôle l'activité de mTOR, cette dernière étant nécessaire aux dynamiques des cônes de croissance [44]. En outre, d'autres types d'interactions cellulaires peuvent également moduler la signalisation mTOR. À titre d'exemple, il a été montré que les protéines de la classe des MHCI

(*Major histocompatibility complex I*) peuvent inhiber la densité synaptique des neurones de l'hippocampe en régulant négativement la signalisation du récepteur de l'insuline. Ceci révèle la possibilité de connexions entre le système immunitaire et l'activité de mTOR qui influencent le développement des circuits neuronaux [2, 45].

Dans les neurones, la synthèse protéique locale dans les synapses (qui sont éloignées du soma) est régulée par mTOR et est un processus très critique pour la formation des circuits neuronaux [32]. La traduction locale de l'ARNm est conjointe aux signaux extracellulaires, permettant aux cônes de croissance de répondre efficacement aux nouveaux signaux avec une adaptabilité exquise ainsi qu'un contrôle spatio-temporel [46]. L'identification des ARNs axonaux régulés par mTOR mettrait en lumière les mécanismes impliqués dans la biologie axonale et la synaptogenèse [2].

La traduction protéique locale activité-dépendante dans les synapses ou proche de ces dernières est un requis *sine qua non* dans la formation et la maintenance des synapses [2]. L'activation de mTOR a été fonctionnellement liée à la synthèse protéique dans les synapses, induisant la production des protéines requises pour la formation, la maturation et la fonction de nouvelles épines synaptiques. Il a été montré que ce phénomène, c'est-à-dire la formation de synapses mTOR-dépendante, sous-tendait les rapides effets antidépresseurs des antagonistes de NMDA (N-méthyl-D-aspartate) telle que la kétamine. Il a été observé que la kétamine activait rapidement mTOR, conduisant à une augmentation de la signalisation des protéines synaptiques ainsi qu'une augmentation du nombre et de la fonction de nouvelles épines dendritiques dans le cortex préfrontal du rat. L'activation de mTOR était observée dans des préparations de synaptoneurosomes. L'administration de la kétamine a provoqué l'augmentation des niveaux d'expression de protéines postsynaptiques à savoir la PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) et GluR1 (*glutamate receptor 1*), des protéines présynaptiques telles que la Synapsin I aussi bien que des protéines régulant le cytosquelette

tel qu'Arc (*cytoskeletal-associated protein*). De plus, l'inhibition de mTOR par la rapamycine bloquait complètement l'induction de la synaptogenèse et des améliorations comportementales de la kétamine dans des modèles expérimentaux de dépression en bloquant l'induction de l'expression de PSD95, GluR1 et Synapsin I. Ce processus a permis d'établir la connectivité fonctionnelle entre mTOR et la synthèse des protéines synaptiques [47]. En lien avec la traduction protéique locale dans les dendrites, une étude a mis en évidence que l'inhibition de mTOR induit l'augmentation de l'expression des canaux potassiques Kv1.1 dans les neurones de l'hippocampe et promeut leur expression à la surface des dendrites sans altérer leur expression axonale. De plus, des ARNms de Kv1.1 endogènes ont été détectés dans les dendrites. Ce mécanisme établit donc que l'excitation synaptique conduirait à une suppression locale des canaux potassiques Kv1 dans les dendrites en réduisant leur synthèse locale [48].

Un autre pan de la recherche a mis en avant que les blessures ou préjudices infligés aux processus neuronaux au cours de la lésion de la moelle épinière ou une dénervation entraîne une recrudescence de voies de signalisation pro-anaboliques critiques au cours du développement telles que la voie mTOR [2]. Similaire à la croissance axonale au cours du développement, la régénérescence axonale nécessite l'extension de l'axone guidé par le cône de croissance. Par exemple, les souris adultes ayant une inhibition néonatale de PTEN (soit par délétion génétique ou par utilisation des *shRNA*) dans les neurones corticaux avaient une robuste croissance des faisceaux cortico-spinaux après une lésion, faisceaux qui sont réputés être réfractaires à la régénérescence. De façon similaire, une surexpression des AKt et Rheb constitutivement actives induit la régénérescence des axones des neurones dopaminergiques à leur cible, le striatum. Néanmoins, l'on ignore si la manipulation de la voie PTEN/AKt/mTOR pourrait promouvoir la régénérescence des axones de tous les types cellulaires dans le SNC adulte. Par ailleurs, il a été montré que la capacité des axones à régénérer un nouveau cône de

croissance dépend largement de la synthèse protéique locale et de la machinerie de dégradation dans les axones [49-51].

1.1.2.3. Implication de mTOR dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire

La capacité à modifier la force synaptique est considérée comme essentielle à l'habileté du cerveau à emmagasiner l'information [2]. Ainsi, les synapses neuronales représentent des structures cruciales dans l'emmagasinage des mémoires. Des observations d'un déficit de la formation de la mémoire et de la fonctionnalité des synapses en réponse à un traitement à la rapamycine suggèrent d'un rôle important de la voie mTOR dans la plasticité synaptique [32]. En effet, les évidences ayant permis l'établissement d'une implication de mTOR dans la plasticité synaptique proviennent largement des études de l'effet de la rapamycine sur le phénomène de la facilitation à long terme chez l'aplysie et l'écrevisse [52]. La facilitation à long terme est un processus de renforcement synaptique qui nécessite la traduction de diverses protéines synaptiques ; cette traduction est bloquée à la suite de l'application de la rapamycine [53, 54]. De façon consistante, il a été montré que la potentialisation à long terme (LTP ; *long term potentiation*) était affectée à la suite du traitement des tranches d'hippocampe de rats avec la rapamycine [2]. Rappelons ici que la LTP est constituée de deux phases distinctes à savoir la phase précoce (E-LTP ; *early LTP*) et la phase tardive (L-LTP ; *late LTP*). Plus spécifiquement, il a été montré que la synthèse protéique *de novo* est requise pour la L-LTP et la potentialisation synaptique induite par les neurotrophines. La compromission de la voie mTOR, soit génétiquement ou par un traitement à la rapamycine, provoque une réduction de l'expression de la L-LTP induite normalement par une stimulation à haute fréquence, la E-LTP demeurant in affectée. Aussi, la rapamycine bloque la potentialisation synaptique induite par les facteurs neurotrophiques dans les tranches d'hippocampe. Ces résultats constituent des

preuves du rôle essentiel de mTOR dans l'expression des deux formes de plasticité synaptique nécessitant une synthèse protéique [55]. Il a ainsi été établi que mTOR joue un rôle important dans la régulation de la L-LTP. Dans les souris *Tsc2*^{+/-}, caractérisées par une surexpression de mTOR, on assiste à une diminution du seuil d'induction de la L-LTP, en effet, le paradigme d'induction de la E-LTP était suffisante pour provoquer la L-LTP chez ces souris mutantes. Cette diminution du seuil d'induction pourrait entraîner un faible seuil pour la consolidation de la mémoire, ce qui pourrait aboutir à un stockage inapproprié de l'information, provoquant des déficits de l'apprentissage. Cette étude montre qu'une augmentation de la signalisation mTOR induit une plasticité synaptique défectueuse qui pourrait expliquer des déficits d'apprentissage et de mémoire caractérisant la pathologie monogénique qu'est la sclérose tubéreuse. S'il est bien vrai que le traitement à la rapamycine a permis d'établir le rôle de mTOR dans la plasticité synaptique, à bien d'égards cela ne permet pas de comprendre entièrement l'implication de son partenaire de liaison FKBP2 dans le processus. Contrairement aux souris *Tsc2*^{+/-}, les souris mutantes FKBP12 ne présentaient pas de réduction du seuil d'induction de la L-LTP mais plutôt leur réponse à cette induction, c'est-à-dire leur potentialisation, était exagérée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que FKBP12 régule plus intensément mTORC1 que le complexe Tsc [52, 56]. Des souris mutantes sont également disponibles pour les deux substrats proéminents de mTOR à savoir S6K et 4EBP et ont été utilisées pour comprendre le rôle de mTOR dans la plasticité synaptique et dans le comportement. Il a ainsi été montré que les souris S6K1-KO ont des déficits d'apprentissage et de mémoire et une E-LTP défectueuse alors que de façon surprenante, la L-LTP n'est pas affectée. Contrairement aux souris S6K1-KO, les souris mutantes S6K2 présentaient des déficits de mémoire mais avaient une expression normale des deux formes de LTP. De façon intéressante, l'élimination génétique de 4EBP2 aboutit en une conversion de l'E-LTP en L-LTP dans les collatéraux de *Schaffer*, ce qui pourrait

être le résultat d'une augmentation de la formation du complexe eIF4F avec une augmentation de l'initiation de la traduction protéique [52, 57].

Outre la LTP, la dépression à long terme (LTD ; *long-term depression*) représente une autre forme de plasticité synaptique importante au bon fonctionnement du SNC. mTORC1 a également été impliqué dans la LTD qui est un modèle d'affaiblissement (activité-dépendante) de l'efficacité synaptique [2]. La LTD peut être induite dans la région CA1 de l'hippocampe par l'application pharmacologique de la 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) qui est un agoniste du groupe I du récepteur métabotrope du glutamate. Une étude a montré que le traitement des tranches de l'hippocampe au DHPG provoquait une augmentation PI3K-dépendante de la phosphorylation de PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), AKt et mTOR dans la région CA1 de l'hippocampe. Par ailleurs, cette étude a montré qu'une inhibition de PI3K ou de mTOR entraînait le blocage de la mGluR-LTD induite par la DHPG. L'activation de la signalisation PI3K/Akt/mTOR serait donc requise pour l'induction de la LTD dans le CA1, suggérant du rôle important de mTOR, probablement du fait de son implication dans la machinerie de synthèse protéique, dans le processus de mGluR-LTD [58]. De plus, on assiste à une hausse de la LTD chez les mutants 4EBP2 suite à l'application de DHPG [59]. À l'inverse, l'induction de la LTD par la DHPG a été rapportée être déficiente dans les animaux *Tsc2*^{+/-} alors que la transmission synaptique basale dans le CA1 n'était pas affectée, ce qui indique que l'atténuation de la LTD observée ne serait pas due à une perturbation générale de la fonction des synapses [60]. Quant aux souris S6K1-KO, elles ne présentent aucune anomalie dans la LTD mGluR-dépendante alors que les souris S6K2-KO présentent une augmentation de la LTD.

Par ailleurs, mTORC2 a également émergé comme un important régulateur de la fonction synaptique. mTORC2 a été impliqué dans le contrôle du cytosquelette d'actine dans les cellules non-neuronales, soulevant l'hypothèse qu'il pourrait jouer un rôle similaire dans la

régulation des processus neuronaux [2]. Afin de déterminer l'implication spécifique de mTORC2 dans la régulation des processus neuronaux, une étude a procédé à l'inactivation de mTORC1 et de mTORC2 par transfection de *shRNA* aboutissant à l'abolition de l'expression de Raptor et Rictor, constituants spécifiques de mTORC1 et mTORC2 respectivement. L'absence de Raptor et Rictor conduit à une inhibition de la croissance de l'arborisation dendritique des neurones de l'hippocampe de rats. Ainsi, mTORC1 et mTORC2 influencent conjointement la croissance dendritique, avec la voie AKt-mTORC1 agissant en aval de mTORC2 [61]. De façon plus spécifique, la délétion de Rictor dans le cerveau murin postnatal entraîne une réduction de l'activité de mTORC2 en impactant la mémoire à long terme et la L-LTP sans toutefois affecter la E-LTP. De plus, chez ces animaux, la polymérisation d'actine est réduite. La restauration de la polymérisation de l'actine par la jasplakinolide (composé ayant pour rôle la promotion de la polymérisation de l'actine au travers d'une augmentation du ratio de la F-actine/ G-actine) rétablit la L-LTP et la mémoire à long terme [62]. Une autre preuve à l'avantage de l'implication de mTORC2 dans la plasticité synaptique et la formation de la mémoire provient du fait, tel que mentionné précédemment, qu'un traitement chronique à la rapamycine qui affecte également mTORC2 abolit les déficits phénotypiques observés chez les souris mutantes *Tsc1/2*. Toutes ces études suggèrent donc qu'autant que mTORC1, mTORC2 est également important dans la régulation de la physiologie et du comportement.

En accord avec l'abondance des évidences neurophysiologiques impliquant la signalisation mTOR dans la plasticité synaptique, il a également été montré que cette voie joue de rôles importants dans la cognition [2]. À titre d'exemple, l'investigation des souris *Tsc2+/-* a montré que ces dernières avaient des déficits d'apprentissage et de mémoire. L'inactivation de *Tsc2*, en induisant des déficits dans la LTP, résulte en des déficits de l'apprentissage hippocampe-dépendant tels que les tests de mémoire spatiale et de discrimination contextuelle, déficits qui sont abolis à la suite d'un traitement à la rapamycine [63]. Certains modèles

animaux mTOR-déficients sont caractérisés par une diminution du seuil d'induction de la LTP, ce qui pourrait entraîner une réduction du seuil de consolidation de la mémoire. Cette hypothèse a été testée chez les souris mutantes S6K1. En effet, ces souris présentent une acquisition précoce de la peur liée à un contexte en plus d'un déficit dans le test d'aversion alimentaire conditionnée, une absence d'acquisition de la mémoire spatiale dans le test de *Morris water maze* ainsi qu'une baisse d'exploration de l'environnement [64]. Ces déficits se retrouvent également chez les souris 4EBP2-KO qui présentent un déficit d'apprentissage spatial et de la mémoire ainsi que des déficits dans la mémoire de la peur, suggérant *à fortiori* du rôle crucial d'une régulation adéquate du complexe eIF4F par 4EBP2 durant la LTP, l'apprentissage et la mémoire dans l'hippocampe des souris [57].

Toutes ces études constituent l'évidence que toute perturbation de la voie mTOR peut affecter la cognition. Par ailleurs, ces expériences mettent en exergue le thème émergent selon lequel un équilibre exquis de la signalisation mTOR est important pour la régulation de la fonction synaptique et du comportement. Supportant cette notion, la mutation de *Tsc1* restreinte au cerveau antérieur des souris résulte en une hyperexcitabilité des circuits neuronaux avec un déséquilibre de la balance excitation/inhibition (E/I) des circuits de l'hippocampe. Ce déséquilibre est le résultat d'une réduction de l'inhibition des cellules pyramidales *Tsc1-KO* aboutissant à l'hyperexcitabilité du réseau neuronal, phénotypes qui sont abolis à la suite de l'inhibition de mTOR par la rapamycine [2, 65]. En d'autres termes, l'équilibre E/I est crucial pour le bon fonctionnement des circuits neuronaux, fonctionnement qui est nécessaire pour l'apprentissage, la mémoire ainsi que le traitement des informations sensorielles. Cela étant, un déséquilibre dans la balance E/I vers l'excitation (ou l'hyperexcitabilité) est impliqué dans diverses maladies neurologiques incluant l'épilepsie et les maladies du spectre de l'autisme (à l'instar de la sclérose tubéreuse) [66, 67]. De façon plus spécifique, dans ces pathologies, on note un débalancement de l'équilibre E/I vers une hyperexcitabilité [66].

Un circuit neuronal local est constitué de neurones pyramidaux et de neurones inhibiteurs qui maintiennent la balance E/I. Le rôle de la voie mTOR et des gènes *Tsc* dans le développement des neurones excitateurs a été largement investigué. Ainsi, il a été montré que l'absence de *Tsc1* ou *Tsc2* dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe entraînait un élargissement de leurs somas aussi bien qu'une augmentation du nombre d'épines dendritiques, résultant en une altération des propriétés des synapses glutamatergiques [36]. Par ailleurs, une étude récente a rapporté que l'absence de *Tsc1* affectait plus spécifiquement les dendrites basales, ces dernières montraient des branchements plus complexes et plus d'épines dendritiques, ceci autour de P28 [68]. De plus, la signalisation *Tsc1/2* est requise pour l'expression de certaines formes de plasticité synaptique à l'instar de la LTD-mGluR-dépendante et du maintien d'une force synaptique excitatrice normale [69]. Outre les neurones pyramidaux de l'hippocampe, l'excitabilité des neurones du striatum à savoir les neurones épineux ainsi que les neurones dopaminergiques est affectée par la signalisation *Tsc1-mTOR* [70, 71].

1.1.3. Neuropathologies de mTOR

Compte tenu de la diversité des processus métaboliques contrôlés par mTOR en général et mTORC1 en particulier, il n'est pas du tout surprenant qu'une dérégulation de mTORC1 ait été impliquée dans diverses maladies humaines. Ces maladies incluent celles qui sont caractérisées par une croissance incontrôlée à l'instar de la macrocéphalie, le syndrome de Protée et des syndromes tumoraux (exemple du syndrome de Cowden, de la sclérose tubéreuse, de la lymphangioliomyomatose, etc.) (**Figure 5**), ainsi que la majorité des cancers sporadiques. Les changements métaboliques découlant d'une dérégulation de mTORC1 dans le cancer ont été largement investigués. Par ailleurs, l'importance de l'intégrité de mTOR a été mise en lumière par la diversité de maladies neurologiques (neurodéveloppementales,

neuropsychiatriques et neurodégénératives) avec des étiologies distinctes dans laquelle une mutation et/ou dysfonctionnement de mTOR a été impliqué [27].

La sclérose tubéreuse, le syndrome de l’X fragile, la neurofibromatose de type 1 et les maladies associées aux mutations de PTEN représentent des maladies neurodéveloppementales monogéniques associées à des mutations dans la signalisation de mTOR et représentent environ 14% des maladies du spectre de l’autisme [72]. Par ailleurs et de façon intéressante, il a été rapporté qu’environ 50% des enfants souffrant de macrocéphalie et des retards du développement associés ou non à l’autisme ont des mutations dans la voie PI3K-AKT-mTOR, suggérant de l’importance de cette voie dans les pathologies affectant le cerveau [73].

Par soucis de concision et de pertinence, nous allons nous limiter dans cette section à la description de la sclérose tubéreuse qui est notre pathologie d’intérêt dans cette thèse.

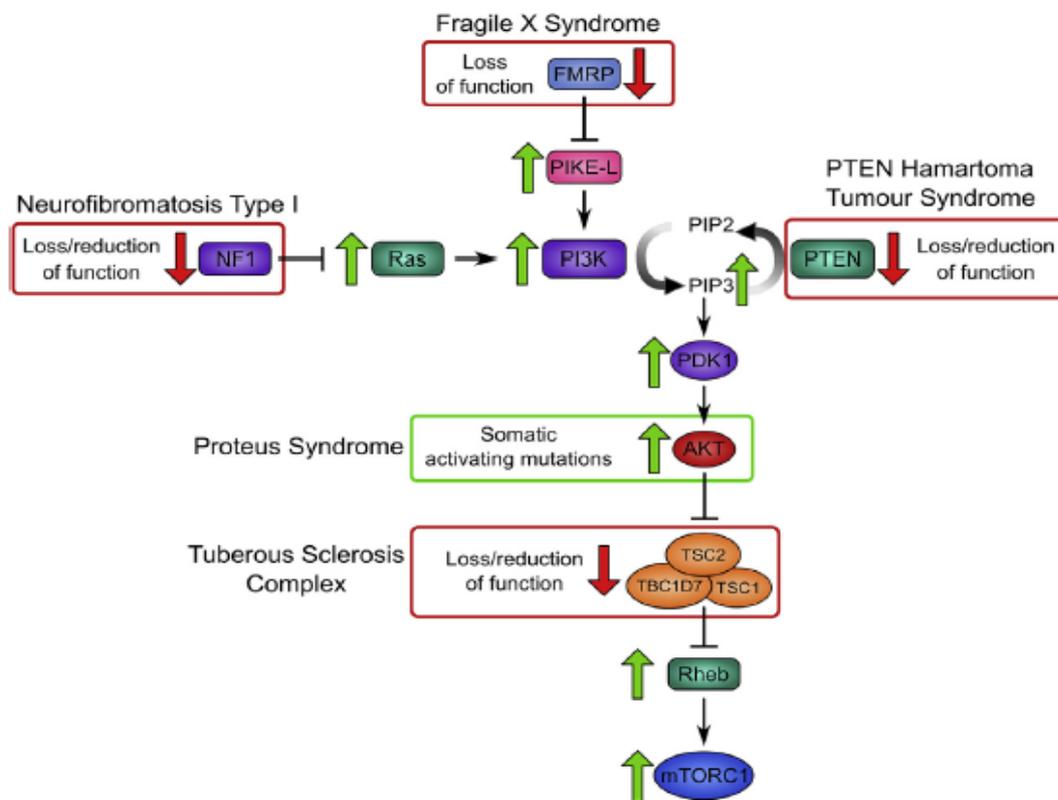


Figure 5: Différentes pathologies génétiques découlent d'un changement d'activité de la voie mTOR. Les mutations dans divers régulateurs de la voie mTOR tels que TSC1, TSC2, PTEN, AKT, NF1, FXR1 entraînent des changements dans l'activité de celle-ci et provoquent diverses pathologies neurodéveloppementales (mTORpathies). Tirée de Switon et al (2017).

1.1.3.1. La sclérose tubéreuse

La sclérose tubéreuse ou TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*) est une maladie autosomale dominante multi-systémique résultant de mutations pathogéniques dans *Tsc1* (chromosome 9q34) ou *Tsc2* (chromosome 16p13.3) et représente l'un des paradigmes monogéniques (le plus étudié) de « *mTORpathies* » [2, 74]. La mutation de *Tsc1* et *Tsc2* aboutit à des manifestations cliniques identiques, quoiqu'il ait été rapporté que le phénotype de *Tsc2* est plus sévère que celui de *Tsc1*. Théoriquement, dans cette pathologie, chaque organe du corps peut être affecté. Les manifestations du SNC du TSC incluent des structures anormales, radiologiquement détectables, tels que les tubercules corticaux (retrouvés chez 80 à 90% des patients), les nodules sous-épendymaires (ce sont des malformations qu'on retrouve majoritairement le long du troisième ventricule et des ventricules latéraux, ils sont présents chez plus de 80% de patients), mais aussi des anomalies des matières blanche et grise ainsi que des SEGAs (*subependymal giant cell astrocytomas*) [72, 75]. Le phénotype neurologique du TSC est l'épilepsie, la déficience mentale ainsi que l'autisme [76]. En effet, les études cliniques ont rapporté que plus de 90% des patients développent des symptômes neurologiques à savoir l'épilepsie, les comportements associés aux troubles du spectre de l'autisme, l'anxiété, les déficits de l'attention avec ou sans de l'hyperactivité, et bien d'autres problèmes comportementaux, ce qui fait que l'on désigne actuellement cette pathologie sous le terme des *TSC-associated neuropsychiatric disorders* (TAND) au lieu de TSC [77].

Une vieille hypothèse est celle selon laquelle les crises épileptiques expérimentées par ces patients auraient pour origines les tubercules corticaux, néanmoins, l'origine exacte ainsi

que le mécanisme sous-tendant l'épileptogenèse sont toujours matières à débat. En effet, plusieurs études ont démontré l'absence de corrélation entre l'étendue des tubercules et la sévérité des crises épileptiques. De fait, 38 à 50% des patients souffrent d'une épilepsie réfractaire nécessitant généralement une intervention chirurgicale. Aussi, l'âge auquel les crises se déclenchent ainsi que leur sévérité représentent des facteurs de prévision des déficits cognitifs sur le long terme et des déficits comportementaux des patients [75].

L'incidence de TSC a été estimée à environ 1/6000, le TSC est donc classifiée en tant que « maladie rare ». Le TSC découle soit de mutations *de novo* (représentent 2/3 des cas) ou héritées (1/3 des cas, transmises de façon autosomale dominante) [74, 75]. Le motif génétique de TSC peut être décrit par l'hypothèse « Knudson's 2-hit », ce qui veut dire que l'acquisition d'une mutation somatique dans un allèle fonctionnel de *Tsc1* ou *Tsc2* précédée par une mutation « *germline* » dans l'autre allèle conduit à l'état pathologique. La mutation de *Tsc1* ou *Tsc2* a une pénétrance complète avec une large variabilité phénotypique, ce qui sous-entend que tout individu avec une mutation dans le *Tsc* développerait la sclérose tubéreuse, quoiqu'à des degrés variables. Par ailleurs, le grand nombre de mutations possibles dans les gènes *Tsc* contribuent également à l'hétérogénéité de la population patiente [75].

Les mutations rencontrées dans *Tsc1* et *Tsc2* diffèrent par le fait que *Tsc1* présente en grande partie des mutations « *frameshift et nonsense* » menant à une troncation de la protéine alors que les mutations *Tsc2* sont majoritairement des mutations faux-sens, de larges délétions ainsi que des réarrangements. De plus, les mutations dans *Tsc1* ont été identifiées dans environ 10 à 20% des patients alors que les mutations dans *Tsc2* sont retrouvées chez environ 70 à 90% des patients. La plupart des cas TSC2 sont sporadiques et présentent de plus sévères manifestations [75, 78].

Au niveau moléculaire, les mutations génétiques de *Tsc1* et *Tsc2* conduisent à une désinhibition de Rheb et une suractivation de mTOR. De manière consistante avec le rôle

pathogénique de l'hyperactivation de mTORC1, plusieurs études (preuves de concept/preuves de principes) ont montré qu'un traitement à la rapamycine atténuait la sévérité phénotypique (aussi bien au niveau comportemental que neuropathologique) dans les modèles de souris transgéniques TSC [75, 79-82]. TSC étant une maladie chronique, la stratégie proposée par plusieurs études est la réduction de l'activation de mTOR, le traitement idéal serait celui qui serait assez sécuritaire et tolérable par l'organisme pour une administration sur le long terme [83].

Alors que le complexe Tsc1/2 interagit avec plus de 50 protéines, la plupart de ces protéines demeure mal connue. L'une d'entre elles récemment décrite est le TBC1D7 qui est un nouveau composant du complexe Tsc1/2 [2, 11]. Deux études ont rapporté la présence de mutations dans le TBC1D7 [2]. Ces études ont révélé que les mutations dans le TBC1D7 (troncation) causent des déficiences mentales sans provoquer les autres caractéristiques typiques de la sclérose tubéreuse. Aussi, alors que la mégalencéphalie n'est pas communément observée dans le TSC, elle a été associée avec l'activation de mTORC1 découlant de la mutation de TBC1D7. Ces observations renforcent la relation entre la voie mTORC1 et le développement de la mégalencéphalie. En plus de la macrocéphalie et de la déficience intellectuelle, les patients TBC1D7 présentent des anomalies comportementales, la psychose, les difficultés d'apprentissage et bien d'autres phénotypes permettant leur classification en tant que patients TSC. De façon consistante avec la perte de fonction de TBC1D7, la lignée cellulaire des patients montrait une augmentation de la phosphorylation de 4EBP1, la cible directe de mTORC1 ainsi qu'un délai de l'initiation des processus de l'autophagie [84, 85].

Afin d'investiguer les mécanismes moléculaires et physiopathologiques à la base du TSC, avec une perspective thérapeutique, divers modèles animaux ayant des mutations similaires à celles des patients dans les gènes *Tsc1* ou *Tsc2* ont été générés. Les embryons *Tsc1-null* (*germline*) ne sont pas viables et meurent durant la gestation des suites des insuffisances

hépatiques. Pour contrer ce problème, des souris Tsc1 hétérozygotes ainsi que des souris Tsc1 ou Tsc2 KO-conditionnelles ont été générées, ce, en prenant avantages des promoteurs spécifiques tels que la GFAP pour les astrocytes, la nestine pour les progéniteurs neuronaux et la synapsine pour les neurones [78, 86].

À titre d'exemple, les souris Synapsin-Cre/Tsc1 (générées par l'utilisation du promoteur synapsine pour l'expression de la Cre) dont l'expression de Tsc1 est abolie dans les neurones autour de l'âge embryonnaire 13 (E13) montraient diverses anomalies neurologiques à partir de l'âge postnatal 5 (P5) avec la mort survenant autour de P35. Ces souris présentaient également des crises épileptiques (cliniques et électrographiques), tant spontanées que survenant à la suite d'une stimulation physique. Par ailleurs, chez ces mutants, plusieurs neurones corticaux et de l'hippocampe montrent une dyplasie et un élargissement des somas, avec une forte expression de PS6, de plus, ils sont ectopiques en de multiples endroits du cortex et l'hippocampe. Ce modèle animal réplique à plusieurs niveaux les lésions retrouvées dans le cerveau des patients TSC, ce qui traduit l'importance du complexe Tsc1/2 dans le développement neuronal [38, 81]. Un autre modèle qui s'est avéré important dans l'étude de la pathophysiologie de TSC est le modèle animal avec une inactivation de Tsc1 dans les cellules gliales (souris Tsc1-GFAP KO-conditionnelles). Ces souris développaient une astroglie, une désorganisation neuronale ainsi qu'une augmentation de la taille du cerveau, phénotypes qui sont abolis par un traitement à la rapamycine [39, 87]. Aussi, les souris ayant une perte de Tsc2 dans les cellules progénitrices de la glie radiaire présentaient des phénotypes récapitulant les manifestations cliniques de TSC [88].

Les études récentes ont impliqué des pertes de cellules de Purkinje (dans le cervelet) dans la symptomatologie des maladies du spectre de l'autisme. En effet, il a été montré que TSC était une maladie caractérisée par un dysfonctionnement des cellules de Purkinje vu que les animaux ayant une délétion de Tsc1 spécifiquement dans ces cellules (souris L7-Cre/Tsc1)

montraient des comportements autistiques (incluant des déficits dans l'interaction sociale, un comportement répétitif) en plus d'une hyperexcitabilité des cellules de Purkinje. Le traitement de ces mutants avec la rapamycine à partir de P7 empêchait le développement de la pathologie [79].

La capacité à diagnostiquer la TSC aussi bien pré que périnatalement a mené à l'hypothèse selon laquelle il serait possible de traiter ces patients pendant ces fenêtres de temps, ce qui possiblement pourrait améliorer les conditions de vie des patients plus tard. Afin de vérifier cette hypothèse, des souris Nestin-cre/Tsc1 (perte spécifique de Tsc1 dans les progéniteurs neuronaux) ont été traitées prénatalement avec la rapamycine. Ce traitement était efficace dans le sens où les souris mutantes ne mourraient plus *in-utero* [89]. Cette étude proposait cette approche thérapeutique pour le traitement des embryons TSC. Tant s'en faut parce qu'une autre étude a montré qu'un traitement prénatal (une seule injection de la rapamycine) affectait négativement le développement postnatal, effets qui persistaient jusqu'à l'âge adulte. Il est alors important de reconsidérer une administration prénatale de la rapamycine ou d'autres traitements aux patients avec la TSC en particulier ou avec des pathologies neurologiques et neurodéveloppementales en général [90].

Des études cliniques investiguant l'effet de l'éverolimus (un dérivé de la rapamycine) sur le phénotype TSC a rapporté que les patients traités présentaient une réduction de la taille des SEGAs ainsi qu'une réduction de la fréquence des crises épileptiques. Aussi, le traitement à l'éverolimus améliorait les crises épileptiques chez les patients présentant de l'épilepsie médicalement réfractaire avec des bénéfices supplémentaires telle que l'amélioration de la qualité de vie et des comportements. Par ailleurs, les auteurs ont rapporté l'absence d'effets secondaires notables chez les patients traités (le traitement était bien toléré) [91, 92].

La rapamycine et ses analogues constituent alors une piste thérapeutique pour le traitement de la TSC, mais il va sans dire que le chemin est encore long.

1.1.3.2. Autres neuropathologies relatives à mTOR

Outre la TSC, diverses autres pathologies neurodéveloppementales aussi bien que neurodégénératives découlant des mutations dans la voie mTOR ont été identifiées. De ce nombre font partie le syndrome tumoral hamartomateux lié à PTEN, la neurofibromatose type 1, le syndrome de l’X fragile, l’autisme, l’épilepsie, le vieillissement, la maladie d’Alzheimer, le Parkinson, la maladie de Huntington ainsi que diverses maladies psychiatriques à l’instar de la dépression et de la schizophrénie [2].

L’identification des dérégulations de la voie mTOR avec pour conséquence la génération de modèles d’animaux expérimentaux a été une étape cruciale dans la compréhension de l’implication de mTOR dans le développement du SNC en général et du cerveau en particulier.

Tandis que le rôle de la voie de signalisation mTOR est largement établi dans les neurones excitateurs, très peu est connu sur son implication dans le développement et la fonction des interneurons GABAergiques du cortex. *En effet, peu d’études ont investigué, si, et comment une délétion de Tsc1/2 affecterait le développement de ces neurones. En particulier, l’on ignore si Tsc1/2 remplit des rôles spécifiques dans les diverses populations GABAergiques.*

1.2. Les cellules GABAergiques du cortex

Les circuiteries neuronales sont constituées de différents types de neurones nécessaires au maintien du fonctionnement normal des réseaux neuronaux du cerveau. L’on peut subdiviser les neurones en deux grands types à savoir les excitateurs et les inhibiteurs. Ensemble, les neurones excitateurs et inhibiteurs sont responsables de la régulation du flux d’information dans le réseau. Dans le cortex par exemple, l’inhibition synaptique est pourvue par les interneurons inhibiteurs utilisant majoritairement comme neurotransmetteur l’acide gamma-

aminobutyrique (*GABA-gamma-aminobutyric acid*) [93]. Dans le cortex cérébral, les interneurons GABAergiques représentent un groupe hétérogène de cellules caractérisées par leurs capacités spatiale et temporelle à influencer la circuiterie neuronale [94, 95]. Bien que minoritaires comparativement aux neurones glutamatergiques (elles représentent environ 20% de la population neuronale), les interneurons GABAergiques jouent un rôle crucial dans la modulation des dynamiques du réseau dans les circuits néocorticaux. En effet, il a été montré que les interneurons GABAergiques contrôlent l'excitabilité des neurones et leur intégration dans la circuiterie neuronale. De cela, il en découle leur implication dans la génération de la synchronie et des activités oscillatoires parmi les neurones pyramidaux. Ces oscillations dans les différents systèmes du SNC sont nécessaires pour diverses fonctions complexes telles que la perception, l'initiation du mouvement ainsi que la mémoire. Sur la base de la diversité de fonctions que remplissent les cellules GABAergiques dans le développement, fonctionnement adéquat et plasticité des circuits neuronaux, il n'est nullement surprenant que les altérations dans le développement de ces dernières aient été impliquées dans différentes pathologies aussi bien neurodéveloppementales que psychiatriques telles que la schizophrénie, l'autisme et l'épilepsie [96, 97].

Les interneurons corticaux présentent une grande diversité dans leurs morphologies, connectivité, biochimie et propriétés physiologiques (**Figure 6**). Ces différentes caractéristiques sont acquises durant le développement par l'implémentation de facteurs de transcription intrinsèques ou provenant du microenvironnement local [94, 95, 98]. Les caractéristiques morphologiques les plus proéminentes de ces neurones sont la forme et l'orientation de leurs axones et dendrites. À titre d'exemple, sur la base de leurs morphologies, on distingue des interneurons ciblant les dendrites, somas ou segment initial des axones des neurones pyramidaux, ce qui impacte leurs rôles dans les circuits neuronaux. Les propriétés biochimiques définissent des aspects importants de la communication synaptique à l'instar

d'une co-relâche de neuropeptides concomitante à celle de GABA. D'un autre côté, les propriétés électrophysiologiques sont largement déterminées par la combinaison des canaux ioniques qu'ils expriment [93, 94, 99].

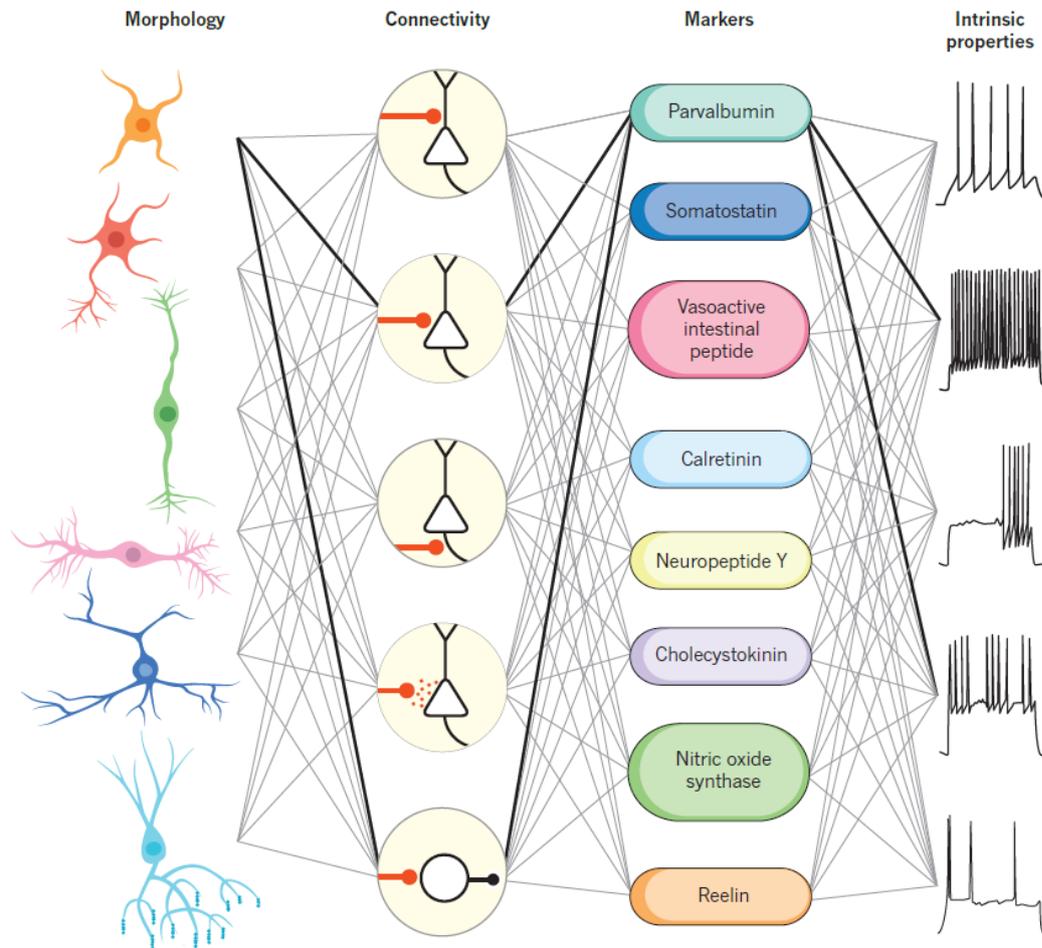


Figure 6: Critères de classification des interneurons. Les différentes catégories d'interneurones sont généralement classifiées en se basant sur la combinaison de divers critères : morphologiques, propriétés synaptiques, motif de connectivité, marqueurs intrinsèques et propriétés électrophysiologiques. Tirée de Kepecs and Fishell (2014).

1.2.1. Développement des cellules GABAergiques du cortex

Notre compréhension de la fonction des interneurons GABAergiques est complexifiée par leur grande hétérogénéité. Le programme génétique nécessaire à la construction du réseau

cortical GABAergique est initié à l'aube du développement du cerveau, celui-ci orchestre la spécification, la migration et divers aspects de la connectivité synaptique. Mentionnons ici que l'établissement des motifs matures de l'innervation GABAergique et de la transmission inhibitrice n'est finalisé qu'au cours de l'adolescence et est largement influencé par l'activité neuronale ainsi que l'expérience [96, 99].

1.2.1.1. Diversité des interneurones

Les interneurones corticaux peuvent être ségrégués en trois groupes distincts sur la base de marqueurs spécifiques : la protéine parvalbumine (PV, liant le calcium), le neuropeptide somatostatine (SST) et le récepteur ionotropique sérotoninergique 5HT_{3a}R (5-hydroxytryptamine 3a) (**Figure 7**). À eux trois, ces neurones constituent l'entièreté de la population des interneurones avec un ratio respectif de 40%, 30%, 30%. Les interneurones exprimant chacun de ces marqueurs possèdent une origine embryonnaire distincte [95].

Les interneurones PV sont identifiables électrophysiologiquement par leur phénotype de cellules à décharge rapide (*fast-spiking*). Les cellules PV ont été largement impliquées dans des pathologies psychiatriques et neurodéveloppementales sur la base de leurs rôles cruciaux dans la régulation de la balance E/I. Par ailleurs, les cellules PV forment des synapses autour des somas, des dendrites proximales et du segment initial des axones des cellules pyramidales et sont nécessaires dans le processus de synchronisation des populations neuronales dans le but de générer des oscillations. En soi, les cellules PV constituent un groupe hétérogène parmi lequel on peut distinguer les cellules à panier, les cellules chandelier, et les interneurones translaminaires [93]. Les cellules à panier représentent la catégorie d'interneurones la plus abondante dans le néocortex et plus spécifiquement, elles sont l'objet de notre étude dans ce manuscrit. En tant que groupe, les cellules à panier sont caractérisées par d'immenses prolongements axonaux très ramifiés. Elles ciblent spécifiquement les corps cellulaires et les

dendrites proximales des cellules pyramidales et d'autres interneurones. Elles sont localisées dans les couches 2 à 6 du néocortex ainsi que dans les autres régions corticales. De plus, elles affichent diverses caractéristiques faisant d'elles l'une des plus rapides et fiables sources d'inhibition dans le cortex découlant du fait qu'elles possèdent une faible résistance, des cinétiques membranaires rapides, de courts potentiels d'actions et une large adaptation à la suite de l'hyperpolarisation. Ainsi, elles sont capables de soutenir de très hautes fréquences de décharges neuronales (jusqu'à 200 Hz). Bien plus, les cellules à panier sont fortement interconnectées par l'intermédiaire de synapses chimiques et électriques (*gap junctions*), créant un vaste réseau d'interneurones synchronisés [99].

Les cellules chandelier, tirant leur nom de la morphologie particulière de leurs branchements axonaux rappelant celle d'un chandelier, sont des cellules axo-axoniques qui établissent leurs synapses sur le segment initial de l'axone des cellules pyramidales. Elles sont particulièrement abondantes à la frontière entre la couche 1 et 2 du cortex, ainsi que dans la couche 6 et leur distribution régionale est très hétérogène. Aussi, une portion considérable de cellules chandelier n'expriment pas de niveau détectable de PV. Enfin, les interneurones translaminaires constituent un groupe assez rare d'interneurones à décharge rapide, elles se retrouvent en abondance dans les couches 5 et 6 du cortex. Possédant des branchements axonaux qui s'étalent sur toute l'épaisseur du cortex, ces interneurones contactent les cellules pyramidales dans diverses couches à la fois [100].

Le deuxième groupe, celui des cellules SST ont les dendrites comme cibles préférentielles et se déclinent en deux sous-catégories : les cellules Martinotti (caractérisées par un prolongement axonal ascendant innervant largement la couche 1, elles sont également abondantes dans la couche 5 et communes dans les couches 2 et 3) et les cellules non-Martinotti (on les retrouve dans les couches 2 à 6, elles sont particulièrement présentes dans la couche 4 où elles ciblent préférentiellement les cellules à panier). Quant au groupe d'interneurones

exprimant le 5HT3aR, ce qui les rend hautement sensibles aux effets neuromodulateurs de la sérotonine, il est tout autant hétérogène. On y distingue notamment les interneurons exprimant la VIP (*vasoactive intestinal peptide*) avec une co-expression de la calrétinine (cellules bipolaires) ou de la cholecystokinine. [99-101].

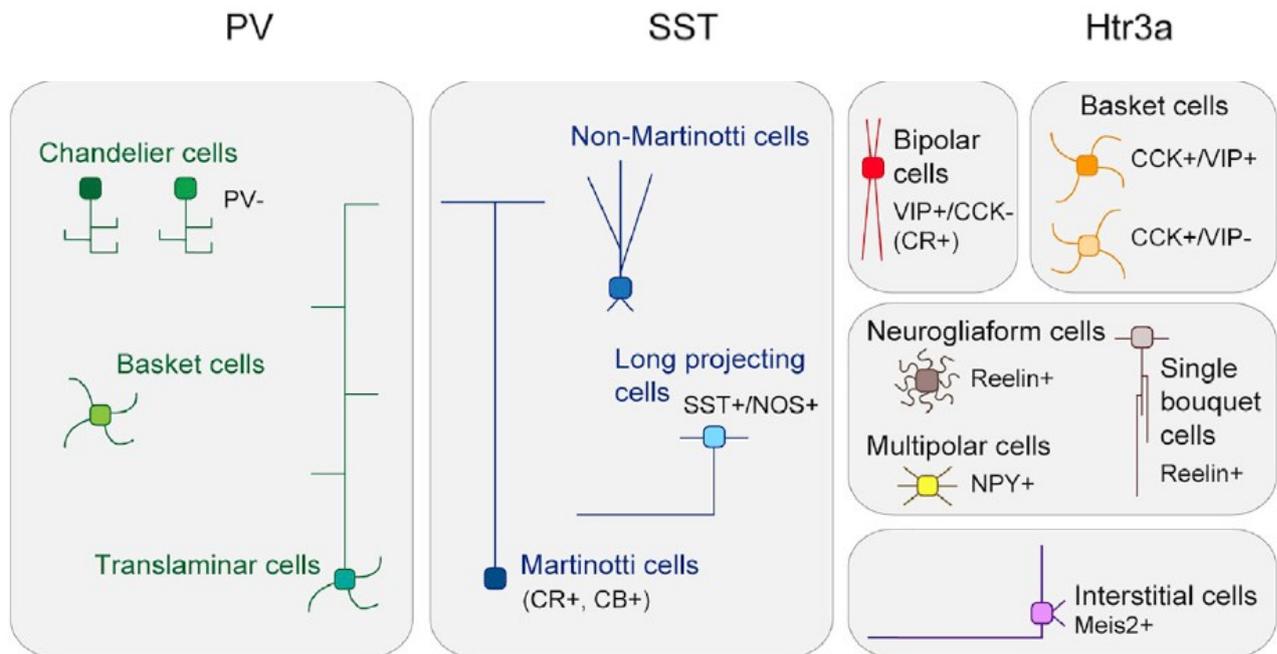


Figure 7: Diversité des neurones GABAergiques dans le cortex. Représentation schématique des principales classes d'interneurones dans le néocortex de la souris, les interneurons peuvent être subdivisés en trois groupes majeurs selon qu'ils expriment la PV, la SST ou le récepteur à sérotonine 3A (Htr3a). Noter qu'une petite fraction de cellules PV exprime également la SST. Tirée de Lim et al. (2018).

1.2.1.2. Spécification et migration des interneurons

Le développement des interneurons corticaux implique une série de processus cruciaux s'étalant sur une période prolongée. Ainsi, les interneurons sont générés à partir des cellules progénitrices localisées dans le *subpallium* de l'embryon. Peu de temps après leur changement en cellules postmitotiques, ils débutent une longue migration tangentielle et

atteignent le pallium. Ils continuent par la suite à se disperser dans tout le cortex en développement par l'intermédiaire d'une migration radiale dans le but d'adopter leur position finale dans une région et couche spécifique du cortex. Ensuite, graduellement, les interneurones acquièrent leurs marqueurs biochimiques au cours du processus bien que ne manifestant pas leurs caractéristiques morphologiques et connectivité avant les étapes tardives du développement postnatal. Le long délai existant entre la naissance et la période où ils commencent à montrer leurs caractéristiques particulières a mené à une divergence d'hypothèse concernant les mécanismes contrôlant la génération de leur diversité [94].

Néanmoins, diverses études ont montré que les interneurones proviennent des éminences ganglionnaires du télencéphale ventral ainsi que de l'aire préoptique (APO). L'éminence ganglionnaire médiane (EGM) produit environ 70% des interneurones du néocortex, majoritairement les interneurones exprimant la PV et la SST. À l'opposé, l'éminence ganglionnaire caudale (EGC) produit les 30% restant des interneurones néocorticaux. Finalement, l'APO donne également naissance à une toute petite proportion de cellules GABAergiques [97, 99, 102].

L'émergence de la diversité neuronale à partir de ces régions est dépendante d'une spécification spatiale et temporelle des cellules progénitrices sous l'influence de divers facteurs de transcription, ce qui restreint le potentiel de ces cellules à générer certaines classes de neurones GABAergiques. Notre compréhension des mécanismes moléculaires régulant la spécification des interneurones corticaux dans le subpallium demeure très limitée. Toutefois, des détails sur la cascade génétique des divers facteurs de transcription contrôlant le développement des interneurones dans l'EGM ont commencé à émerger [100]. L'étude du développement embryonnaire des interneurones GABAergiques a révélé que la génération, la spécification ainsi que la migration de ceux-ci sont déterminées par une famille de facteurs de transcription à boîte homéotique à savoir celle du *Dlx* (*distal-less*) qui inclut le *Dlx1/2* (*distal-*

less 1/2) et *Dlx5/6* (*distal-less 5/6*). Par ailleurs, le facteur de transcription *Mash1* (*mammalian achaete-scute homolog 1*) est également crucial pour ces divers processus susmentionnés [99]. Les facteurs de transcription *Dlx1/2* sont initialement exprimés par les cellules progénitrices de la zone ventriculaire dans lesquelles elles promeuvent la spécification des lignées GABAergiques par une activité répressive du facteur de transcription *Olig2* (*oligodendrocyte transcription factor*), ce dernier étant requis pour la spécification des oligodendrocytes [103]. Au cours de la phase initiale du développement des interneurones, le *Dlx1/2* impulse la migration en restreignant la croissance des neurites par l'intermédiaire de la répression du *PAK3* (*p21-activated serine/threonine kinase*), un effecteur en aval des Rho GTPases [104] et en induisant l'expression de facteurs de transcription essentiels à la migration tangentielle des interneurones corticaux à l'instar d'*Arx* (*aristaless-related homeobox gene*) [105, 106]. Lorsque les interneurones deviennent postmitotiques, *Dlx1/2* facilite leur différenciation en cellules GABAergiques en induisant l'expression de *Gad1* (*glutamate decarboxylase 1*) et *Gad2* (*glutamate decarboxylase 2*), tous deux étant des enzymes permettant la conversion du glutamate en GABA [107, 108]. Par ailleurs, un fonctionnement adéquat de *Dlx1/2* est requis pour une induction de *Dlx5/6*, ces derniers étant importants aussi pour le développement et le fonctionnement des interneurones corticaux en général, en particulier celui des cellules PV [109]. En effet, chez les souris mutantes pour *Dlx1/2* et *Mash1*, les interneurones sont incapables de migrer hors des éminences, ce qui aboutit à une réduction notable du nombre des interneurones corticaux [99].

Le deuxième réseau de gène contrôlant la spécification des interneurones est chapeauté par le facteur de transcription *Nkx2.1* qui s'avère être crucial pour l'acquisition de l'identité des interneurones PV et SST [110]. En effet, l'identité régionale de l'EMG et de l'APO est induite par la présence du facteur de transcription *Nkx2.1*, ceci bien avant le début de la neurogenèse dans cette région. L'expression de *Nkx2.1* confère des propriétés particulières aux

progéniteurs de l'EMG et APO, ce qui les diffère des régions adjacentes telles que l'EGC, l'éminence ganglionnaire latérale (EGL) ainsi que le domaine préoptique hypothalamique. Ainsi, dans les souris *Nkx2.1-KO*, il a été montré que les progéniteurs de l'EMG/APO étaient délocalisés dans les autres régions adjacentes précitées [94]. Par ailleurs, *Nkx2.1* est requis pour l'expression du *Lhx6*, un facteur de transcription LIM-homéodomaine important pour la maturation des interneurons corticaux GABAergiques provenant de l'EMG [110-113]. Une perte de *Lhx6* dérégule l'expression de ces effecteurs en aval, ces derniers étant importants pour la migration des interneurons. Du nombre de ces effecteurs, on y retrouve *ErbB4* (*v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4*), le *CXCR4* (*C-X-C chemokine receptor type 4*) et *CXCR7* (*C-X-C chemokine receptor type r*) ainsi qu'*Arx*. *Lhx6* régule également le facteur de transcription *Sox6* (*SRY-box 6*) requis pour une distribution laminaire appropriée ainsi que la maturation des interneurons [94, 99, 113] (**Figure 8**).

Sur la base des cascades de facteurs de transcription identifiés, il a été conclu que les interneurons GABAergiques possèdent une forte propension envers un sort très bien défini bien avant qu'ils n'occupent leurs positions finales dans le cortex cérébral. Il a été alors suggéré que la diversité des interneurons ne serait pas le résultat de mécanismes dépendant de l'activité neuronale et gliale dans le cortex mais plutôt d'un processus établi très tôt dans le développement sous l'influence de facteurs de transcription spécifiques [114].

Ainsi, force est de reconnaître que bien de progrès a été réalisé dans la compréhension de l'origine de la spécification des interneurons.

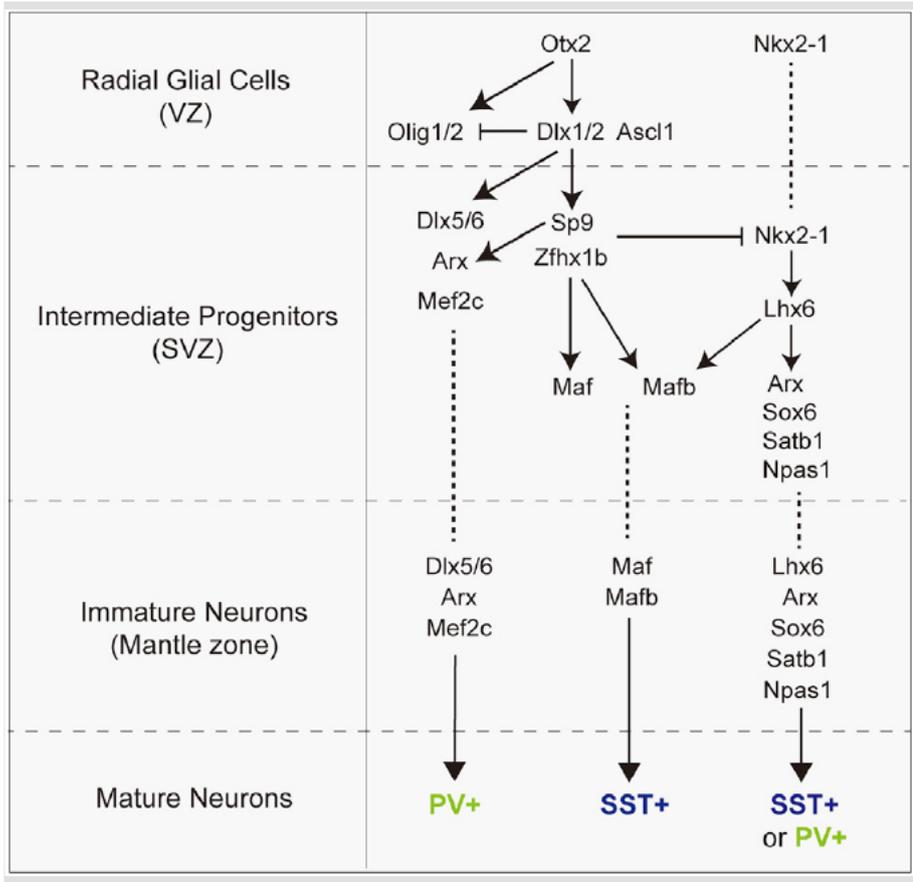


Figure 8: Divers facteurs de transcription régulent le développement des interneurones corticaux. Une cascade de facteurs de transcription contrôle le développement des interneurones dans l’EGM. Deux réseaux parallèles de gènes régulateurs, ayant plusieurs points d’intersection régule le développement des interneurones PV et SST. Tirée de Lim et al. (2018)

1.2.1.3. Établissement des synapses

L’inhibition assurée par les cellules GABAergiques est d’une importance capitale dans le fonctionnement des circuits neuronaux. Le développement des synapses inhibitrices GABAergiques ainsi que leur patron d’innervation dans le néocortex des mammifères représente un long processus (il s’étend très largement dans la période postnatale) qui est régulé par l’activité neuronale, l’expérience ainsi que par la signalisation du neurotransmetteur GABA. En effet, plusieurs données supportent le fait que la signalisation de GABA est plus qu’une simple histoire de transmission synaptique car elle régule le développement des

synapses inhibitrices. En d'autres mots, de façon similaire à l'implication du glutamate dans le développement des synapses excitatrices, GABA serait important dans la coordination de la maturation des sites pré- et post-synaptiques des synapses inhibitrices [115]. Les neurones GABAergiques s'intègrent aux réseaux neuronaux par l'intermédiaire de leurs arborisations axonales et des synapses qui s'y trouvent, ces dernières possédant un patron d'innervation très élaboré et qui plus est spécifique aux divers types de cellules [116]. Une des plus proéminentes caractéristiques de l'arborisation axonale des cellules GABAergiques est leur exubérance locale, en effet un seul interneurone produit des arborisations locales très étendues qui peuvent innover des centaines de neurones dans leur voisinage [117, 118]. Il a été montré que dans les cortex visuel et somatosensoriel par exemple, la maturation de l'innervation inhibitrice est influencée par l'expérience sensorielle à l'effet qu'une privation sensorielle retardait la maturation de l'innervation périsomatique formée par les cellules PV [119-121]. Ce développement activité-dépendant constitue une grande composante du bon fonctionnement du circuit neuronal [122] d'où la question : *quelles sont les mécanismes cellulaires et moléculaires liant l'expérience sensorielle à la maturation des synapses GABAergiques?*

a. Régulation du développement des synapses inhibitrices par la signalisation GABA

En tant que médiateurs clés de l'activité neuronale, les neurotransmetteurs sont particulièrement bien adaptés pour coupler la signalisation synaptique au câblage des synapses. Initialement découvert comme un transmetteur inhibiteur, GABA est impliqué dans multiples processus du développement neuronal, de la prolifération cellulaire à la formation des circuits [123]. Plusieurs études ont montré que la signalisation GABA promeut et coordonne la maturation des sites pré et post-synaptiques au cours du développement et de l'innervation des synapses inhibitrices. En effet, une altération de la synthèse de GABA entraîne des conséquences néfastes sur le développement de synapses périsomatiques formées par les

cellules PV dans le cortex visuel [18, 124]. GABA est synthétisé par deux enzymes glutamate décarboxylases à savoir le GAD67 et GAD65. Un KO de GAD67 dans des interneurons GABAergiques provoque des déficits dans l'élaboration du branchement axonal, la formation de synapses et affecte le champ d'innervation de ces cellules, en cultures organotypiques, déficits qui pouvaient être partiellement renversés par un blocage du recyclage de GABA ou une augmentation de la fonction de GABA_A ou GABA_B. À l'opposé, une surexpression de GAD67 dans les cellules GABAergiques en cultures organotypiques facilite la maturation des synapses périsonmatiques [124, 125].

D'un autre côté, l'idée d'une implication de GABA dans le développement des synapses inhibitrices a été consolidée par les études portant sur les sous-unités du récepteur GABA_A (GABA_AR). Une activation des GABA_ARs résulterait en une relâche locale des facteurs neurotrophiques qui promeuvent la maturation des synapses inhibitrices et/ou agiraient comme de signaux protecteurs empêchant l'élimination de synapses [115].

En somme, le développement des synapses inhibitrices est un processus complexe qui dépend largement de la synthèse de GABA, synthèse qui est sous l'influence étroite de l'activité neuronale et de diverses expériences sensorielles.

b. Régulation du développement des synapses inhibitrices par les molécules d'adhésion

Les neuroligines et les neurexines représentent le groupe de molécules d'adhésion synaptiques le mieux caractérisé et sont les seules pour lesquelles une fonction synaptique spécifique a été établie [126, 127]. Elles possèdent une très forte capacité synaptogénique, en d'autres termes, elles remplissent des rôles d'organisatrices de synapses [115]. Bien que les complexes neuroligine-neurexine soient communs aux synapses glutamatergiques et GABAergiques, l'analyse de souris mutantes a confirmé leurs rôles critiques dans l'organisation des synapses GABAergiques. En effet, chez les souris neurexine-KO (ces

dernières sont dépourvues des toutes les isoformes de neurexine), bien que mourant à la naissance, on a pu noter une réduction de moitié de la densité de synapses GABAergiques du tronc cérébral [128]. En revanche, les souris chez lesquelles seules 2 des 3 isoformes de neurexine sont abolies, certaines survivant jusqu'à l'âge adulte, on note une réduction de la densité synaptique GABAergique de 30% dans le néocortex alors que la densité des synapses glutamatergiques demeure inchangée [128, 129].

De toutes les isoformes de neurologine, l'isoforme 2 (NL2) est exclusivement localisée aux synapses GABAergiques, à cet effet, il a été montré que son absence résulte en une diminution sélective du nombre de synapses inhibitrices dans le néocortex postanal se traduisant par un déficit dans la transmission GABAergique. Par ailleurs, une surexpression de NL2 dans les cultures neuronales entraîne un rétablissement de la densité des terminaisons axonales GABAergiques ainsi qu'une augmentation de l'amplitude des courants postsynaptiques inhibiteurs [130, 131]. Mentionnons ici que le NL2 possède également une affinité nanomolaire envers la molécule d'adhésion Slitrk3 (ST3) et que la perturbation sélective de cette liaison affecte le développement des synapses inhibitrices avec des déficits dans l'activité du réseau neuronal ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité des animaux aux crises épileptiques. Ainsi, les molécules d'adhésion synaptiques travaillent de concert pour contrôler la synaptogenèse établissant ainsi un cadre global de développement des synapses GABAergiques [132].

Les diverses études mentionnées dans cette section ont permis d'établir l'importance des neurologines et des récepteurs GABA_A dans la maturation des spécialisations postsynaptiques de même que dans la différenciation et la stabilisation des terminaisons présynaptiques des synapses inhibitrices (**Figure 9**). Sur cette base, l'on peut se poser la question suivante : *comment la signalisation synaptique médiée par GABA_A/GABA_AR et l'adhésion synaptique contrôlée par les molécules d'adhésion neurologine/neurexine interagissent et*

coopèrent-elles pour réguler le développement activité-dépendant des synapses inhibitrices? [115]. Récemment, une piste de réponse a été fournie par une étude qui a montré que la sous-unité $\alpha 2\delta$ -2 des canaux calciques voltage-dépendants qui sont pré-synaptiques interagissent avec les neurexines et modulent l'abondance des GABA_ARs post-synaptiques [133].

Outre tous les facteurs susmentionnés, d'autres facteurs de développement des synapses GABAergiques ont été découverts et leur implication extensivement étudiée. Celui ayant le plus de notoriété est sans aucun doute le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) qui est une protéine dont l'expression est activité-dépendante. Il est l'une des premières molécules impliquées dans la formation des synapses GABAergiques dans l'hippocampe ainsi que les cultures corticales. Par ailleurs, une surexpression de BDNF dans le cortex visuel par exemple aboutit à une augmentation accrue de l'innervation inhibitrice périsomatique dans la dite région, corrélant avec un début et une fin précoces de la période critique de plasticité [134]. En revanche, l'étude de souris BDNF-*KO* a révélé que l'absence de ce facteur neurotrophique influençait négativement l'acquisition des propriétés électrophysiologiques et chimiques propres aux cellules PV. Le BDNF est donc important pour le développement fonctionnel des cellules PV, ce qui régule la période critique de plasticité [135].

D'un autre côté, la maturation des synapses GABAergiques est aussi dépendante de signaux qui la contraignent à se conformer à une fenêtre de développement spécifique, un développement précoce et excessif pouvant s'avérer dramatique au fonctionnement des circuits neuronaux. L'un des signaux répressifs de la maturation des synapses GABAergiques est la PSA (*polysialic acid*) localisée en abondance à la surface des cellules et qui module les interactions cellule-cellule par l'intermédiaire des molécules d'adhésion dont la molécule d'adhésion neurale (*Neural cell adhesion molecule-NCAM*). À cet effet, une suppression prématurée de la PSA favorise la formation précoce des synapses GABAergiques suivie par une augmentation de la transmission synaptique inhibitrice, qui à son tour promeut la

maturation de l'innervation GABAergique. L'expression activité-dépendante de la PSA s'avère être un facteur crucial dans la régulation de la fenêtre de maturation des synapses GABAergiques ainsi que le déclenchement de la plasticité pour la dominance oculaire [136].

Comme mentionné plus haut, chaque interneurone cible un compartiment spécifique des neurones excitateurs, pourtant les mécanismes moléculaires sous-jacents ces motifs de connectivité ont été très peu investigués. Dans cette perspective, des études récentes ont investigué les différentes dynamiques transcriptionnelles dans les classes d'interneurones durant la formation des circuits corticaux inhibiteurs. Il a été montré que le fait de former des synapses sur les dendrites, soma ou segment initial de l'axone des cellules pyramidales est déterminé par des molécules spécifiques que ces interneurones exprimaient. Il a été montré que le *Cbln4* (*cerebellin 4*), *Lgi2* (*leucin-rich repeat LGI family member 2*) et *Fgf13* (*fibroblast growth factor 13*) sont enrichies spécifiquement et respectivement dans les cellules SST, les cellules à panier PV et les cellules chandeliers. À cet égard, une surexpression de *Cbln4* dans les SST entraînent une innervation plus accrue des synapses formées par ces dernières sur les dendrites de leurs cibles. À l'opposé, une expression ectopique de *Cbln4* dans les cellules PV ne promeut pas la formation des synapses périsonmatiques mais provoque au contraire une augmentation du nombre de synapses que forment celles-ci sur les dendrites. Il existe donc des dynamiques transcriptionnelles qui influencent l'établissement des patrons d'innervation des synapses inhibitrices [98, 137].

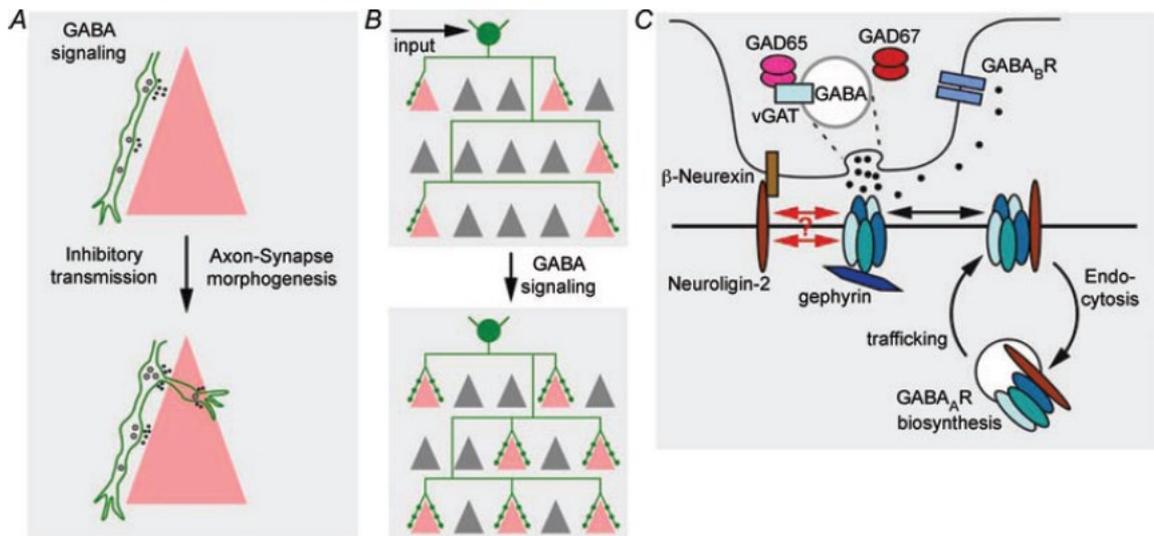


Figure 9 : Régulation du développement des synapses inhibitrices et de leurs motifs de connectivité par GABA. La signalisation GABA régule la morphogenèse des synapses inhibitrices (A). La signalisation activité-dépendante de GABA influence le développement de l'arborisation axonale des cellules GABAergiques ainsi que leur motif d'innervation (B). C- Modèle hypothétique des mécanismes d'action montrant les interactions entre la signalisation GABA et le complexe d'adhésion neuroligine-neurexine. Tirée de Huang (2009).

Somme toute, tous les signaux impliqués dans l'établissement et la maturation des synapses GABAergiques sont dépendants de l'activité sensorielle et/ou neuronale. Tel que décrit plus haut, l'activité neuronale et ses effets sous-jacents impliquent fortement la voie de signalisation mTORC1 [voir section **1.1.1.2. Régulation de mTORC1 par l'activité neuronale**]. Une question qui mériterait qu'on s'y penche est le rôle réel ou hypothétique de cette voie dans l'établissement et/ou la maturation des synapses GABAergiques. Mais avant cela, en quoi est-il important d'étudier les cellules GABAergiques en général et plus particulièrement celles exprimant la parvalbumine ? En d'autres mots, quels sont les rôles des cellules PV dans le fonctionnement des circuits neuronaux ?

1.2.2. Rôles des interneurons GABAergiques

La fonction classique attribuée aux interneurons GABAergiques corticaux consiste en leur capacité à produire une inhibition synaptique dans le cerveau adulte. Néanmoins, diverses études ont permis d'établir que leur rôle est bien plus complexe. En effet, grâce à une panoplie de données électrophysiologiques, il est devenu évident que leur plus grande tâche consiste plutôt au modelage des dynamiques spatio-temporelles des oscillations des réseaux neuronaux associées aux fonctions comportementales et cognitives du cerveau. Ce rôle central des interneurons GABAergiques dans le fonctionnement des réseaux neuronaux est exacerbé de plusieurs façons au cours du développement du cerveau [138].

1.2.2.1. Rôles des interneurons GABAergiques au cours du développement

Dès les premières étapes de développement postnatal, une seule cellule GABAergique peut rythmer efficacement l'activité de centaines d'autres cellules. Étant donné l'importance d'une activité neuronale organisée durant le développement du cerveau, les interneurons GABAergiques se positionnent alors comme des joueurs majeurs dans la maturation adéquate des circuits corticaux. Cette maturation adéquate s'avère être importante pour la régulation de la période critique corticale expérience-dépendante [99, 138]. Chez les rongeurs, la première semaine postnatale est marquée par l'apparition des activités oscillatoires dans le cortex ainsi que dans le système limbique. Plus spécifiquement, ces activités de synchronisation des réseaux neuronaux sont importantes pour une maturation morphologique appropriée des neurones aussi bien excitateurs qu'inhibiteurs, ceci incluent le développement d'arborisations dendritiques complexes et l'établissement des contacts synaptiques [99]. L'habileté à influencer l'organisation des circuits neuronaux au cours du développement s'explique par le fait que durant le processus de maturation de leur excitabilité intrinsèque, ces cellules

présentent un très faible seuil de génération du potentiel d'action comparativement aux cellules pyramidales, toutefois, ce phénomène diverge selon les différentes couches corticales analysées [139], ce qui leur permet d'être plus facilement recruté durant les phases initiales de la synchronisation des réseaux [140].

Les premières activités postnatales enregistrées sont les SPAs (*Synchronous plateau assemblies*), qui représentent des courants calciques prolongés et médiés par les jonctions-gap apparaissant entre P0 et P3 dans l'hippocampe et le néocortex du rat. Dans le cortex spécifiquement, les SPAs co-existent progressivement avec les cENOs (*cortical early network oscillations*) entre P0 et P5. Les cENOs représentent des courants calciques synaptiques et sont très peu fréquents (0.01 Hz) avec de lentes cinétiques qui sont dépendantes de l'activité des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA. L'apparition des cENOs provoque la dépolarisation soutenue de larges groupes de neurones [141, 142].

Graduellement, ces activités sont remplacées par les GDPs (*giant depolarising potentials*) dans l'hippocampe et le néocortex entre P6 et P8 [142, 143]. Les GDPs représentent des événements calciques plus rapides et plus fréquents (0.05-0.5 Hz avec une moyenne de 0.1 Hz). Ils sont largement dépendants de l'activité synaptique GABAergique dans le sens où ils peuvent être bloqués par l'antagoniste des récepteurs GABA_A qu'est la bicuculline. L'apparition des GDPs coïncide avec la phase active de la synaptogenèse, établissant le fait qu'un dysfonctionnement sélectif des interneurones GABAergiques durant ces étapes de développement altérerait le processus de formation des synapses [143-146]. Bien que les GDPs aient une courte durée de vie, leurs fonctions sont essentielles dans la mise en place des diverses étapes de maturation subséquentes [97]. Dans l'hippocampe par exemple, il a été montré que les GDPs servaient à augmenter la force des synapses glutamatergiques immatures en promouvant la dépolarisation concomitante des terminaisons pré et post-synaptiques [147].

Par ailleurs, l'évidence de l'importance cruciale des microcircuits GABAergiques dans la synchronisation de l'activité neuronale initiale a été établie sur la base de la découverte que quelques interneurones forment des *hubs*, ces derniers étant caractérisés par une très forte connectivité (importante pour la gestion du flot d'information) par l'intermédiaire de leurs denses arborisations axonales et aussi par de très fortes excitabilités intrinsèques et synaptiques. De plus, la modification de l'activité d'un *hub* est suffisante pour synchroniser ou désynchroniser les dynamiques du circuit neuronal [148].

En somme, les interneurones GABAergiques, étant donné leur contribution à la synchronisation neuronale dans le cerveau néonatal, jouent un rôle primordial dans le câblage des circuits immatures. En mûrissant, les interneurones commencent à remplir leurs fonctions de *pacemakers*, fonctions qu'ils continuent de remplir dans le cerveau adulte. Par ailleurs, l'on sait maintenant qu'une perturbation spécifique du développement des interneurones corticaux GABAergiques, découlant soit de facteurs génétiques ou épigénétiques, contribue à la genèse de diverses maladies neurologiques à l'instar de l'épilepsie, de l'autisme, de la déficience intellectuelle, de la schizophrénie etc.[138]. Finalement, dans le cerveau adulte, ils sont responsables de l'inhibition locale et gèrent la genèse et le maintien de certaines oscillations [97, 99].

La maturation des interneurones GABAergiques s'accompagne de l'établissement de leurs motifs de connectivité synaptique. Les cellules PV ciblent spécifiquement les somas et les dendrites proximales des cellules pyramidales. Cela étant, elles contrôlent étroitement la génération et la propagation des potentiels d'actions et ont été impliquées dans diverses fonctions dans le cerveau adulte.

1.2.2.2. Rôles des interneurons PV chez l'adulte

Tel que décrit dans la section précédente, les interneurons GABAergiques jouent de rôles cruciaux dans les processus de développement des circuits neuronaux. Néanmoins, leurs rôles dans le bon fonctionnement du cerveau adulte ne sont pas moindres. Les interneurons GABAergiques contrôlent l'excitabilité des neurones, leur intégration dans les réseaux neuronaux et la plasticité du cerveau. De plus, ils régulent la génération de la synchronisation temporelle des oscillations parmi les circuits neuronaux pyramidaux [149]. Les oscillations neuronales synchronisées dans les basses (delta, thêta et alpha) et dans les hautes (beta et gamma) fréquences constituent le mécanisme fondamental sous-tendant une activité coordonnée dans un cerveau normal [150]. Ces oscillations sont nécessaires à l'accomplissement de diverses tâches telles que la perception, l'initiation du mouvement, et la mémoire [149] (**Figure 10**). Les diverses études présentées dans la section précédente ont permis d'établir que la synchronisation de ces activités oscillatoires est pertinente pour le développement des circuits soulignant le rôle de la synchronisation neuronale dans le développement normal du cerveau aussi bien que son importance dans la compréhension des maladies neurodéveloppementales telles que les maladies du spectre de l'autisme, la schizophrénie, l'épilepsie. L'étude des divers modèles expérimentaux de ces maladies a mis en lumière le rôle des altérations de la transmission GABAergique dans la pathophysiologie des maladies neurodéveloppementales et a permis d'établir les fonctions que remplissent les cellules PV dans le fonctionnement normal du cerveau adulte.

Dans la schizophrénie par exemple, on note un déficit majeur dans la cognition, représenté par un dysfonctionnement de la mémoire de travail qui consiste en l'habileté d'emmagasiner l'information et de l'utiliser lors de la performance des tâches complexes [151]. Plus spécifiquement, les oscillations gamma (30-80 Hz) sont réputées jouer un rôle important dans la mémoire de travail dans le cerveau normal, en d'autres termes, l'augmentation de la

charge de la mémoire de travail est généralement suivie par une augmentation de synchronisation de la bande gamma [152]. C'est ainsi que l'on a pu noter que chez les patients souffrant de la schizophrénie, les déficits de la mémoire de travail sont accompagnés particulièrement de déficits dans les activités oscillatoires corticales. Cela sous-entend que chez ces patients, l'augmentation de la charge de la mémoire de travail ne génère pas une augmentation dans l'activité gamma [153-155] (**Figure 11**). Longtemps limité par la complexité morphologique, électrophysiologique et de connectivité des synapses de ces interneurons, des études prenant avantage de modèles computationnels et d'autres approches expérimentales ont permis de disséquer les mécanismes pouvant sous-tendre la génération des oscillations synchronisées dans les circuits néocorticaux. Plusieurs évidences convergentes ont notamment aidé à établir que l'activité synchrone des cellules PV (qui, rappelons-le, sont des cellules paniers à décharge rapide) représente la clé de l'émergence des oscillations gamma [156]. D'autres études *in vitro* dans l'hippocampe et le cortex des rongeurs sont venues étayer l'hypothèse d'une implication des cellules PV dans la genèse des oscillations gamma [157]. Le blocage des GABA_ARs provoque la suppression des oscillations gamma, à l'opposé une activation des cellules PV génère les oscillations gamma [158]. D'autres études corrélatives, cette fois-ci *in vivo* ont de façon similaire montré que les cellules PV produisent des potentiels d'actions en phase avec les oscillations gamma dans le néocortex [159]. Toutefois, une relation plus directe a pu être établie entre les cellules PV et les oscillations gamma grâce à l'optogénétique. En effet, une activation optogénétique des cellules PV résulte en une amplification sélective des oscillations gamma, ce qui module les réponses sensorielles dans le cortex somatosensoriel des rats [160] alors que la suppression de leur activité réduit de façon significative voire abolit complètement les oscillations gamma [161]. De plus, les souris dont les cellules PV sont dépourvues de récepteurs NMDA présentaient une altération des rythmes gamma et des déficits dans certains comportements tels que l'habituation, la mémoire de travail

ainsi que l'apprentissage associé [162]. Toutes ces études convergent vers l'idée selon laquelle les courants médiés par les GABA_ARs des cellules PV seraient la source majeure de la synchronisation du circuit, GABA-dépendant, qui sous-tend les oscillations gamma corticales [163]. Bien plus, les études post-mortem des cerveaux de patients souffrant de la schizophrénie supportent l'idée selon laquelle des altérations spécifiques de la transmission GABA sont à l'origine des déficits dans les rythmes gamma signalés dans cette pathologie [164]. Plus spécifiquement, ces études ont rapporté une diminution de l'expression de l'ARNm de GAD67, PV, des sous-unités $\alpha 1$ et δ de GABA_ARs ainsi que du GAT1 (*GABA transporter 1*) dans diverses régions du cerveau [165].

Le spectre de l'autisme, dont fait partie la sclérose tubéreuse, est une maladie neurodéveloppementale très complexe et qui est caractérisée par des déficits dans plusieurs comportements tels que la socialisation, la communication verbale et non-verbale, un intérêt limité à l'environnement immédiat et des comportements stéréotypés répétitifs. Les tissus post-mortem de ces patients ont révélé un dysfonctionnement du système GABAergique sur la base de la réduction notoire des marqueurs tels que la GAD65, GAD67 ainsi que les GABA_ARs et GABA_BRs [166, 167]. En outre, une méta-analyse de l'expression de la protéine PV dans différents modèles expérimentaux de l'autisme a montré une réduction consistante du nombre de cellules PV dans le néocortex de ceux-ci [168]. Tout comme la schizophrénie, les maladies du spectre de l'autisme sont caractérisées par des dysfonctionnements dans la synchronisation neuronale [169]. Toutefois, dans l'autisme, on assiste à une augmentation pathologique des rythmes gamma chez ces patients [170, 171].

Ainsi, les diverses études sur le sujet ont amené à l'établissement des oscillations gamma comme biomarqueurs de cette pathologie. De plus, les anomalies dans les rythmes gamma sont intimement liées aux déficits cognitifs observés dans l'autisme, d'où l'hypothèse

selon laquelle « les cellules PV seraient impliquées dans les comportements déficitaires observés chez les sujets atteints de cette pathologie » [172].

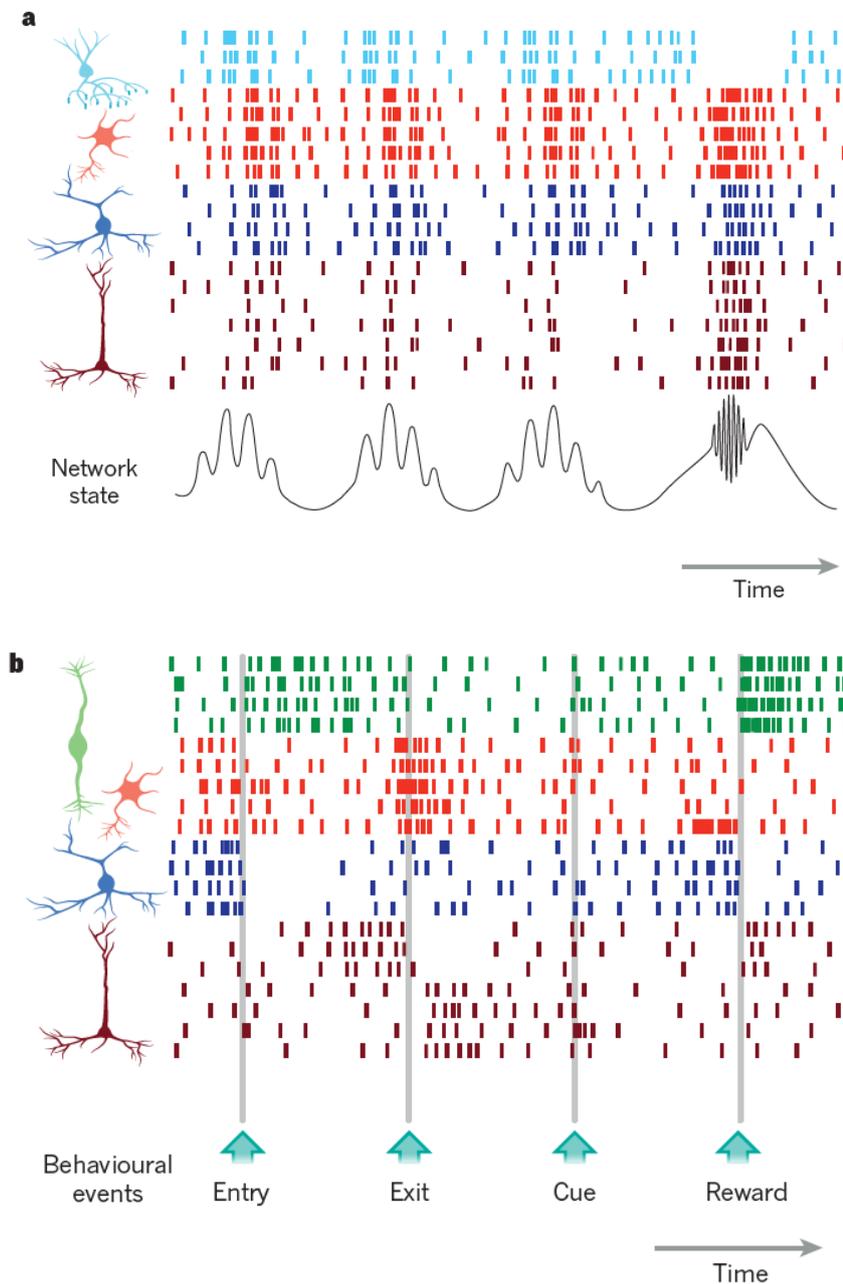


Figure 10: Coordination et contrôle du recrutement des flux. a) Hypothèse de la coordination des circuits par les cellules GABAergiques : le tracé noir montre un potentiel de champ local représentant l'état d'un circuit neuronal de l'hippocampe. La décharge synchronisée de différents types de neurones à savoir les pyramidaux (en brun), les cellules chandelier (en bleu pâle), les cellules à panier (en rouge) et les cellules oriens-lacunosum

moléculaire (en bleu) influencent le potentiel de champ en termes de niveau d'activité. **b)** Hypothèse de contrôle de flux : divers interneurones à l'instar des cellules SST (bleu), les cellules PV (en rouge), les VIP (en vert) et les cellules pyramidales (brun) contrôlent différents états comportementaux. Tirée de Kepecs and Fishell (2014).

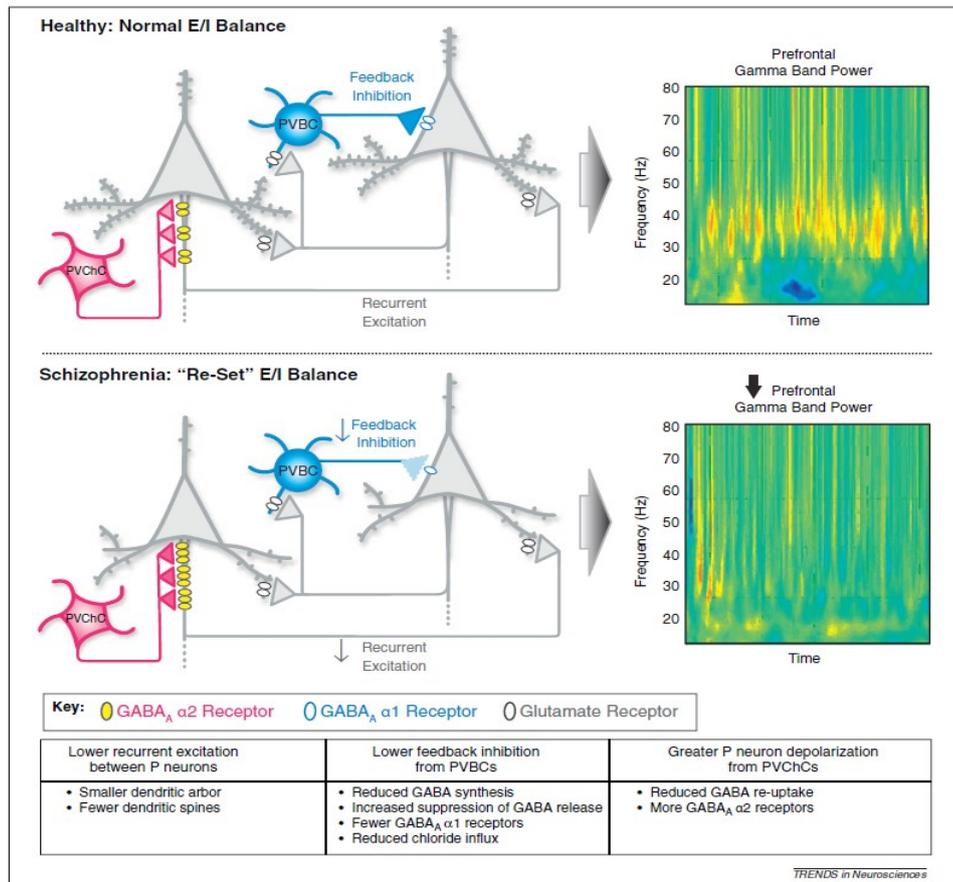


Figure 11: Perte de l'équilibre excitation-inhibition dans la schizophrénie. La connexion entre les neurones pyramidaux (gris), les cellules PV à panier (PVBC) et les cellules chandelier (PVChc) sont critiques dans la génération des oscillations gamma et la force de ces connexions est ajustée pour maintenir une balance E/I adéquate dans le cerveau sain. Dans la schizophrénie, on note une perte de l'équilibre E/I suivie d'un ajustement de ce dernier à un niveau plus bas, ce qui rend le circuit moins efficace pour générer des oscillations gamma. Tirée de Lewis et al (2011).

a. Implication des cellules PV dans les comportements sociaux

Dans la section précédente, nous avons pu établir que dans le cerveau adulte, la fonction majeure des interneurons PV est l'organisation du temps et de l'espace pour la génération des oscillations des réseaux neuronaux qui sont impliquées dans le comportement et diverses fonctions cognitives [138]. De toutes les maladies neurodéveloppementales connues, les maladies du spectre de l'autisme sont celles qui sont prioritairement caractérisées par des anomalies dans les interactions sociales ainsi que la communication. À cet effet, les modèles expérimentaux de l'autisme ont été extensivement utilisés pour investiguer le rôle possible des cellules PV dans les comportements sociaux.

Mentionnons ici que l'incidence de l'autisme est évaluée à environ 1/110. De façon intéressante, plusieurs maladies monogénétiques associées avec l'autisme telles que la neurofibromatose de type 1, la macrocéphalie associée à PTEN, le syndrome de l'X fragile ainsi que la TSC sont toutes caractérisées par une activation de mTORC1 [173]. Par ailleurs, il a été montré que la collybistine et la géphyrine (deux protéines nécessaires au bon fonctionnement des terminaisons post-synaptiques des cellules GABAergiques) inhibent mTORC1 en se liant à ce dernier [174].

Les évidences d'un rôle crucial des cellules PV dans les comportements sociaux proviennent des études d'association à l'échelle du génome et des analyses de co-expression transcriptomiques qui ont révélé que certains gènes spécifiques dont celui de la PV étaient sous-régulés dans divers modèles de l'autisme. En effet, l'on constate de façon systématique une réduction du nombre de cellules PV chez ces animaux [168, 175]. Ce constat a amené les auteurs d'une étude à vouloir investiguer sur l'existence ou non d'un lien direct entre les cellules PV et les interactions sociales. Utilisant une approche des plus drastiques, ces auteurs ont restreint partiellement ou totalement l'expression de la protéine PV dans le cerveau des souris. Ainsi, ces souris, PV^{+/-} et PV^{-/-} respectivement hétérozygotes et homozygotes,

présentaient des déficits dans les interactions sociales révélées par le test à 3 chambres. De manière intéressante, ces souris ne présentaient aucun phénotype relatif à l'anxiété, la dépression et la schizophrénie [175]. Cette étude a certes établi une implication directe des cellules PV dans les comportements sociaux des animaux, néanmoins, il serait judicieux de rappeler que la PV est une protéine liant le calcium, donc importante à la transmission synaptique et aux oscillations gamma tel que décrit dans la section précédente.

De son côté, une autre étude portant sur le modèle du syndrome de Rett (caractérisé par la perte du *methyl-CpG binding protein 2*-MeCP2) qui fait partie du spectre de l'autisme a montré qu'une délétion spécifique de MeCP2 soit dans les cellules PV ou les cellules Somatostatine aboutit à de déficits comportementaux distincts. Ainsi, cette étude a rapporté que seules les souris dont les cellules PV sont dépourvues de MeCP2 présentaient des déficits sociaux établissant la contribution importante de ces dernières dans les comportements sociaux [176]. Par ailleurs, des études récentes ont suggéré le rôle déterminant du cervelet dans la symptomatologie de l'autisme [173]. Or, les cellules de Purkinje et les cellules granuleuses du cervelet expriment également la PV. À cet effet, une délétion de *Tsc1* spécifiquement dans les cellules de Purkinje résultent en des anomalies dans les interactions sociales chez ces animaux [79, 177]. De ces faits, l'on peut conclure qu'outre les cellules PV, la protéine PV en général est importante pour les interactions sociales.

Au-delà des études présentées ici, des dysfonctionnements des cellules PV sous-tendant ceux des interactions sociales ont été établies dans divers autres modèles de l'autisme [178-180]. Inversement, il a été démontré qu'une stimulation des cellules PV est suffisante pour améliorer le comportement social des animaux [181-183].

Les efforts ont été fournis pour déterminer le mécanisme par lequel les cellules PV réguleraient les comportements sociaux. L'on sait aujourd'hui que cela nécessite la sous-unité

NR1 des récepteurs NMDA car une absence de cette dernière dans les cellules PV affecte la sociabilité des animaux [184-186].

b. Les déficits sensoriels tactiles dans l'autisme : les cellules PV y sont-elles impliquées?

Des études autant cliniques que fondamentales ont démontré que l'autisme est une maladie caractérisée aussi par des comportements sensoriels anormaux, de ce fait, les déficits sensoriels sont à présent reconnus en tant qu'un symptôme important de la pathologie et représentent l'un des critères de diagnostic de l'autisme (*DSM-5- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5*). Les réponses atypiques aux stimuli tactiles chez ces patients ont été largement documentées. On y inclut une sous ou sur-sensibilité à la douleur, une sur-sensibilité à un toucher léger et des réactions anormales aux touches sociales. Outre la sensibilité atypique aux stimuli tactiles, on peut également noter des déficits dans la discrimination visuelle et auditive [187-191]. L'absence d'homogénéité de la réponse tactile qu'on obtient chez les individus souffrant de l'autisme rend difficile l'investigation des mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de ces déficits sensoriels. En effet, certaines études ont rapporté que ces personnes montraient une hyper-sensibilité alors que pour d'autres, l'autisme serait caractérisé par une hyposensibilité. Quoiqu'il en soit, une étude récente a trouvé que les patients évaluaient les diverses surfaces examinées comme étant plus rugueuses (avec une plus grande variabilité entre les différentes sessions) comparativement aux sujets contrôles. Les auteurs ont alors conclu que les problèmes sensoriels dans l'autisme résulteraient d'une augmentation de la sensibilité aux différents stimuli ainsi que d'un traitement disparate de l'information sensorielle [192]. Néanmoins, l'autisme ne désignant pas une pathologie en soi mais plutôt un parapluie de conditions ayant des symptômes communs, il est tout à fait logique qu'un consensus soit difficile à trouver.

Les déficits dans la discrimination tactile ont été trouvés dans plusieurs modèles génétiques d'autisme, ce qui permet d'explorer le lien direct ou indirect entre ces gènes et le phénotype sensoriel de l'autisme. Par exemple, l'absence de SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domain 3*) chez les souris entraîne l'apparition de divers comportements relatifs à l'autisme. De plus, ces souris montrent une augmentation de la sensibilité à la douleur (hyperalgésie). De même, les souris ayant une délétion du gène *FMRI* (*fragile X mental retardation 1*) affichent un phénotype similaire à celui des patients souffrant du syndrome de l'X fragile incluant une hyper-sensibilité aux stimuli tactiles. Par contre, dans le syndrome de Rett, on note une insensibilité découlant d'une augmentation du seuil de tolérance de la douleur [193]. Malgré ces avancées faites grâce aux modèles génétiques de l'autisme, le mystère demeure tout entier à savoir : « quels rôles jouent ces différents gènes dans la sensibilité tactile et par quels mécanismes ces déficits sensoriels contribuent-ils aux divers comportements spécifiques à la pathologie? ». Les études précitées ont suggéré que la réponse se trouverait dans le système nerveux périphérique (SNP) et qu'il contribuerait à l'évitement des touches sociales qu'on retrouve dans l'autisme. De manière concrète, une délétion de MeCP2 ou de SHANK3 spécifiquement dans le ganglion de la racine dorsale provoque des déficits comportementaux similaires à ceux caractéristiques de l'autisme y compris une hypersensibilité tactile, auditive et une réduction de la sociabilité. Aussi, chez ces animaux, les auteurs de l'étude ont rapporté une diminution du nombre de cellules PV dans l'amygdale basolatérale ainsi qu'une augmentation (souris *Shank3^{f/+}*) et une diminution (modèle *Mecp2^{f/y}*) du nombre de ces cellules dans le cortex somato-sensoriel, tous deux représentant des régions du cerveau importantes pour les comportements sociaux. De plus, le traitement de ces animaux (restreint au SNP) avec un agoniste de GABA_ARs a été suffisant pour renverser les déficits sensoriels et sociaux observés plus tôt [194, 195]. Ceci constitue l'une des premières preuves

à l'avantage de l'implication des cellules GABAergiques en général et en particulier des cellules PV dans les déficits sensoriels tactiles rapportés dans l'autisme.

Afin de déterminer les altérations du circuit qui sous-tendent le traitement sensoriel atypique de l'autisme, les déficits de l'apprentissage perceptuel et de la discrimination visuelle ont été examinés chez les souris FMR1-KO. Les cellules PV de ces dernières montraient une diminution de leur activité dans le cortex visuel [196].

Ainsi, étant donné le rôle primordial des cellules PV dans le fonctionnement adéquat du cerveau, quelles pourraient-être les répercussions d'une ablation de mTORC1, spécifiquement dans les cellules PV, sur le développement et le fonctionnement adéquat de celles-ci? En d'autres mots, la voie de signalisation mTORC1 est-elle cruciale pour le développement normal de la connectivité de ces cellules et son absence provoquerait-elle des déficits comportementaux?

1.3. Problématique, hypothèse et objectifs de la thèse

Les mutations dans les gènes régulateurs de la voie de signalisation mTORC1, tels que dans le complexe Tsc1/2 sont à l'origine de maladies neurodéveloppementales associées à l'autisme, aux déficiences mentales et à l'épilepsie. Bien que les effets d'une dysfonction de mTORC1 dans les diverses populations neuronales soient critiques dans l'apparition des symptômes neurologiques relatifs aux mutations des régulateurs de mTORC1, l'ampleur de leurs contributions n'est toujours pas bien connue. Plusieurs études ont investigué les effets de la délétion de *Tsc1/2*, résultant en un dysfonctionnement de la voie mTOR, sur les cellules excitatrices de l'hippocampe et du cortex. Cependant, très peu d'entre elles se sont intéressées aux effets d'une délétion de *Tsc1/2* dans le développement des circuits GABAergiques corticaux, plus particulièrement sur l'établissement de la connectivité des cellules PV. Dans les rongeurs et les primates, le développement de la connectivité des cellules PV est un long processus prenant fin autour de l'adolescence. Vues que les mutations dans le gène *Tsc1* résultent en l'apparition de symptômes relatifs à l'autisme, nous défendons la thèse selon laquelle la dérégulation Tsc1-dépendante de la voie mTOR dans les cellules PV engendre une perturbation du développement de la connectivité de ces dernières provoquant des déficits comportementaux. Plus spécifiquement, notre hypothèse de recherche est la suivante : ***Tsc1 est nécessaire au développement postnatal des cellules PV et sa délétion dans celles-ci résulte en des déficits comportementaux.***

Afin de tester notre hypothèse, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* les dysfonctionnements que les synapses formées et reçues par les cellules PV peuvent éventuellement subir dans le contexte d'une dérégulation de la voie mTOR et avons évalué les effets de ces dysfonctionnements sur le comportement des animaux.

Nos objectifs spécifiques de recherche étaient les suivants :

- 1-Caractériser *in vitro* et *in vivo* les effets d'une délétion de *Tsc1* sur les différentes étapes du développement des synapses formées et reçues par les cellules PV.
- 2-Déterminer les phénotypes comportementaux de nos modèles d'études.
- 3-Investiguer les mécanismes moléculaires sous-jacents les effets de l'haploinsuffisance de *Tsc1* sur l'établissement des innervations des cellules PV.
- 4-Évaluer si la dérégulation de mTORC1 dans les cellules PV affecte le traitement de l'information sensorielle caractéristique de plusieurs mTORpathies.
- 5-Déterminer l'existence ou non d'une période critique au cours de laquelle la présence de *Tsc1* serait cruciale et prendre avantage de cette fenêtre critique pour procéder au traitement des animaux dans une perspective de récupération des phénotypes anormaux.

Les résultats de nos travaux constituent l'objet des deux articles qui seront présentés respectivement dans les chapitres II et III.

1) **Sensitive period for rescuing parvalbumin interneurons connectivity and social behavior deficits caused by *TSC1* loss.** Clara A. Amegandjin[#], Mayukh Choudhury[#], Vidya Jadhav, Josianne Nunes Carriço, Ariane Quintal, Martin Berryer, Marina Snappyan, Bidisha Chattopadhyaya, Armen Saghatelian, Graziella Di Cristo. Nature Communications. 2021 Jun 16;12(1):3653. doi: 10.1038/s41467-021-23939-7.

2) **Sensory input modulation rescues alterations in parvalbumin cell connectivity and texture discrimination caused by *Tsc1* haploinsufficiency.** Clara A. Amegandjin, Maria Isabel Carreño-Muñoz, Antoine Farley, Antônia Samia Fernandes do Nascimento, Graziella Di Cristo. Manuscript ready for submission to Journal of Neuroscience.

Chapitre II

Premier Article

Cet article intitulé “**Sensitive period for rescuing parvalbumin interneurons connectivity and social behavior deficits caused by *TSCI* loss**” avait pour objectif principal de disséquer le rôle de la voie mTOR dans le développement et l’établissement des synapses inhibitrices formées par les cellules PV autour des corps cellulaires des cellules pyramidales. Par ailleurs l’hypothèse de travail était qu’une haploinsuffisance ou absence totale de *TSCI* dans les cellules PV affecterait leur développement et impacterait négativement le fonctionnement du cerveau des animaux à l’étude.

Contributions des auteurs

Clara Amegandjin, Mayukh Choudhury, Armen Sagathelyan, Graziella Di Cristo: conception des expériences.

Clara Amegandjin, Mayukh Choudhury, Vidya Jadhav, Marina Snapyan, Bidisha Chattopadhyaya: exécution des expériences.

Clara Amegandjin, Mayukh Choudhury, Vidya Jadhav, Ariane Quintal, Marina Snapyan, Bidisha Chattopadhyaya, Armen Sagathelyan, Graziella Di Cristo: analyse des données.

Josianne Nunes Carriço, Martin Berryer: assistance technique.

Clara Amegandjin, Mayukh Choudhury, Graziella Di Cristo: rédaction du manuscrit.

Tous les auteurs ont révisé le manuscrit.

*Clara Amegandjin et Mayukh Choudhury sont co-premiers auteurs.

Sensitive period for rescuing parvalbumin interneurons connectivity and social behavior deficits caused by *TSC1* loss

Clara A. Amegandjin^{1,2,#}, Mayukh Choudhury^{1,2,#}, Vidya Jadhav^{1,2}, Josianne Nunes Carriço², Ariane Quintal¹, Martin Berryer^{1,2}, Marina Snappyan^{3,4}, Bidisha Chattopadhyaya², Armen Saghatelian^{3,4}, Graziella Di Cristo^{1,2}

Affiliations:

¹ Neurosciences Department, Université de Montréal;

² Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine (CHUSJ) ;

³ CERVO Brain Research Center;

⁴ Department of Psychiatry and Neuroscience, Université de Laval

These authors contributed equally to the study and are listed in alphabetical order

*Corresponding author :

Graziella Di Cristo,

Professor, Department of Neurosciences, Université de Montréal,

Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine,

3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

E-mail: graziella.di.cristo@umontreal.ca

Published: *Nature Communications* volume 12, Article number: 3653 (2021)

2.1. ABSTRACT

The Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) pathway controls several aspects of neuronal development. Mutations in regulators of mTORC1, such as Tsc1 and Tsc2, lead to neurodevelopmental disorders associated with autism, intellectual disabilities and epilepsy. The correct development of inhibitory interneurons is crucial for functional circuits. In particular, the axonal arborisation and synapse density of parvalbumin (PV)-positive GABAergic interneurons change in the postnatal brain. How and whether mTORC1 signaling affects PV cell development is unknown. Here, we show that Tsc1 haploinsufficiency causes a premature increase in terminal axonal branching and bouton density formed by mutant PV cells, followed by a loss of perisomatic innervation in adult mice. PV cell-restricted Tsc1 haploinsufficient and knockout mice show deficits in social behavior. Finally, we identify a sensitive period during the third postnatal week during which treatment with the mTOR inhibitor Rapamycin rescues deficits in both PV cell innervation and social behavior in adult conditional haploinsufficient mice. Our findings reveal a role of mTORC1 signaling in the regulation of the developmental time course and maintenance of cortical PV cell connectivity and support a mechanistic basis for the targeted rescue of autism-related behaviors in disorders associated with deregulated mTORC1 signaling.

2.2. INTRODUCTION

The mechanistic target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) acts as a central hub integrating internal and external stimuli to regulate many critical cellular processes, including cell growth and metabolism, protein synthesis and autophagy¹. mTORC1 signalling has also emerged as an important regulator of brain development and plasticity. De-regulation of mTORC1 signalling network is at the basis of several genetic neurodevelopmental disorders, which share common clinical features, such as epilepsy, autism and other comorbidities^{2,3}. In particular, mutations in the mTORC1 negative regulators TSC1 or TSC2 cause Tuberous Sclerosis Complex (TSC), an autosomal dominant disease associated with high occurrence of epilepsy, intellectual disabilities and autistic traits⁴. Extensive studies on TSC mutations have set the paradigm for monogenic “mTORpathies”, to understand how mTOR dysregulation affects different processes of brain development³ and how these may ultimately lead to cognitive and neurological deficits.

The theory of an increased excitation/inhibition (E/I) ratio as an underlying cause of network hyper-excitability and reduced signal-to-noise in the cortex was initially proposed by Rubenstein and Merzenich as a framework for understanding the pathophysiology of autism⁵. Over the past 15 years, numerous studies have provided evidence that alterations in E/I balance may be involved in many mouse models of monogenetic autism, however the nature of the underlying mechanisms are heterogeneous thus highlighting that it is critical to understand what sort of circuit alterations are caused by specific genetic mutations⁶. While numerous studies have focussed on the effects of *Tsc1/2* deletion, and mTOR dysregulation, on cortical and hippocampal excitatory cells⁷⁻¹⁰, only few studies have addressed whether and how *Tsc1/2* deletion affects cortical GABAergic circuit development¹¹⁻¹⁵. In particular, whether it plays different roles in specific GABAergic populations is not known.

The neocortex is comprised of a diverse group of inhibitory neurons, which differ in morphology, intrinsic physiological properties and connectivity¹⁶. Among them, Parvalbumin (PV) expressing cells, which represent the largest class of cortical interneurons, specifically target the soma and proximal dendrites of pyramidal cells and have been implicated in synchronizing the firing of neuronal populations to generate gamma oscillation¹⁷⁻¹⁹, which in turn allows the cortex to perform precise computational tasks underlying perception, selective attention, working memory and cognitive flexibility in humans and rodents²⁰⁻²³. The development of PV cell circuit connectivity is a prolonged process, terminating around the end of adolescence in rodents and primates²⁴⁻²⁸. PV cells dysfunction has been found in several mouse models of autism²⁹⁻³³. Conversely, stimulating PV cells has been shown to be sufficient to ameliorate social behavior^{29,34,35}. Since mutations in *Tsc1* give rise to autistic traits, we questioned whether and how *Tsc1* deletion selectively in PV cells affects their connectivity, and whether and to what extent these alterations in cortical PV cell circuits might be contributing to changes in social behaviour downstream of altered mTOR signaling.

Here, we used a combination of single-cell genetics in cortical organotypic cultures, conditional mutant mice and high-resolution imaging to investigate the effects of TSC-mTORC1 pathway on the development of PV cell connectivity. We found that mutant PV cells (both heterozygous and homozygous) showed a premature increase of their axonal arbor complexity and bouton density in the first three postnatal weeks, followed by a striking loss of connectivity by adulthood. The effect of *Tsc1* haploinsufficiency or deletion on PV cell connectivity was cell-autonomous. Further, conditional mutant mice showed social behavior deficits. Strikingly, both PV cell connectivity and social behavior in adult mice were rescued by a short treatment with the mTORC1 inhibitor rapamycin during the third postnatal week, suggesting that inhibiting the premature maturation of PV cell innervations was sufficient to ameliorate the long-term neurological outcomes of the mutation.

2.3. RESULTS

2.3.1. TSC1 haploinsufficiency in postnatal PV cells reduced PV cell connectivity and altered social behavior in adulthood.

The maturation of PV cell innervation is a prolonged process that plateaus at the end of the first postnatal month in mouse cortex²⁴. To investigate whether mTORC1 activation plays a role in this process, we first analyzed the time course of pS6 expression, one of the direct downstream effectors of mTORC1, in PV cells identified by PV immunolabeling (Fig. 1a). We found that both the proportion of PV cells expressing pS6 (Fig. 1a, b) and the mean intensity of pS6 signal (Fig. 1c) significantly increased between the third and fourth postnatal weeks in the somatosensory cortex. After the fourth postnatal week, the proportion of PV cells expressing pS6 remained stable (P26: 75±7%, P35: 70±7%; P150: 78±3%, One-way Anova, $p>0.1$; $n=3$ for each age group). To investigate whether the increase of pS6 expression levels was a generalized phenomenon during this developmental window, we quantified pS6 levels in NeuN+ neurons that represent for the most part pyramidal cells in the cortex (Fig. 1d). We found no significant difference in the number of NeuN+ cells expressing pS6 between P18 and P26 (Fig. 1e).

Since this developmental time window coincides with the peak of the formation of rich and complex perisomatic GABAergic synapse innervation^{24,26}, a process that is highly modulated by neuronal activity and sensory experience^{24,27}, we asked whether and how dysregulation of the TSC-mTOR pathway affects the development of PV cell connectivity. To answer this question, we used a transgenic mouse carrying a conditional allele of *Tsc1*³⁶, which allows cell-specific developmental stage restricted manipulation of *Tsc1*, crossed to the mouse line with the Cre allele under the control of the PV promoter (*PV-Cre*^{+/-}). This cross generated PV-cell restricted homozygous (*PV-Cre*^{+/-};*Tsc1*^{flox/flox}) and heterozygous (*PV-Cre*^{+/-}

; *Tsc1^{fllox/+}*) mice and their control *PV-Cre^{-/-}* littermates (*PV-Cre^{-/-}; Tsc1^{fllox/fllox}* and *PV-Cre^{-/-}; Tsc1^{fllox/+}* mice, referred to hereafter as *Tsc1^{Ctrl}*).

To confirm the time course and specificity of Cre expression in *PV-Cre* mice, we used the *RCE^{GFP}* reporter mouse. We observed that about 35% ($35 \pm 8.11\%$; n=4 mice) of all PV cells expressed GFP by P14 in the somatosensory cortex, which rose to around 75% ($80.43 \pm 6.78\%$; n=8 mice) in P20 mice and to 90% ($94.72 \pm 2.22\%$; n=8) in P70 mice, which is consistent with previous findings that PV expression peaks by the 3rd postnatal week. In addition, we confirmed the specificity of Cre expression, since virtually all GFP+ cells expressed PV at all the analyzed ages ($98.60 \pm 0.50\%$ at P14, $98.21 \pm 1.78\%$ at P20; $98.02 \pm 0.49\%$ at P70). To control for the efficiency of *Tsc1* deletion in PV cells, we analyzed both pS6 expression and soma size, since both increase following mTORC1 hyperactivity^{7,37,38}. At P45, we observed a higher proportion of PV cells co-localized with pS6 (Fig. S1a, b) and a 2.5-fold increase in pS6 intensity in PV cell somata from *PV-Cre; Tsc1^{fllox/fllox}* mice (Fig. S1c) as compared to control mice, while the soma size was significantly increased in both mutant genotypes (Fig. S1e). Here, we used pS6 as a proxy measure of mTORC1 activation, however mTORC1 downstream signaling including S6 kinase can be influenced by multiple pathways, which may explain why we could not detect increased pS6 in the PV cell somata of *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}* mice. Alternatively, changes in pS6 might be more localized to specific cellular subdomains in the conditional heterozygous mouse.

To determine if *in vivo* postnatal loss of *Tsc1* leads to defects in PV cell connectivity, we quantified perisomatic PV synapse density by a) immunostaining cortical slices with pre-synaptic (PV) and post-synaptic (gephyrin) markers and b) by EM analysis of PV+ axons and synapses. We found that the density of perisomatic PV+/gephyrin+ punctas was significantly and comparably decreased in mice heterozygous and homozygous for the conditional *Tsc1* allele (Fig. 2a-d). In addition, the density of PV+ terminals and the length of PV+ synapses

was significantly reduced in *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice (Fig. 2e-l) suggesting that PV-cell restricted, postnatal *Tsc1* haploinsufficiency leads to PV cell hypo-connectivity in adult mice. It has been reported that *Tsc1* deletion in cortical GABAergic neurons¹⁴ or Purkinje cells³⁸ leads to neuronal loss in the targeted population. In our hands, we did not observe any difference in cortical PV cell density in our conditional mutant mice vs control littermates (PV/NeuN; *Tsc1^{Ctrl}* mice: 11.5±1.2%, n=6 mice; *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}*: 10.4±1.1%, n=4 mice, *PV-Cre;Tsc1^{lox/lox}*: 11.6±0.4%, n=5 mice), emphasizing that the observed PV cell hypoconnectivity in adult mutant mice was not due to PV cell loss.

To investigate whether *PV-Cre; Tsc1^{lox}* mutants might show abnormal behaviors resembling autism spectrum disorders (ASDs), we evaluated social interaction using the three-chamber assay of social approach and preference for social novelty. In contrast to what observed in wild-type littermates, both heterozygous and homozygous mutant mice showed no significant differences in the time spent interacting with a mouse versus an object (Fig. 2o) or with a novel versus a familiar mouse (Fig. 2p). This phenotype was not due to major motor problems or increased anxiety, since there were no differences in locomotor activity, as tested in the open field (Fig. 2m), and no increased anxiety in the elevated plus maze paradigm (Fig. 2n), between the wild-type and mutant mice. In fact, *PV-Cre;Tsc1^{lox/lox}* but not *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice exhibit less anxiety-like behavior, since they spent significantly more time in the open arms (Fig. 2n). PV cell hypo-connectivity in adult mutant mice could be directly caused by *Tsc1*-mTORC1 signaling dysregulation in PV cells or induced as a consequence of homeostatic feedback mechanisms that influence neural circuit development. We then used both *in vitro* and *in vivo* approaches to determine the cell-autonomous and network phenotypes resulting from the genetic deletion of *Tsc1* in cortical PV cells.

2.3.2. mTORC1 hyperactivation in single PV cells induced a premature increase in bouton density and axon branching, subsequently followed by excessive bouton pruning.

To explore the cell autonomous effects of *Tsc1* deletion or haploinsufficiency during specific developmental phases of PV cell connectivity, we used single cell genetic manipulation in cortical organotypic cultures (Fig. S2a). To reduce *Tsc1* expression in single PV cells and simultaneously labelling their axons and synapses, we used a previously characterized promoter region P_{G67}²⁴ to express either Cre recombinase together with GFP (P_{G67}-GFP/Cre) or GFP alone (control) in single PV cells in cortical organotypic cultures from *Tsc1*^{fllox/fllox} and *Tsc1*^{fllox/+} mice. This approach allowed us to generate specifically *Tsc1*^{-/-} and *Tsc1*^{+/-} PV cells in an otherwise wild-type background. Deletions of either one or both *Tsc1* alleles significantly increased pS6 expression levels in the transfected sparse PV cells (Fig. S2e), while cell soma size was significantly increased only in *Tsc1*^{-/-} PV cells (Fig. S2f).

We have previously shown that the basic features of the mature perisomatic innervation formed by PV cells onto pyramidal cells are recapitulated in cortical organotypic cultures^{24,39}. PV innervation starts out with simple axons, which develop into complex, highly branched arbors in the subsequent 4 weeks with a time course similar to that observed *in vivo*²⁴. In particular, PV cell axonal arborization and bouton density increase significantly between EP18 (P5+13 days *in vitro*=Equivalent Postnatal day 18) and EP24. To investigate the effect of premature mTORC1 activation on PV cell synapse innervation, we biolistically transfected PV cells at EP10 and analyzed them at EP18 (Fig. S2a). Following *Tsc1* deletion, we quantified two aspects of individual PV cell connectivity – 1) the extent of perisomatic innervation around single targeted somata (terminal branching and perisomatic bouton density) and 2) the fraction of potentially innervated somata within the basket cell arbor (percentage of innervation or the innervation field). We have previously shown that the vast majority of GFP-labeled boutons in our experimental conditions most likely represent presynaptic terminals^{24,25,40}. We found that

both *Tsc1*^{-/-} and *Tsc1*^{+/-} PV cells formed premature perisomatic innervations, characterized by increased bouton density (Fig. 3a, b, e, Fig. S3a) and terminal axonal branching around NeuN+ contacted somata (Fig. 3f, Fig. S3b), and increased percentage of contacted target cells (Fig. 3h). To determine whether the effects of *Tsc1* deletion are due to mTORC1 hyperactivation, we treated cortical organotypic cultures with the mTORC1 inhibitor Rapamycin from EP10-18 (90ng/ml, Fig. S4) and found that Rapamycin treatment reversed the increase in bouton density in *Tsc1*^{-/-} PV cells (Fig. S4e) as well as terminal branching (Fig. S4f). All together, these data suggest that mTORC1 hyper activation leads to the premature formation of PV cell innervations in a cell-autonomous manner.

Next, we asked whether the premature development of PV cell innervation was long lasting. As described above, PV cells were transfected at EP10 and then analyzed either at EP24 (Fig. S5, during the peak of the proliferation of PV cell innervation) or at EP34 (Fig. 3 c, d, when PV cell innervation has matured and is stable). At EP24, perisomatic innervation formed by *Tsc1*^{-/-} PV cells were similar to those formed by age-matched wild-type cells (Fig. S5). However, at EP34, *Tsc1*^{-/-} PV cells showed significantly poorer innervations than age-matched *Tsc1*^{+/+} PV cells (Fig. 3e, g, h). All together, these data show that dysregulated TSC-mTORC1 signaling in individual PV cells alters the development of their innervations, inducing first a premature increase in axonal branching and bouton density followed by excessive pruning (Fig. 3i), in a cell-autonomous fashion.

Next, we sought to investigate whether the phenotypic switch of PV cell connectivity caused by *Tsc1* deletion occurs *in vivo*. Since Cre expression in *PVCre* mice starts at around P10 and only peaks towards the fourth postnatal week, we reasoned that the time course of *Tsc1* allele recombination, and its effects on PV cell innervation, could be highly variable between P18 and P24. To overcome this issue, we generated *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1*^{fllox} and control littermates. NKX2.1 is a transcription factor expressed at E10.5 by GABAergic cell

precursors in the medial ganglionic eminence (MGE), which gives rise to cortical PV- and somatostatin-expressing (SST) GABAergic cells⁴¹. At P18, pS6 levels and soma size were significantly increased in PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/fllox}* mouse somatosensory cortex (Fig. S6a-c, e). By P45, PV cells showed a four and two-fold increase in pS6 intensity in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/fllox}* and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/+}* mice compared to control mice, respectively (Fig. S6d). PV cell somata were larger in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/+}* compared to *Tsc1^{Ctrl}* mice, even if not as large as those in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/fllox}* mice (Fig. S6f), suggesting that deletion of one *Tsc1* allele may have slow, cumulative effects *in vivo*, consistent to what is previously reported in Purkinje cell-specific *Tsc1* mutant mice³⁸. A previous study showed that conditional *Tsc1* deletion in GABAergic progenitor cells using *Dlx5/6-Cre* mice leads to reduced cortical GABAergic cell density¹⁴. Conversely, we found no difference in PV cell density between the mutant mice and control littermates at P18 (PV/NeuN; Ctrl mice: 8.9±0.7%; n=3 mice; *Nkx2.1-Cre;Tsc1^{fllox/+}*: 8.1±0.3%; n=3 mice, *Nkx2.1-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*: 7.9±0.3%; n=4 mice). This difference suggests that conditional deletion of *Tsc1* at the time of cell cycle exit (*Nkx2.1-Cre*) has a different impact than removal on the mantle zone (*Dlx5/6-Cre*) on GABAergic neuron survival.

In order to analyze the PV cell axonal morphology at high resolution we turned to organotypic cultures from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/fllox}*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/+}* and *Tsc1^{Ctrl}* mice transfected with P_{G67}-GFP at different developmental stages (Fig. 4, 5). At EP18, before the peak of PV cell synapse proliferation, similar to what we observed with the single cell *Tsc1* deletion, we found that PV cells from both *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/fllox}* and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{fllox/+}* mice formed more complex perisomatic innervations, characterized by increased perisomatic bouton density (Fig. 4a-d) and terminal branching (Fig. 4e) compared to age-matched control PV cells in cultures transfected from *Tsc1^{Ctrl}* mice.

Conversely, at EP34, in a period when PV axonal arbor maturation has reached stability, PV neurons from both genotypes (*Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}*, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}*) showed significantly reduced perisomatic bouton density (Fig. 5a-c, d), terminal branching (Fig. 5e) and innervated a smaller percentage of pyramidal neurons (Fig. 5f). These results are consistent with a recent study showing that pyramidal cell synaptic inhibition is reduced in the hippocampus of adult *Nkx2.1-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice¹⁵. Overall, these results confirm that embryonic deletion of *Tsc1* has opposite effects on PV perisomatic synapse formation and maintenance, initially accelerating the formation of PV synaptic innervation and subsequently impairing perisomatic synapses at the maturation phase. Further, deletion of a single *Tsc1* allele in PV cells is sufficient to alter its connectivity both at the single cell and network levels.

Furthermore, behavioral analysis showed that both heterozygous and homozygous *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox}* mice phenocopied the deficits in social behavior (social approach and social novelty preference) that we found in *PV-Cre;Tsc1^{lox}* mice (Fig. S7), while *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* and *Tg(PV-Cre);Tsc1^{lox/lox}* showed an opposite phenotype in the elevated plus maze, which may be due to the different GABAergic circuits affected in the two mouse lines (*Nkx2.1* is expressed by somatostatin-positive neurons as well) or/and by the different timing of *Tsc1* deletion (embryonal vs postnatal).

2.3.3. Tsc1 deletion in GABAergic cells causes transient autophagy dysfunction in adolescent mice.

A recent study revealed that, in neurons, *Tsc2/1* loss altered the process of autophagy by AMP-activated kinase (AMPK)-dependent mechanisms⁴². To investigate whether autophagy was affected by conditional *Tsc1* deletion in GABAergic interneurons, we analyzed by western blot the expression levels of the autophagosomal lipidated microtubule-associated

protein 1 light chain 2 (LC3-II), of the autophagy substrate p62/sequestosome 1 and of the autophagy-initiating kinase Unc-51-like-kinase (ULK1) in *Tg(Nkx2.1Cre);Tsc1^{flox/flox}* mice compared to that of their control littermates in young and adult mice. Since GABAergic neurons constitute a minority of cortical cells, we extracted proteins from the olfactory bulb where GABAergic cells are highly enriched, to increase the likelihood of detecting small changes in protein expression levels. We found significantly increased levels of LC3-II, but not of p62, in young mutant mice compared to their littermates (Fig. 6a-d). We further found increased activation of AMPK, as indicated by the expression levels of phospho-AMPK (at T172) and a trend towards increased levels of pULK1 (at Ser555; Fig. 6e-g), consistent with what was previously reported⁴². Adult mice, on the other hand, did not show any significant alterations in any of these markers (Fig. 6h-l). To investigate whether GABAergic synapse density in the olfactory bulbs were affected by *Tsc1* deletion, we imaged the external plexiform layer (EPL), since this layer is highly enriched in PV cells⁴³. In the EPL, PV-positive cells are typically axonless and their multipolar dendrites form dendro-dendritic synapses, which can be identified by immunolabeling for the vesicular GABA transporter (VGAT) and gephyrin⁴⁴. Similar to what we observed for cortical PV+Gephyrin+ density (Fig. 2a-d), we found a significant reduction in the density of VGAT+, gephyrin+ puncta in the EPL of adult mice compared to control littermates (Fig. S8).

Overall, these data suggest that *Tsc1* loss in MGE-derived GABAergic cells leads to a dys-regulation of autophagy and of AMPK activation during a critical developmental window, which overlaps temporally with the maturation of PV cell connectivity in the cortex²⁴.

2.3.4. Short-term administration of Rapamycin rescues long-term loss of PV cell innervation in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1flox/+* mice.

So far, our data suggest that *Tsc1* haploinsufficiency in PV cells induces a premature formation of PV perisomatic synapses, which are however not stable and are subsequently lost. We can conceive two mechanisms to explain our observations: 1) *Tsc1*-mTORC1 signaling plays two distinct, opposing and age-dependent roles in PV cells, namely, during the first few postnatal weeks, mTORC1 activation promotes PV cell synapse formation, while later it may actively promote synapse pruning, or 2) mTORC1 hyper-activation during an early postnatal phase promotes PV cell synapse formation and can cause alterations (such as increased AMPK activation and autophagy) that are directly responsible for the synaptic loss occurring at later ages. To test which one of these two mechanisms is more likely to play a role in the loss of adult PV cell connectivity caused by *Tsc1* deletion, we biolistically transfected PV cells in EP26 cortical organotypic cultures prepared from *Tsc1^{flox/flox}* mice with GFP (P_{G67}-GFP/Cre) or GFP alone (control) and analyzed them at EP34 (Fig. 6). We reasoned that if the first scenario was more likely, then late-onset *Tsc1*-deletion in PV cells should still cause loss of PV cell innervations. However, our data showed that the innervations formed by *Tsc1*^{-/-} PV cells are indistinguishable from those formed by age-matched control PV cells for all analyzed parameters, suggesting that TSC1-mTORC1 dysregulation before the third postnatal week is likely responsible for the subsequent loss of PV cell connectivity.

This observation raised the possibility that inhibiting mTORC1 hyperactivation during this critical time window might be sufficient to lead to long-term rescue of PV cell connectivity and, possibly, social behavior deficits. To directly test this hypothesis, we first used an *in vitro* approach by treating organotypic cultures from heterozygous and homozygous mutant mice with rapamycin (90ng/ml) from EP10 to EP18 and analyzing PV cell innervation at EP34. In culture from heterozygous mutant mice, rapamycin treatment reversed the decrease in

perisomatic bouton density (Fig. S9e), terminal axonal branching (Fig. S9f) and percentage of target cell innervations (Fig. S9g) caused by *Tsc1* haploinsufficiency. We noted that rapamycin treatment also significantly reduced the percentage of target cells potentially contacted by PV cells in wild-type cultures (Fig. S9g).

In cultures from homozygous mutant mice, the same rapamycin treatment only partially reversed the decrease in perisomatic bouton density and terminal axonal branching, while it had not significant effect on the percentage of innervation formed by the mutant PV cells (Fig. S10). It is possible that higher rapamycin doses might be required to completely rescue the PV cell innervation phenotype in PV cells from conditional homozygous mice.

Taken together, these data suggest that short-term rapamycin treatment during the early postnatal development can lead to persistent rescue of PV cell connectivity, particularly in case of haploinsufficiency.

Finally, we tested whether short-term rapamycin treatment during early postnatal development can rescue long term effects of *Tsc1* haploinsufficiency *in vivo*. First, we analyzed PV cell perisomatic synapse innervation in the cortex of P21 *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice. Since in our experience, Cre expression does not reach plateau until the 4th postnatal week in the PV-Cre mouse line we used, we generated *PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}* and *PV-Cre;RCE;Tsc1^{fllox/+}* mice, because Cre-dependent GFP expression allowed us to identify perisomatic innervations formed by the PV cells where *Tsc1* recombination had likely already occurred (Fig. 8a-f). Consistently to what we observed in mice with embryonic deletion of *Tsc1* in MGE-derived GABAergic cells, postnatal *Tsc1* haploinsufficiency in PV cells caused a premature increased of PV+ perisomatic synapse density (Fig. 8g).

We then treated *PV-Cre;RCE;Tsc1^{fllox/+}* and their control littermates (*PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}*) daily with either rapamycin (3 mg/kg; i.p.) or vehicle from P14 to P21 and analyzed PV cell perisomatic synaptic density at the end of the treatment (Fig. 9a). We found

that this treatment was sufficient to rescue the premature PV cell hyperconnectivity (Fig. 9n, o).

Finally, we treated *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}*, *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* and control littermates daily with either rapamycin (3 mg/kg; i.p.) or vehicle from P14 to P21 and analyzed PV cell perisomatic synaptic density and social behavior at P45 (Fig. 10a). We found that rapamycin treatment restricted during this specific early developmental time window was sufficient to rescue the density of PV⁺/Geph⁺ puncta to wild-type levels in both hetero and homozygous mutant, adult mice (Fig. 10b-i). In contrast, rapamycin treatment completely rescued social behavior deficits (both social approach and social novelty preference) in conditional heterozygous (*PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}*) but not in conditional homozygous mice (*PV-Cre; Tsc1^{fllox/fllox}*) (Fig. 10l, m).

Since PV is also expressed in Purkinje and granule cells in the cerebellum and Purkinje cell-specific deletion of *Tsc1* has been shown to cause social behavioral deficits³⁸, we looked at cerebellum cyto-architecture, by immunolabeling cerebellar slices from vehicle- and rapamycin-treated mice with Calbindin, PV and NeuN (Fig. S11). While we did not observe any obvious abnormalities in *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice, the cerebellar cellular anatomy of *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* mice was significantly altered. In particular Purkinje cell numbers were greatly reduced and their dendritic arbors severely abnormal, resembling those observed during the first postnatal week. These abnormalities were only partially rescued by rapamycin treatment from P14-21. Thus, cerebellar impairments might contribute to the lack of rescue of social behavior deficits by early rapamycin treatment in the conditional homozygous mice^{38,45}.

In summary, taken together, these data suggest that short-term rapamycin treatment during a critical postnatal window has long-lasting protective effects on GABAergic connectivity and social behavior in the context of *Tsc1* haploinsufficiency, which is typical of TSC patients.

2.4. DISCUSSION

GABAergic circuits play a central role in the social behaviors affected in mTORC1-related neurodevelopmental disorders^{29,34,46}. Here, we used single cell genetic manipulation approaches and genetic mouse models to investigate how dysregulation of mTORC1 signaling affects the development and maintenance of cortical PV GABAergic cells. We found that PV cell-specific haploinsufficiency of *Tsc1*, a key negative regulator of mTORC1 signaling, leads to reduced PV cell connectivity in adult mice, with mutant PV cells forming less and smaller synapses. Mice either haploinsufficient or lacking *Tsc1* in PV cell exhibit altered social behavior. The fact that the conditional heterozygous mice exhibited comparable social behavior dysfunction as the conditional homozygous mice suggest that these findings are relevant for TSC, which is an autosomic dominant disorder.

Based on our data, we hypothesize that the loss of PV cell connectivity in adult mice is dependent on the premature formation of PV cell innervations during a critical, developmental period. First, single-PV cell *Tsc1* deletion with onset at EP10 caused a premature formation of PV cell innervation by EP18, followed by excessive synaptic pruning, while *Tsc1* deletion with onset at EP26, after PV cell innervations are stabilized, did not caused any changes in perisomatic innervations. In particular, the effects of *Tsc1* deletion in single, sparse PV cells in otherwise wild-type organotypic cultures suggest that *Tsc1* acts in a cell autonomous fashion to regulate PV cell innervation. Second, one-week rapamycin treatment from EP10-18 was sufficient to protect long-term PV cell innervation from excessive pruning. Third, consistent with the data *in vitro*, deletion or haploinsufficiency of *Tsc1 in vivo*, with either embryonic (*Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox}* mice) or postnatal (*PV-Cre;RCE;Tsc1^{lox}* mice) onset, leads to premature increases of PV cell perisomatic innervations in pre-adolescent mice followed by a significant loss in adults. On the other hand, *in vivo* rapamycin treatment during a restricted, sensitive period (P14-22) rescued both the premature hyperconnectivity phenotype at P22 and

the loss of PV cell perisomatic synapses in conditional heterozygous adult mice compared to wild-type littermates. Fourth, conditional mutant *Tsc1* mice showed altered autophagy-associated processes at P14, when PV cells are at the peak of their maturation phase^{24,26,27,47} but not at 6 postnatal weeks, when PV cell connectivity has already reached maturity.

Multiple, parallel cellular mechanisms most likely underlie the altered developmental time course of PV cell connectivity. *Tsc1* deletion-mediated mTORC1 hyperactivity may promote growth, via increased protein synthesis^{2,48}. In addition, mTORC1 activation has been shown to affect autophagy. Importantly, autophagy is mechanistically distinct in neurons compared to dividing cells. In fact, most studies on mTORC1 function, which used dividing cells, concluded that mTORC1 activation inhibits autophagy. On the other hand, Di Nardo and colleagues showed that *Tsc1/2*-deficient neurons displayed increased autophagic activity, which was dependent of AMPK activation⁴². Our results are consistent with these findings, since we observed increased AMPK phosphorylation and LC3-II levels, and a trend towards increased ULK1 phosphorylation, in *Tsc1*-deficient GABAergic cells in the olfactory bulb *in vivo*. Compromised autophagy, and accumulation of defective organelles, for example mitochondria, may be one of the downstream causes of PV cell axonal loss and synaptic pruning⁴⁹⁻⁵¹. In addition, AMPK plays a critical role in fine tuning short-term plasticity and maintaining prolonged synaptic efficacy by regulating mitochondria recruitment and positioning to presynaptic sites⁵² and it is possible that altered levels of AMPK activation may contribute to synaptic dysfunction during intensive synaptic activity. Further studies are needed to address the specific effects of AMPK hyper-phosphorylation in *Tsc1* haploinsufficient, cortical PV cells.

A recent study showed that *Tsc1* deletion specifically in somatostatin (SST)-expressing GABAergic interneurons leads to altered firing properties of a percentage of cortical SST neurons in both conditional heterozygous and homozygous mice but to overall reduced

synaptic output only in the conditional homozygous mutants¹², suggesting that the formation and refinement of PV cell synaptic connectivity is more sensitive to *Tsc1* haploinsufficiency than SST neurons even if they both originate from the medial ganglionic eminence. Another group generated *PV-Cre;Tsc1* conditional knockout mice, but in contrast to our findings, found no physiological phenotypes¹¹, thus concluding that most TSC phenotypes arise from excitatory pyramidal neurons. One possible explanation for this discrepancy is that in this study electrophysiological analysis was performed at P28-P30, which is after the phase of premature synapse formation but before synaptic loss might become detectable in *Tsc1* haploinsufficient PV cells. Consistent with this hypothesis, we did not observe significant differences in perisomatic innervations formed by mutant *Tsc1* PV cells in organotypic cultures at EP24 (Fig. S5).

Our data suggest the existence of a sensitive period, namely a time window during which therapy is effective for the treatment of a specific phenotype⁵³, for the treatment of social behavior impairments caused by *Tsc1* haploinsufficiency in PV cells. Strikingly, treatment limited to one week in pre-adolescent mice (P14-22) was sufficient to rescue both cortical PV cell innervation and social behavior deficits in adult *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice. On the other hand, rapamycin treatment was sufficient to rescue cortical PV cell connectivity but not behavioral deficits in homozygous mutant mice, most likely due to the persistence of cerebellar defects. In fact, work from the Sahin's group showed that *Tsc1*-deletion or haploinsufficiency in Purkinje cells was sufficient to cause autistic-like phenotypes in mice³⁸. Interestingly, these cerebellar-dependent social behavior phenotypes could be rescued by continuous rapamycin treatment initiated either at P7³⁸ or at 6 postnatal weeks⁴⁵ in homozygous, Purkinje cell-specific mutant mice. It is possible that the sensitive period to ameliorate the deficits of cell survival and excitability caused by *Tsc1* deletion in Purkinje cells may be well into adolescence, later than that sufficient to rescue the deficits in cortical GABAergic PV interneurons. Alternatively,

the chronic presence of rapamycin might be needed to inhibit the physiological changes in adult mutant Purkinje cells.

Multiple brain regions and neuronal circuits likely contribute to the different cognitive tasks, which underlie social behaviors. Cortical PV cell activity modulates sensory responses^{17,46}, which are required for the development of normal social interaction behaviors⁵⁴. Postmortem analysis of brains from ASD patients as well as animal models for ASD (such as *Mecp2* and *Shank3* mutants) revealed abnormalities in PV cell circuits in multiple brain regions, including primary sensory cortices^{29-33,55-61}. Targeting PV cell circuit impairments might thus be a rational approach to ameliorate social interaction problems, however the developmental and cellular processes that lead to PV cell dysfunction are likely dependent of the underlying etiology.

Our results suggest that *Tsc1* haploinsufficiency in PV cells leads to defects in adult connectivity that can be rescued by targeted treatment during a well-defined postnatal sensitive period. Multiple proteins in mTOR signalling pathway are either high confidence ASD-causative genes or underlie disorders with high ASD comorbidity⁶², therefore highlighting this pathway as a possible etiological hub for the disorder. Whether a similar altered developmental trajectory of PV cell circuit maturation might be common to different mTORopathies remains to be explored. Interestingly, a recent study by Thion and collaborators reported that two different prenatal immune challenges lead to premature maturation of PV cell connectivity followed by reduced PV cell inhibitory drive in adult somatosensory cortex, similarly to what we observed⁶³. Prenatal inflammation has been associated with etiology of several neuropsychiatric disorders, including ASD⁶⁴. It will be interesting to investigate whether maternal immune activation affects PV circuit development by impinging on the Tsc/mTOR pathways.

Finally, while rapamycin, a mTORC1 blocker, was effective in rescuing PV cell connectivity and social behavior deficits in *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice, we cannot exclude that *Tsc1* deletion might have additional effects independent of mTORC1 signalling, since mice carrying hyperactive mTORC1 in Purkinje cells were recently reported to display different behavioral alterations compared to Purkinje-cell specific *Tsc1*-lacking mice⁶⁵. A better understanding of the complexity of mTORC1 signalling network regulation, feedback and compensatory loops, may lead to the discovery of new molecular drug targets.

The mTOR inhibitor everolimus is approved by FDA for the treatment of subependymal giant cell astrocytomas, angiomyolipomas and complex partial seizures in TSC patients. Several recent studies have addressed whether everolimus treatment could have positive effects on cognition and autistic behavior in TSC patients but have so far produced controversial results⁶⁶⁻⁷¹. One important point is that children younger than 4 years old were excluded from these studies. Our data suggests that an early age of onset of the treatment might be critical to improve specific cognitive and behavioral long term outcomes.

2.5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. Elsa Rossignol, Philippe Major (CHU Ste. Justine, Montreal, Canada) and Dr. Fabrice Ango (CNRS, Montpellier, France) for their insightful suggestions and Dr. Guy Doucet (Université de Montréal, Montreal, Canada) for providing reagents for Electron Microscopy. We would like to thank Antônia Samia Fernandes do Nascimento for her technical assistance, Marisol Lavertu-Jolin for writing the scripts for automatic quantification of putative synapses in the olfactory bulb, the Comité Institutionnel de Bonne Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR), all the personnel of the animal facility of the Research Center of CHU Sainte-Justine (Université de Montreal) and the Plateforme Imagerie Microscopique for their instrumental technical support. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (A.S. and G.DC), Canada

Foundation for Innovation (G.DC), Canada Research Chair Program (G.DC), and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). C.A.A. is supported by NSERC fellowship.

2.6. AUTHORS CONTRIBUTION

CAA, MC, AS, GDC designed the experiments. CAA, MC, VJ, MS, BC performed the experiments. CAA, MC, VJ, AQ, MS, BC, AS and GDC analyzed data. JNC and MB provided critical technical support. CAA, MC, GDC wrote the manuscript. All authors read and corrected the manuscript.

2.7. COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

2.8. METHODS

2.8.1. Animals

Tsc1 floxed mice with loxP sites flanking exons 17 & 18 of *Tsc1* gene (*Tsc1^{lox/lox}*) were purchased from Jackson Laboratories (Cat# 005680). Two separate driver mouse lines expressing Cre recombinase, (1) *Tg(Nkx2.1-Cre)*⁴¹, (Jackson Laboratories, Cat# 008661) and (2) *PV-Cre* (Jackson Laboratories, Cat# 008069)⁷² were crossed to the *Tsc1* floxed mice and the respective progenies were backcrossed to generate the heterozygous, homozygous and control genotypes within the same litter. To control for the pattern of expression of Cre, we introduced the RCE allele using *Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/J* mice (Jackson laboratories). The RCE line carries a loxP-flanked STOP cassette upstream of eGFP sequence within the *Rosa26* locus. Removal of the loxP-flanked STOP cassette by Cre-mediated

recombination allows promoter-specific downstream eGFP expression⁷³. All mice were housed under standard pathogen-free conditions in a 12h light/dark cycle with *ad libitum* access to sterilized laboratory chow diet. Animals were treated in accordance with Canadian Council for Animal Care and protocols were approved by the Animal Care Committee of CHU Ste-Justine Research Center.

2.8.2. Mice Genotyping

DNA was extracted from mouse tails and genotyped to detect the presence of Cre alleles and *Tsc1* conditional and wild-type alleles. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the primers listed in Supplementary Table 1. Three separate primers were used for detecting *TSC1* alleles with band sizes of 295bp for the wild-type and 480bp for the floxed allele. Three separate primers were also used for detecting Cre in the *Tg(Nkx2.1-Cre)* breeding; which generated 550bp and 220bp (mutant and wild-type) bands. Primers for detecting Cre in *PV-Cre* generated 400bp and 526bp (mutant and wild-type) bands. To detect the presence of RCE alleles, 3 separate primers were used which generated 350bp and 550bp bands.

2.8.3. Slice culture and biolistic transfection

Slice culture preparation was done as described previously²⁴. Postnatal day 4 or 5 (P4 or P5) mouse pups were decapitated, and brains were rapidly removed and immersed in ice-cold culture medium (DMEM, 20% horse serum, 1 mM glutamine, 13 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.5 µm/ml insulin, 30 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, and 0.001% ascorbic acid). Coronal brain slices obtained starting from the occipital cortex until the end of the somatosensory cortex, 400 µm thick, were cut with a Chopper (Stoelting, Wood Dale, IL). Slices were then placed on transparent Millicell membrane inserts (Millipore, Bedford, MA), usually three to four slices/insert, in 30 mm Petri dishes containing 0.75 ml of culture medium.

Finally, the slices were incubated in a humidified incubator at 34°C with a 5% CO₂-enriched atmosphere and the medium was changed three times per week. All procedures were performed under sterile conditions. Constructs to be transfected were incorporated into “bullets” that were made using 1.6µm gold particles coated with a total of ~50 µg of the DNA(s) of interest. These bullets were used to biolistically transfect slices by Gene gun (Bio-Rad, Hercules, CA) at high pressure (180 Ψ). In order to delete *Tsc1* in single PV cells in an otherwise wild-type background, we transfected organotypic slices from *Tsc1^{fllox/fllox}* mice either with P_{G67}-GFP (*Tsc1^{+/+}*, control PV cells) or P_{G67}-Cre/ P_{G67}-GFP (*Tsc1^{-/-}* PV cells). Organotypic cultures from Tg(*Nkx2.1-Cre^{+/-}*; *Tsc1^{fllox/+}*), Tg(*Nkx2.1-Cre^{+/-}*; *Tsc1^{fllox/fllox}*) and *Tsc1^{Ctrl}* were transfected with P_{G67}-GFP to visualize PV cells. For each experimental group, cortical slices were prepared from at least three mice. The majority of neurons labeled by using the P_{G67} promoter were PV-positive cells^{24,25,74}, while a minority (~10%) were pyramidal cells. Pyramidal cells were recognized by the complexity of their dendritic arbor, including an apical dendrite, and the presence of numerous dendritic spines. PV immunolabeling (see protocol below) was performed to confirm PV cell identity before imaging.

2.8.4. Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially with saline followed by 4% Paraformaldehyde (PFA 4%) in phosphate buffer (PB 0.1M, pH 7.2). Brains were post-fixed with 4% PFA overnight and subsequently transferred to a 30% sucrose solution in sodium phosphate-buffer (PBS) for 48hrs. They were then frozen in molds filled with Tissue Tek using a 2-Methylpentane bath cooled with a mixture of dry ice and ethanol (~ -70°C). Optimal cutting temperature and coronal sections of 40 µm or horizontal sections (40-50 µm for the olfactory bulb) were obtained using a cryostat (Leica VT100). Organotypic cultures were fixed overnight at 4°C in

4% PFA in PB 0.1M, pH 7.2, then washed in PBS, incubated in 30% sucrose/PBS, and subjected to a freeze/thaw cycle at -20°C. Brain sections or organotypic cultures were blocked in 10% normal goat serum (NGS) and 1% Triton X-100 for 2 hr at RT. Slices were then incubated for 48h at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-phospho-S6 (1:1000, Cell Signaling, Cat# 5364), mouse anti-NeuN (1:400, Millipore, Cat# MAB377), chicken anti-NeuN (1:500, Millipore, Cat# ABN91), mouse anti-PV (1:1000, Swant, Cat# 235), rabbit anti-PV (1:1000, Swant, Cat# PV27), guinea pig anti-PV (1:1000, Synaptic Systems, Cat# 195004), mouse anti-gephyrin (1:500, Synaptic Systems, Cat# 147021), mouse anti-Calbindin (1:1000, Abcam, Cat# 9481), rabbit anti-VGAT (1:1000, Synaptic System, Cat #131003), chicken anti-GFP (1:1000, Abcam, Cat# 13970). It was followed by incubation with secondary antibodies for 2h at RT to visualize primary antibodies. The secondary antibodies used were Alexa-Fluor conjugated 488, 555, 594, 633, and 647 (1:400, Life technologies; 1:1000, Cell Signaling Technology). Olfactory bulb sections were stained with DAPI (Life Technologies, Cat# D3571). After rinsing in PBS (three times), the slices were mounted in Vectashield mounting medium (Vector).

2.8.5. Confocal Imaging and Quantitative analysis

All imaging was performed using Leica confocal microscopes (SPE, SP8 or SP8-STED). For PV cell innervation analysis, PV cells were first imaged using 10x (NA0.4) to record the overall cell morphology, and then multiple (2-3) stacks of their axonal fields were acquired using a glycerol immersion 63x (NA1.3) objective at 0.5 or 1 μm z-step in the first 150 μm from the PV cell soma. The complexity of the PV axon branches around a pyramidal cell soma was reported as the average number of intersections, bouton density and percentage of innervated pyramidal cells. The number of intersections represented the intersections between a basket cell axon and the Sholl spheres (9 μm , increment of 1 μm) from the center of

the pyramidal cell soma. Bouton density around each basket cell represented the total number of GFP+ boutons in a radius of 9 μ m from the centre of the pyramidal cell soma. 12-24 pyramidal cells were analyzed for each basket neuron. To determine the percentage of pyramidal innervated by basket cells axon, we quantified the number of pyramidal cells soma that were contacted by the GFP+ axon and divided the later by the total number of somata in a confocal stack field.

For analysis *in vivo*, we imaged somatosensory cortex layers 2/3 and 5/6 using 20X (NA 0.75) and 63X oil (NA1.3) objectives. The 20X objective was used to acquire images for analyzing the percentage of PV/pS6 cellular colocalization, PV+/NeuN+ cell density, GFP+/GFP+PV+ cell density (specificity of PV recombination) and PV+/GFP+PV+ cell density (recombination rate). For the analysis of perisomatic innervation 63x glycerol objective was used to acquire images for quantifying PV and gephyrin puncta. At least three confocal stacks from 3 different brain sections were acquired in layers 2/3 and 5/6 of somatosensory cortex with z-step sizes of 0.5 (for synapse quantification) or 1 μ m (for cell density quantification). Cell soma size and cell density were quantified using NeuroLucida (MBF Software). Fluorescence intensity of pS6 signal in PV cells was calculated using ImageJ or LAS X (Leica Application Suite X) software. In LAS X, 8 to 10 cells were chosen on various focal plane and encircled by using the polygon tool. This process generated the mean gray values of each cell. On the other hand, the mean gray values of four spots without any staining from the same focal plane were used as background, which were removed in order to normalize the data. For each animal, three sections were used in order to minimize the variability across the different groups. PV+, gephyrin+, and PV+/gephyrin+ puncta were counted around NeuN positive somata after selecting the confocal plane with the highest soma circumference using NeuroLucida and ImageJ-Fiji softwares. At least 6-10 NeuN positive somata were selected in each confocal stack.

To analyze olfactory bulb, we imaged the external plexiform layer (EPL) of adult (~ 2 months) mice of both sexes using a 100X (NA 1.4, oil immersion) objective, zoom 1.5. We analyzed four sections per animal, by choosing four to five regions of interest (ROI, 30×30 μm²) in each of the confocal stack and quantifying VGAT+, gephyrin+ puncta using ImageJ-Fiji software. Investigators were blind to the genotypes during the analysis.

2.8.6. Electron microscopy

The electron microscopy was carried out on 2 groups, *Tsc1*^{Ctl} and *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+} mice, at P60. Mice were anesthetized and perfused with 0.1M PBS (0.9% NaCl in PB 0,2M; pH 7.4) followed by 2,5% glutaraldehyde + 2% PFA in 0.1M PB, pH 7.4. Following perfusion, the brains were further fixed for 2 hours at room temperature (RT) in the perfusion solution. Transverse 50-μm-thick sections of the brain were cut in cooled PBS with a vibratome (Leica, VT1000S). They were stored at -20°C in antifreeze solution (40% PB, 30% ethylene glycol, 30% glycerol) until used. Sections were immersed in 0.1% borohydride (in PBS) for 15 min at room temperature (RT), washed in PBS, and processed freely floating following a pre-embedding immunoperoxidase protocol previously described⁷⁵. Briefly, after rinsing in PBS, sections were preincubated (1-hour) at RT in a protein blocking solution (Expose Rabbit-Specific HRP/DAB detection IHC Kit, Abcam, Cambridge, UK, ab80437). Then, the sections were incubated for 48 hours at 4°C with rabbit anti-PV (1:1000, Swant, Cat# PV27) in PBS containing 1% NGS, followed by wash (three times in PBS) and incubation for 45 min at RT, in goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Abcam, Expose Kit, Cat# ab80437). After rinsing in PBS, immunoreactivity was visualized with hydrogen peroxide in the presence of di-aminobenzodine (DAB Chromogen, Abcam Expose Kit, Cat# ab80437). Thereafter, sections were rinsed in PB, postfixed flat in 1% osmium tetroxide for 1 hour and

dehydrated in ascending concentrations of ethanol (50%, 70%, 90%, 100%, and finally in ethanol anhydrous). They were then treated with propylene oxide and then impregnated in resin overnight (Durcupan ACM; Sigma) at RT, mounted on a clear embedding film (EMS, Hatfield, PA) and cured at 55°C for 48 hours. Areas of interest from the somatosensory cortex (layers 5/6) were excised from the embedded sections and glued to the tip of prepolymerized resin blocks. Ultrathin (50-70 nm) sections were cut with an ultramicrotome (Reichert UltracutS, Leica, Wetzlar, Germany), collected on bare 150 square-mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), stained with lead citrate, and examined at 80 KV with a Philips CM100 electron microscope, equipped with an 8 MB digital camera (AMT XR80).

To analyze the electron microscopy data, cellular profiles were identified according to well established criteria⁷⁵. All PV labeled structures were classified in different categories such as: dendritic shafts, axons and axon terminals. All the subcellular profiles that were difficult to identify were classified as “unknown”. To provide a better appraisal of the frequency of each type of cellular elements displaying immunolabelling, about eighty to hundred micrographs were randomly taken at 25000X in each animal, corresponding to a total surface of ~ 2000 μm^2 . Labeled profiles were counted in all micrographs. Results were expressed as number of immunopositive profiles per 100 μm^2 of neuropil then normalized over results from the control mice. The area of neuropil and synapses lengths were measured using NeuroLucida (MicroBrightField).

2.8.7. Western Blot

Whole lysate proteins were extracted from the olfactory bulb where GABAergic cells are highly enriched. The olfactory bulbs of *Tsc1*^{Ctrl} and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1*^{flx/flx} mice were dissected at P14 and P40 and snap frozen in liquid nitrogen. The tissue was then incubated in lysis buffer (150mM sodium chloride, 1% Triton x-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1%

SDS, 50mM TrisHCl, pH 8, 2mM EDTA supplemented with a protease inhibitor cocktail III (Calbiochem)). The concentration of total protein was measured using the Bradford assay (BioRad). Proteins were separated on Novex Tris-Glycine 16% or NuPage Bis-Tris 4-12% protein gels (Invitrogen) in SDS running buffer and were transferred to PVDF membranes (BioRad). The following primary antibodies were used: rabbit anti-LC3B (1:1000, Novus, Cat #NB100-2220), rabbit anti-p62 (1:500, Proteintech, Cat# 18420-1-AP), rabbit anti-pAMPK (1:800, T172, Cell Signaling, Cat# 2535), rabbit anti-AMPK (1:1000, Cell Signaling, Cat#2532), rabbit anti-ULK1 (1:1000, D8H5; Cell Signaling, Cat# 8054), anti-pULK1 (1:1000, Ser555, D1H4; Cell Signaling, Cat# 5869) and mouse anti-GAPDH (1:5000, ThermoFisher, Cat# MA5-15738). Bands were quantified using Image J software. The intensity of LC3 and p62 bands was normalized over the intensity of the GAPDH band. pAMPK and pULK1 bands were further normalized over total AMPK and ULK1 levels, respectively.

2.8.8. Rapamycin treatment

For *in vitro* experiments, organotypic cultures were prepared from Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Tsc1*^{fllox} mice and were treated with Rapamycin from equivalent postnatal day 10 (EP10) to EP18. Rapamycin (90ng/ml, LC Laboratories, Woburn, MA, U.S.A.) was dissolved in the culture medium, which was changed every 48 hrs. For each mouse, half of the organotypic cultures were treated with rapamycin while the other half remained in regular culture medium, hence allowing us to have internal controls.

For *in vivo* treatment, rapamycin was administered daily (3 mg/kg; i.p.) to *PV-Cre*; *Tsc1*^{fllox} pups from P14 to P21. Rapamycin stock solution (20 mg/ml in 100% ethanol) was stored at -20°C. Before injection, stock solution was diluted in 5% Tween 80 and 5% polyethylene glycol 400 to a final concentration of 1 mg/ml rapamycin in 4% ethanol⁷⁶.

2.8.9. Mouse behavior tests

Investigators were blind to genotype during both testing and analysis. Mice of both sexes were used in all experiments.

Open Field: A mouse was placed at the center of the open-field arena and the movement of the mouse was recorded by a video camera for 10 min. The recorded video file was later analyzed with the SMART video tracking system (v3.0, Harvard Apparatus). To measure exploratory behavior, total distance travelled during the 10 minutes period, and the time spent in the centre versus the periphery was calculated. The open field arena was cleaned with 70% ethanol and wiped with paper towels between each trial.

Elevated plus maze: The apparatus consists of two open arms without walls across from each other and perpendicular to two closed arms with walls joining at a central platform. A mouse was placed at the junction of the two open and closed arms. Time spent in the open versus closed arms was video recorded for 5 min. Recordings were scored to measure time spent in open arms, closed arms and center regions respectively.

3 chamber social approach and social novelty tests: Mice (P45-60) were placed in the middle of the central chamber and allowed to explore all the chambers for 10 min for habituation. After habituation, a wire cage containing an unfamiliar conspecific of the same sex and age (Stranger 1) was placed inside one chamber, while an empty wire cage was placed in the second chamber. Mice were allowed to freely explore the three chambers of the apparatus for 10 min. Social approach was evaluated by quantifying the time spent by the test mice with the object or the mouse in each chamber during the 10 min session. At the end of 10min, a new unfamiliar mouse of the same sex and age (Stranger 2) was placed in the previously unoccupied wire cage and the test mouse observed for an additional 10 min to assess social novelty. Social novelty was evaluated by quantifying the time spent by the test mouse with either the familiar mouse

(Stranger 1) or the newer mouse (Stranger 2) in each chamber during the third 10 min session. Strangers 1 and 2 originated from different home cages and had never been in physical contact with the test mice or with each other. Mice that stayed for the full 10 minutes' session in only one chamber were excluded from the analysis.

2.8.10. Statistics and reproducibility

All experiments were repeated independently at least two times. All the statistical analyses were performed using Prism 7.0 (GraphPad Software). Prior to making comparisons across values, the normality of distribution was tested using D'Agostino-Pearson test. Differences between 2 experimental groups was assessed using two-tailed t-test or t-test with Welch's correction (for small sample size) for normally distributed data and Mann Whitney test for not normally distributed data. Differences between 3 or more experimental groups were assessed with One-way ANOVA and post hoc comparison. For non-normally distributed data, nonparametric Kruskal–Wallis One-way ANOVA test was used. In experiments involving Rapamycin treatment and social behavior, Two-way ANOVA with post hoc analysis was used. Cumulative distributions were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test. All bar graphs represent mean \pm SEM.

2.9. DATA AVAILABILITY

Detailed statistic and all data generated and analyzed in the article are available from the corresponding author upon request.

2.10. REFERENCES

- 1 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **169**, 361-371, doi:10.1016/j.cell.2017.03.035 (2017).
- 2 Costa-Mattioli, M. & Monteggia, L. M. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* **16**, 1537-1543, doi:10.1038/nn.3546 (2013).
- 3 Lipton, J. O. & Sahin, M. The neurology of mTOR. *Neuron* **84**, 275-291, doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034 (2014).
- 4 Crino, P. B., Nathanson, K. L. & Henske, E. P. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* **355**, 1345-1356, doi:10.1056/NEJMra055323 (2006).
- 5 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).
- 6 Sohal, V. S. & Rubenstein, J. L. R. Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* **24**, 1248-1257, doi:10.1038/s41380-019-0426-0 (2019).
- 7 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/nn1566 (2005).
- 8 Bateup, H. S., Takasaki, K. T., Saulnier, J. L., Deneffio, C. L. & Sabatini, B. L. Loss of Tsc1 in vivo impairs hippocampal mGluR-LTD and increases excitatory synaptic function. *J Neurosci* **31**, 8862-8869, doi:10.1523/JNEUROSCI.1617-11.2011 (2011).
- 9 Bateup, H. S. *et al.* Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of tuberous sclerosis. *Neuron* **78**, 510-522, doi:10.1016/j.neuron.2013.03.017 (2013).
- 10 Nie, D. *et al.* The Stress-Induced Atf3-Gelsolin Cascade Underlies Dendritic Spine Deficits in Neuronal Models of Tuberous Sclerosis Complex. *J Neurosci* **35**, 10762-10772, doi:10.1523/JNEUROSCI.4796-14.2015 (2015).
- 11 Zhao, J. P. & Yoshii, A. Hyperexcitability of the local cortical circuit in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Mol Brain* **12**, 6, doi:10.1186/s13041-019-0427-6 (2019).
- 12 Malik, R. *et al.* Tsc1 represses parvalbumin expression and fast-spiking properties in somatostatin lineage cortical interneurons. *Nat Commun* **10**, 4994, doi:10.1038/s41467-019-12962-4 (2019).
- 13 Artinian, J. *et al.* Regulation of Hippocampal Memory by mTORC1 in Somatostatin Interneurons. *J Neurosci* **39**, 8439-8456, doi:10.1523/JNEUROSCI.0728-19.2019 (2019).
- 14 Fu, C. *et al.* GABAergic interneuron development and function is modulated by the Tsc1 gene. *Cereb Cortex* **22**, 2111-2119, doi:10.1093/cercor/bhr300 (2012).

- 15 Haji, N. *et al.* Tsc1 haploinsufficiency in Nkx2.1 cells upregulates hippocampal interneuron mTORC1 activity, impairs pyramidal cell synaptic inhibition, and alters contextual fear discrimination and spatial working memory in mice. *Mol Autism* **11**, 29, doi:10.1186/s13229-020-00340-7 (2020).
- 16 Fishell, G. & Rudy, B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Annu Rev Neurosci* **34**, 535-567, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113717 (2011).
- 17 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).
- 18 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).
- 19 Takada, N. *et al.* A developmental cell-type switch in cortical interneurons leads to a selective defect in cortical oscillations. *Nat Commun* **5**, 5333, doi:10.1038/ncomms6333 (2014).
- 20 Fries, P., Neuenschwander, S., Engel, A. K., Goebel, R. & Singer, W. Rapid feature selective neuronal synchronization through correlated latency shifting. *Nat Neurosci* **4**, 194-200, doi:10.1038/84032 (2001).
- 21 Howard, M. W. *et al.* Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cereb Cortex* **13**, 1369-1374, doi:10.1093/cercor/bhg084 (2003).
- 22 Cho, R. Y., Konecky, R. O. & Carter, C. S. Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19878-19883, doi:10.1073/pnas.0609440103 (2006).
- 23 Fries, P. Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annu Rev Neurosci* **32**, 209-224, doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135603 (2009).
- 24 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).
- 25 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).
- 26 Baho, E. *et al.* p75 Neurotrophin Receptor Activation Regulates the Timing of the Maturation of Cortical Parvalbumin Interneuron Connectivity and Promotes Juvenile-like Plasticity in Adult Visual Cortex. *J Neurosci* **39**, 4489-4510, doi:10.1523/JNEUROSCI.2881-18.2019 (2019).
- 27 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).

- 28 Fish, K. N., Hoftman, G. D., Sheikh, W., Kitchens, M. & Lewis, D. A. Parvalbumin-containing chandelier and basket cell boutons have distinctive modes of maturation in monkey prefrontal cortex. *J Neurosci* **33**, 8352-8358, doi:10.1523/JNEUROSCI.0306-13.2013 (2013).
- 29 Selimbeyoglu, A. *et al.* Modulation of prefrontal cortex excitation/inhibition balance rescues social behavior in CNTNAP2-deficient mice. *Sci Transl Med* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aah6733 (2017).
- 30 Mierau, S. B., Patrizi, A., Hensch, T. K. & Fagiolini, M. Cell-Specific Regulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Maturation by Mecp2 in Cortical Circuits. *Biol Psychiatry* **79**, 746-754, doi:10.1016/j.biopsych.2015.05.018 (2016).
- 31 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).
- 32 Patrizi, A. *et al.* Accelerated Hyper-Maturation of Parvalbumin Circuits in the Absence of MeCP2. *Cereb Cortex*, doi:10.1093/cercor/bhz085 (2019).
- 33 Vogt, D. *et al.* Mouse Cntnap2 and Human CNTNAP2 ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV+ Cortical Interneurons. *Cereb Cortex* **28**, 3868-3879, doi:10.1093/cercor/bhx248 (2018).
- 34 Yizhar, O. *et al.* Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**, 171-178, doi:10.1038/nature10360 (2011).
- 35 Cao, W. *et al.* Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice. *Neuron* **98**, 670, doi:10.1016/j.neuron.2018.04.025 (2018).
- 36 Kwiatkowski, D. J. *et al.* A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Hum Mol Genet* **11**, 525-534, doi:10.1093/hmg/11.5.525 (2002).
- 37 Meikle, L. *et al.* A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *J Neurosci* **27**, 5546-5558, doi:10.1523/JNEUROSCI.5540-06.2007 (2007).
- 38 Tsai, P. T. *et al.* Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* **488**, 647-651, doi:10.1038/nature11310 (2012).
- 39 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).
- 40 Wu, X. *et al.* GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons. *J Neurosci* **32**, 331-343, doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-11.2012 (2012).
- 41 Xu, Q., Tam, M. & Anderson, S. A. Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol* **506**, 16-29, doi:10.1002/cne.21529 (2008).

- 42 Di Nardo, A. *et al.* Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1. *Hum Mol Genet* **23**, 3865-3874, doi:10.1093/hmg/ddu101 (2014).
- 43 Imai, T. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* **35**, 180-188, doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.012 (2014).
- 44 Matsuno, T., Kiyokage, E. & Toida, K. Synaptic distribution of individually labeled mitral cells in the external plexiform layer of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* **525**, 2611, doi:10.1002/cne.24224 (2017).
- 45 Tsai, P. T. *et al.* Sensitive Periods for Cerebellar-Mediated Autistic-like Behaviors. *Cell Rep* **25**, 357-367 e354, doi:10.1016/j.celrep.2018.09.039 (2018).
- 46 Cao, W. *et al.* Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice. *Neuron* **97**, 1253-1260 e1257, doi:10.1016/j.neuron.2018.02.001 (2018).
- 47 Okaty, B. W., Miller, M. N., Sugino, K., Hempel, C. M. & Nelson, S. B. Transcriptional and electrophysiological maturation of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *J Neurosci* **29**, 7040-7052, doi:10.1523/JNEUROSCI.0105-09.2009 (2009).
- 48 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 (2017).
- 49 Ebrahimi-Fakhari, D. *et al.* Impaired Mitochondrial Dynamics And Mitophagy In Neuronal Models Of Tuberous Sclerosis Complex. *Cell Rep* **17**, 2162, doi:10.1016/j.celrep.2016.10.051 (2016).
- 50 Tang, G. *et al.* Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* **83**, 1131-1143, doi:10.1016/j.neuron.2014.07.040 (2014).
- 51 Hui, K. K. & Tanaka, M. Autophagy links MTOR and GABA signaling in the brain. *Autophagy* **15**, 1848-1849, doi:10.1080/15548627.2019.1637643 (2019).
- 52 Li, S., Xiong, G. J., Huang, N. & Sheng, Z. H. The cross-talk of energy sensing and mitochondrial anchoring sustains synaptic efficacy by maintaining presynaptic metabolism. *Nat Metab* **2**, 1077-1095, doi:10.1038/s42255-020-00289-0 (2020).
- 53 LeBlanc, J. J. & Fagiolini, M. Autism: a "critical period" disorder? *Neural Plast* **2011**, 921680, doi:10.1155/2011/921680 (2011).
- 54 Orefice, L. L. *et al.* Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. *Cell* **166**, 299-313, doi:10.1016/j.cell.2016.05.033 (2016).
- 55 Orefice, L. L. *et al.* Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. *Cell* **178**, 867-886 e824, doi:10.1016/j.cell.2019.07.024 (2019).

- 56 Zikopoulos, B. & Barbas, H. Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism. *Front Hum Neurosci* **7**, 609, doi:10.3389/fnhum.2013.00609 (2013).
- 57 Nelson, S. B. & Valakh, V. Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* **87**, 684-698, doi:10.1016/j.neuron.2015.07.033 (2015).
- 58 Tomassy, G. S., Morello, N., Calcagno, E. & Giustetto, M. Developmental abnormalities of cortical interneurons precede symptoms onset in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurochem* **131**, 115-127, doi:10.1111/jnc.12803 (2014).
- 59 Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C. & Martinez-Cerdeno, V. The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. *Cereb Cortex* **27**, 1931-1943, doi:10.1093/cercor/bhw021 (2017).
- 60 Fukuda, T., Itoh, M., Ichikawa, T., Washiyama, K. & Goto, Y. Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of *Mecp2*-deficient mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 537-544, doi:10.1093/jnen/64.6.537 (2005).
- 61 Filice, F., Vorckel, K. J., Sungur, A. O., Wohr, M. & Schwaller, B. Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Mol Brain* **9**, 10, doi:10.1186/s13041-016-0192-8 (2016).
- 62 O'Roak, B. J. *et al.* Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* **338**, 1619-1622, doi:10.1126/science.1227764 (2012).
- 63 Thion, M. S. *et al.* Biphasic Impact of Prenatal Inflammation and Macrophage Depletion on the Wiring of Neocortical Inhibitory Circuits. *Cell Rep* **28**, 1119-1126 e1114, doi:10.1016/j.celrep.2019.06.086 (2019).
- 64 Estes, M. L. & McAllister, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science* **353**, 772-777, doi:10.1126/science.aag3194 (2016).
- 65 Sakai, Y. *et al.* Hyperactivation of mTORC1 disrupts cellular homeostasis in cerebellar Purkinje cells. *Sci Rep* **9**, 2799, doi:10.1038/s41598-019-38730-4 (2019).
- 66 Hwang, S. K. *et al.* Everolimus improves neuropsychiatric symptoms in a patient with tuberous sclerosis carrying a novel TSC2 mutation. *Mol Brain* **9**, 56, doi:10.1186/s13041-016-0222-6 (2016).
- 67 Kilincaslan, A. *et al.* Beneficial Effects of Everolimus on Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in a Group of Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *J Child Adolesc Psychopharmacol* **27**, 383-388, doi:10.1089/cap.2016.0100 (2017).

- 68 Krueger, D. A. *et al.* Everolimus for treatment of tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders. *Ann Clin Transl Neurol* **4**, 877-887, doi:10.1002/acn3.494 (2017).
- 69 Mizuguchi, M. *et al.* Everolimus for epilepsy and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: EXIST-3 substudy in Japan. *Brain Dev* **41**, 1-10, doi:10.1016/j.braindev.2018.07.003 (2019).
- 70 Ess, K. C. & Franz, D. N. Everolimus for cognition/autism in children with tuberous sclerosis complex: Definitive outcomes deferred. *Neurology* **93**, 51-52, doi:10.1212/WNL.0000000000007744 (2019).
- 71 Overwater, I. E. *et al.* A randomized controlled trial with everolimus for IQ and autism in tuberous sclerosis complex. *Neurology* **93**, e200-e209, doi:10.1212/WNL.0000000000007749 (2019).
- 72 Runyan, C. A. *et al.* Response features of parvalbumin-expressing interneurons suggest precise roles for subtypes of inhibition in visual cortex. *Neuron* **67**, 847-857, doi:10.1016/j.neuron.2010.08.006 (2010).
- 73 Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T. & Fishell, G. Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb Cortex* **19 Suppl 1**, i1-10, doi:10.1093/cercor/bhp038 (2009).
- 74 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).
- 75 Tremblay, M. E. *et al.* Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* **501**, 691-702, doi:10.1002/cne.21263 (2007).
- 76 Buckmaster, P. S. & Wen, X. Rapamycin suppresses axon sprouting by somatostatin interneurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **52**, 2057-2064, doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03253.x (2011).

2.11. FIGURES

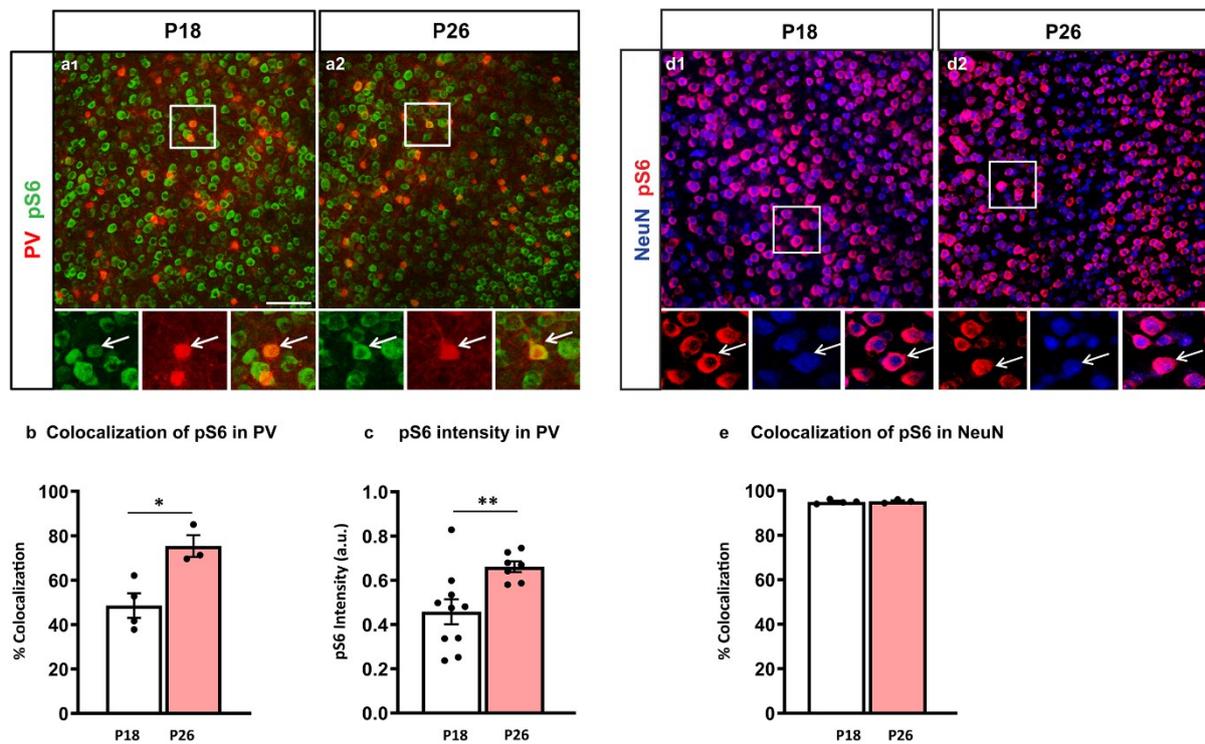


Figure 1. pS6 expression levels increase specifically in PV cells between the second and fourth postnatal weeks.

a, Coronal sections of mouse somatosensory cortex immunostained for pS6 (green) and PV (red) at P18 (**a1**) and P26 (**a2**). **b**, Number of PV cells expressing detectable levels of pS6 increases during the 2nd to 4th postnatal week (Welch's t-test, * $p=0.0152$). Number of mice; P18, $n=4$; P26, $n=3$. **c**, mean pS6 intensity in individual PV cells is significantly higher at P26 than at P18 (Welch's t-test, ** $p=0.0061$). Number of mice; P18, $n=10$; P26 $n=7$. **d**, Coronal sections of mouse somatosensory cortex immunostained for pS6 (red) and NeuN (blue) at P18 (**d1**) and P26 (**d2**). **e**, Percentage of colocalization of pS6 and NeuN is not significantly different between the two developmental ages (Welch's t-test, $p=0.7663$). Number of mice; P18, $n=4$; P26, $n=3$. Scale bars in **a1-a2**, **d1-d2**, 75 μ m. Data represent mean \pm SEM.

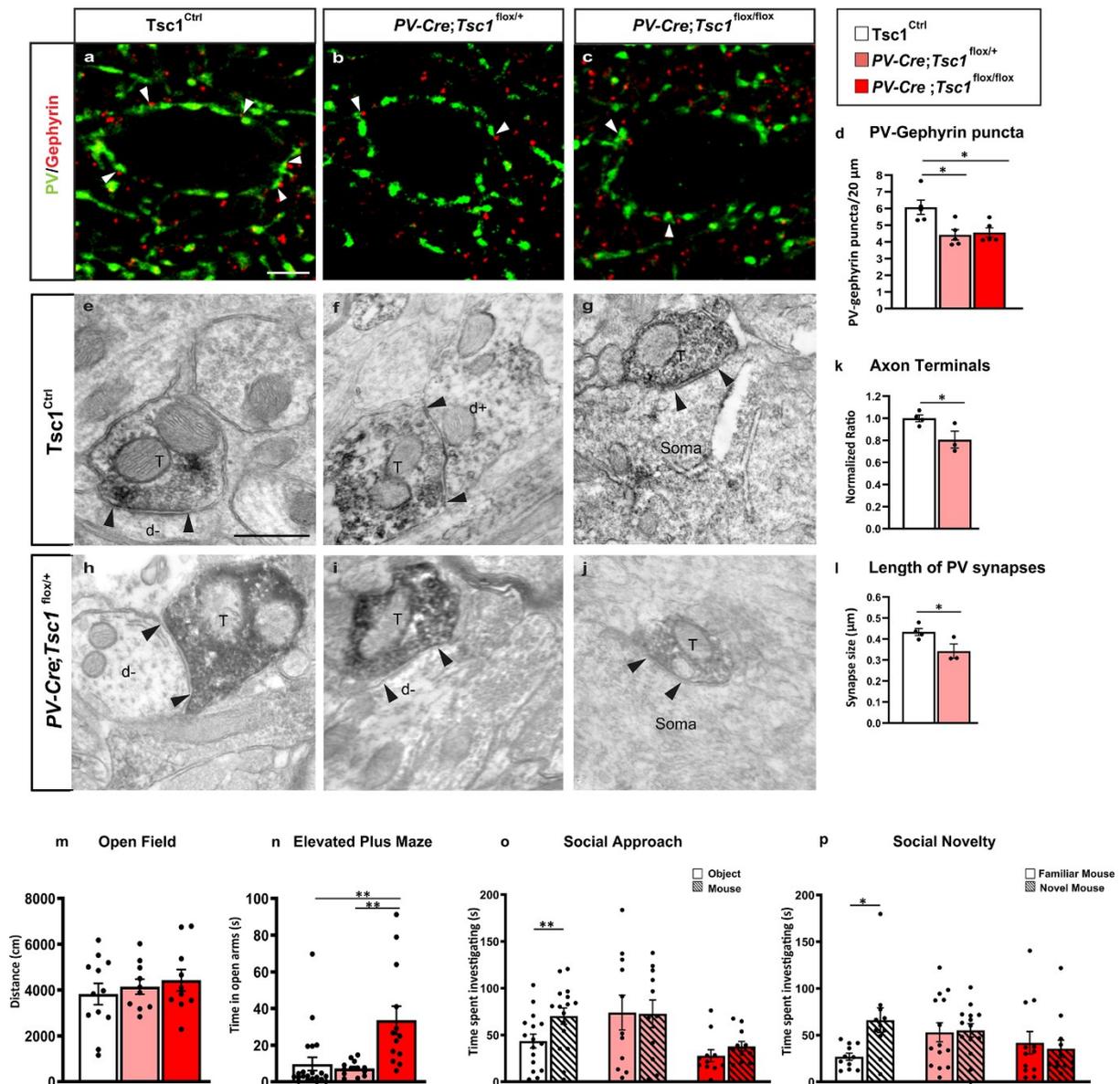


Figure 2. Tsc1 knockout in PV cells causes PV cell hypo-connectivity and social behavioral deficits in young adult mice.

a-c, Somatosensory cortex coronal sections immunostained for PV (green) and gephyrin (red) from P60 *Tsc1*^{Ctrl} (**a**), *PV-Cre;Tsc1*^{lox/+} (**b**) and *PV-Cre;Tsc1*^{lox/lox} mice (**c**). White arrowheads indicate PV-gephyrin colocalized boutons. **d**, PV/gephyrin colocalized puncta (One-way ANOVA, **p*=0.0096; Tukey's multiple comparisons test: *Tsc1*^{Ctrl} vs *PV-Cre;Tsc1*^{lox/+} **p*=0.0140; *Tsc1*^{Ctrl} vs *PV-Cre;Tsc1*^{lox/lox} **p*=0.0236), *n*=5 mice for all genotypes. Scale bar: 10 μ m. **e-j**, PV-immunolabeled axon terminals in somatosensory cortex of *Tsc1*^{Ctrl} (**e, f, g**) and *PV-Cre;Tsc1*^{lox/+} (**h, i, j**) mice. **k**, Axon Terminals (Normalized Ratio). **l**, Length of PV synapses (Synapse size (μ m)). **m** Open Field (Distance (cm)). **n** Elevated Plus Maze (Time in open arms (s)). **o** Social Approach (Time spent investigating (s)). **p** Social Novelty (Time spent investigating (s)).

PV-Cre;Tsc1^{fllox/+} (**h, i, j**) mice. **e-g**, PV⁺ axon terminals (T) make symmetric synaptic contact (flanked by arrowheads) with an unlabeled dendritic shaft (d-). **f**, Rare symmetric synapse between PV⁺ axon terminal and PV⁺ dendrite (d+). **g** and **j**: synaptic contact between a PV⁺ axon terminal (T) and an unlabeled cell soma. **k**, Quantification of PV⁺ axon terminals in *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice (Unpaired t-test, *p=0.0453). **l**, *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}* mice have shorter synapses than *Tsc1^{Ctrl}* (Unpaired t test, *p=0.0464). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* n=4; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* n=3. Scale bars: **e-j**, 500 nm. **m**, Open field test: distance travelled during exploratory activity in an open field arena (One-way ANOVA, p>0.05; Tukey's multiple comparisons test: *Tsc1^{Ctrl}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* p=0.8537; *Tsc1^{Ctrl}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* p=0.5794; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* p=0.8956). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* n=12; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* n=10; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* n= 10. **n**, Elevated plus maze: Quantification of time spent in the open arms of elevated plus maze arena (One-way ANOVA, ***p=0.0006; Tukey's multiple comparisons test: *Tsc1^{Ctrl}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* p=0.9205; *Tsc1^{Ctrl}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* **p=0.0017; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* **p=0.0018). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* n=21; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* n=13; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* n=13. **o, p**, Unlike *Tsc1^{Ctrl}* mice, both *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* and *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* mice failed to show preference for a mouse vs an object (**o**) (Two-way ANOVA, $F_{\text{genotype}} (2, 35)=3.968$ p=0.0280, $F_{\text{time}} (1, 35)=4.593$ p=0.0391, $F_{\text{genotype*time}} (2, 35)=2.376$ p=0.1077; **p=0.0089, Sidak's multiple comparisons test) or for a novel mouse vs a familiar one (**p**) (Two-way ANOVA, $F_{\text{genotype}} (2, 34)=1.108$ p=0.3418, $F_{\text{time}} (1, 34)=2.640$ p=0.1134, $F_{\text{genotype*time}} (2, 34)=3.615$ p=0.0377; *p=0.0147, Sidak's multiple comparisons test); Number of mice: (**o**) *Tsc1^{Ctrl}* n = 16; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* n=11; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* n=11. (**p**) *Tsc1^{Ctrl}* n=11; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* n=14 ; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/flox}* n= 12. Data represent mean \pm SEM.

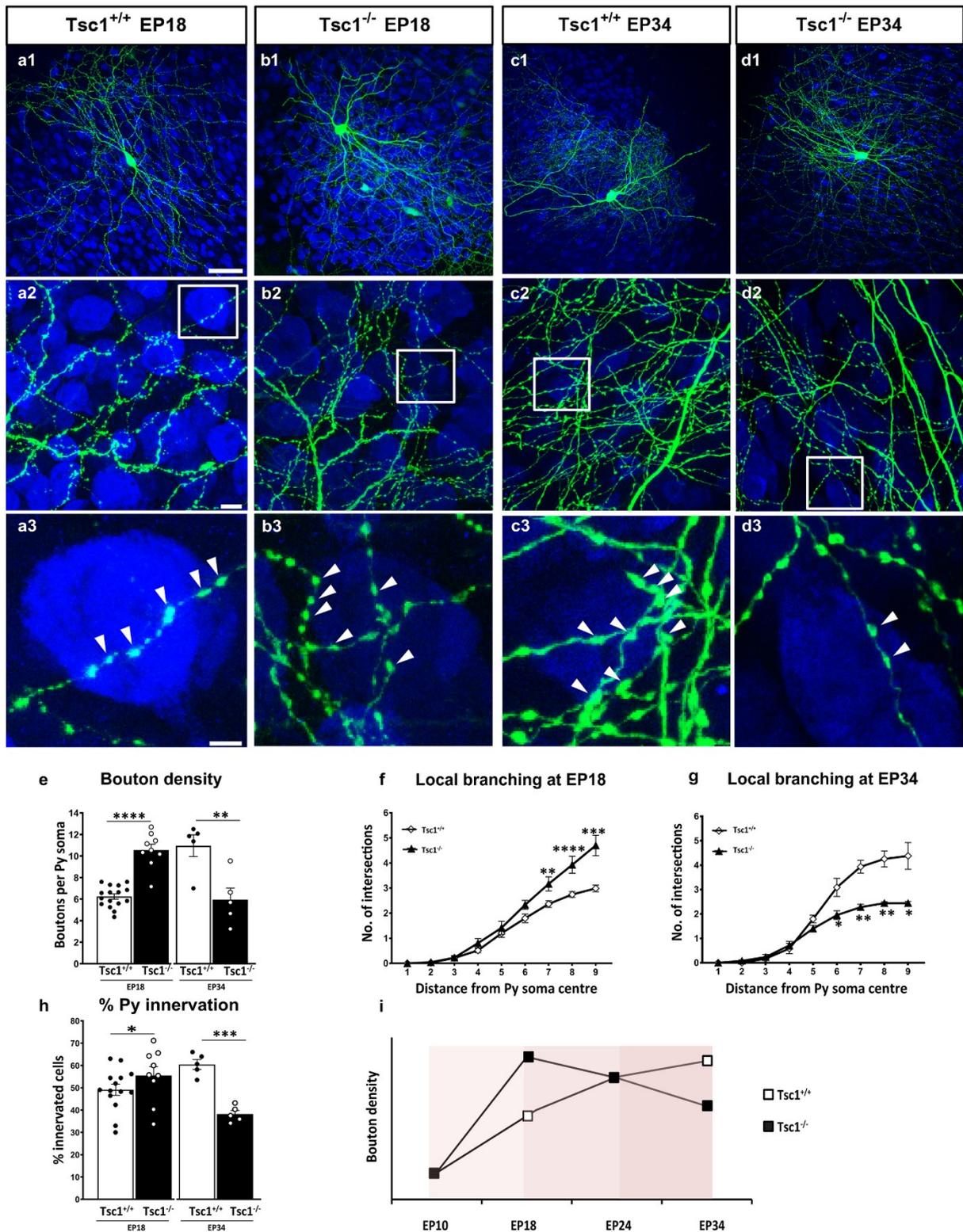


Figure 3. *Tsc1* knockout in single PV neurons causes a premature increase in axonal terminal branching and bouton density followed by excessive pruning.

a1, EP18 *Tsc1*^{+/+} PV cell showing characteristic branching (**a2**) and boutons (**a3**, arrowheads) on the postsynaptic somata identified by NeuN immunostaining (blue). **b**, *Tsc1*^{-/-} PV cells lacking both alleles (**b1-b3**) of *Tsc1* show significant increase in bouton density at EP18. **c**, Control EP34 *Tsc1*^{+/+} PV cell. (**d1-d3**), EP34 *Tsc1*^{-/-} PV cell showing significantly decreased axonal branching (**c2 vs d2**) and perisomatic boutons (**c3 vs d3**). **e**, *Tsc1*^{-/-} PV cells show an increase in bouton density at EP18 (Welch's t-test, ****p<0.0001) followed by a decrease at EP34 (Welch's t-test, **p=0.0091). Number of PV cells: At EP18; n=16 for *Tsc1*^{+/+}, n=9 for *Tsc1*^{-/-}. At EP34: n=5 *Tsc1*^{+/+}, n=5 *Tsc1*^{-/-}. **f**, *Tsc1*^{-/-} PV cells show more developed branching than *Tsc1*^{+/+} cells at EP18 (Welch's t-test, **p=0.0017 (radius7), ****p<0.0001 (radius8), ***p=0.0001 (radius9)). **g**, At EP34 *Tsc1*^{-/-} PV cells are characterized by simpler axonal branching compared to controls (Welch's t-test: *p=0.0336 (radius6), **p=0.0016 (radius7), ***p=0.0047 (radius8), *p=0.0232 (radius9)). Number of PV cells: At EP18; n=15 for *Tsc1*^{+/+}, n=9 for *Tsc1*^{-/-}. At EP34: n=5 *Tsc1*^{+/+}, n=5 *Tsc1*^{-/-}. **h**, Percentage of innervation is significantly increased in *Tsc1*^{-/-} PV cells at EP18 and reduced at EP34 (Welch's t-test: EP18, *p=0.0114; EP34, ****p<0.0001). Number of PV cells: At EP18; n=14 for *Tsc1*^{+/+}, n=9 for *Tsc1*^{-/-}. At EP34: n=5 *Tsc1*^{+/+}, n=5 *Tsc1*^{-/-}. **i**, Schematic representation of bouton density during the postnatal maturation of *Tsc1*^{+/+} and *Tsc1*^{-/-} PV cells Scale bars: **a1-d1**, 50 μ m; **a2-d2**, 10 μ m; **a3-d3**, 5 μ m. Data represent mean \pm SEM.

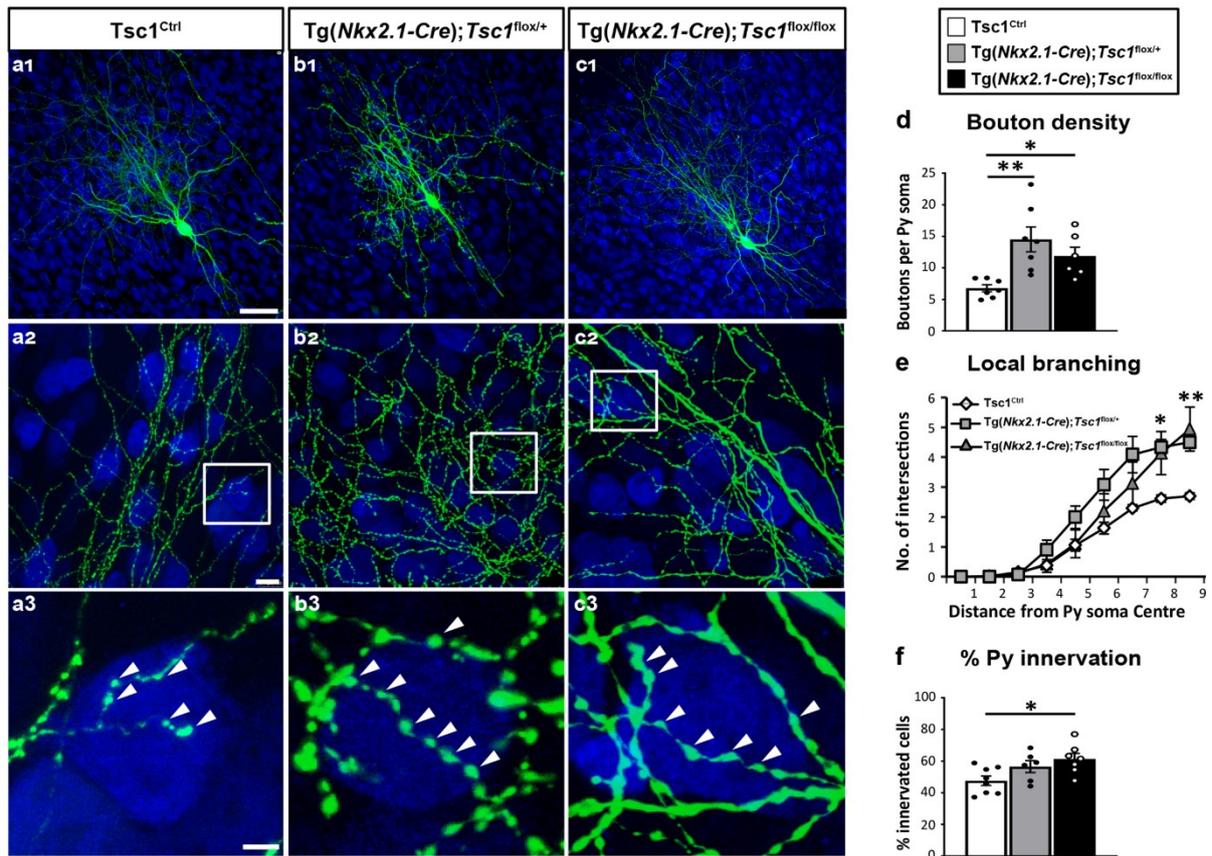


Figure 4. PV cells show prematurely rich perisomatic innervation in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* mice at EP18.

a1, A PV cell (green) amongst NeuN immunostained neurons (in blue) in cortical organotypic culture from a *Tsc1^{Ctrl}* mouse at EP18. **a2**, PV cell from *Tsc1^{Ctrl}* slice shows characteristic branching and multiple boutons (arrowheads) on the postsynaptic somata (**a3**). PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* mice (**b1-b3**) and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice (**c1-c3**) show increased bouton density (**d**) (One-way ANOVA, $**p=0.0039$; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $**p=0.0023$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $*p=0.0242$). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* $n=7$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $n=7$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n=6$. **e**, Local branching (One-way ANOVA $*p=0.0113$ (Radius 8), $**p=0.0096$ (Radius 9); Holm-Sidak's multiple comparisons: (Radius 8) *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $*p=0.0155$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $*p=0.0425$,

Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/+}* vs Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/lox}* p=0.8062; (Radius 9) *Tsc1^{Ctrl}* vs Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/+}* *p=0.0317; *Tsc1^{Ctrl}* vs Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/lox}* *p=0.0148, Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/+}* vs Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/lox}* p=0.9738). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* n=7, Tg(*Nkx2.1-Cre*);*Tsc1^{lox/+}* n=5, Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/lox}* n=6. **f**, Percentage of innervation (One-way ANOVA, *p=0.0254; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* vs Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/+}* p=0,0823; *Tsc1^{Ctrl}* vs Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/lox}* *p=0.0168). Number of PV cells: *Tsc1^{Ctrl}* n=8, Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/+}* n=6, Tg(*Nkx2.1-Cre*); *Tsc1^{lox/lox}* n=7. Scale bars: **a1-c1**, 20 μ m; **a2-c2**, 10 μ m, **a3-c3**, 3 μ m. Data represent mean \pm SEM.

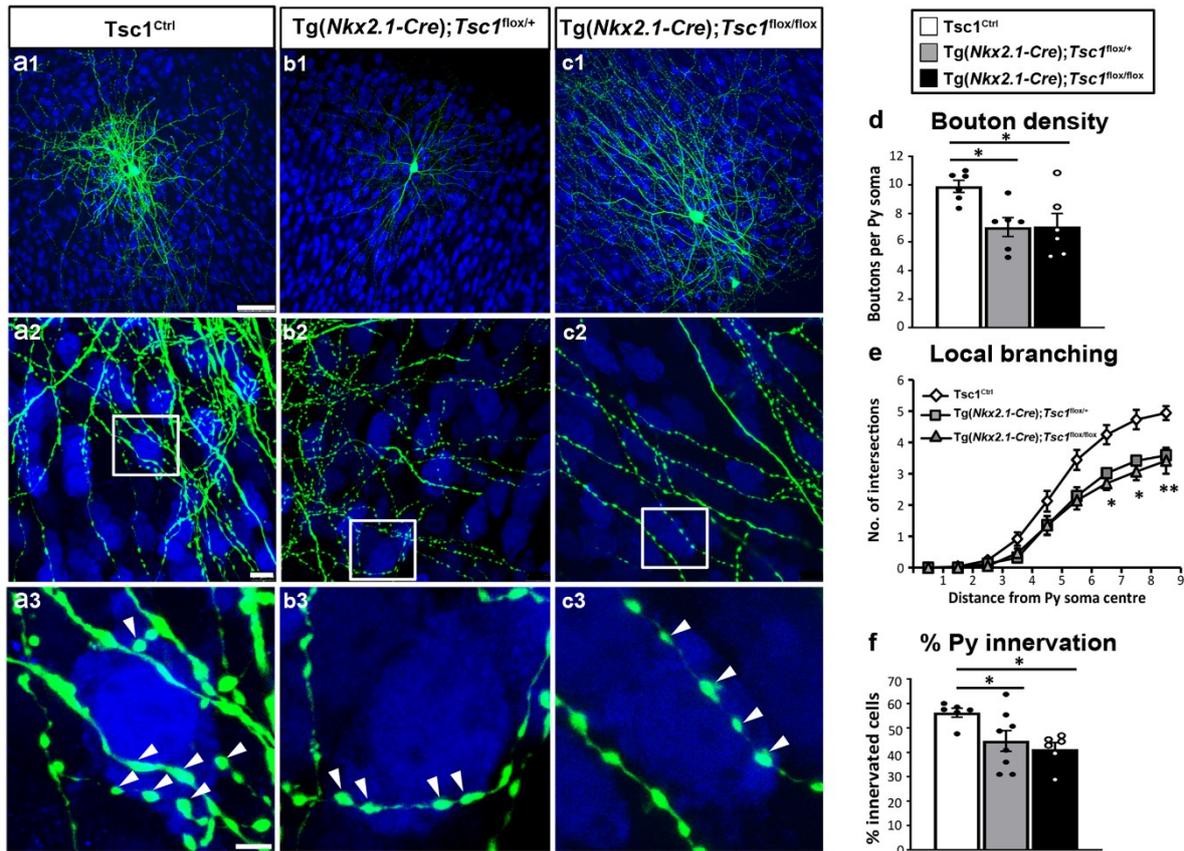


Figure 5. PV interneurons show significantly reduced perisomatic innervation in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* mice at EP34.

a, A PV cell (green) among NeuN immunostained neurons (blue) in cortical organotypic cultures from a *Tsc1^{Ctrl}* mouse at EP34. **b, c**, PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* mice (**b1-b3**) or *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice (**c1-c3**) show decreased bouton density (**d**) (One-way ANOVA, * $p=0.0157$; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* * $p=0.0214$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* * $p=0.0214$). Local branching (**e**) (One-way ANOVA, ** $p=0.0040$ (Radius 7), * $p=0.0127$ (Radius 8), ** $p=0.0011$ (Radius 9); Holm-Sidak's multiple comparisons: (Radius 7) *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* ** $p=0.0032$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* * $p=0.0117$; (Radius 8) *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* * $p=0.0126$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* * $p=0.0149$; (Radius 9) *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* *** $p=0.0008$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-*

Cre); *Tsc1^{lox/lox}* ***p*=0.0034). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* *n*=6, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* *n*=6, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* *n*=6. **f**, Percentage of innervation is also significantly lower for PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice (One-way ANOVA, **p*=0.0212, Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* **p*=0,0257; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* **p*=0.0179). Number of PV cells: *Tsc1^{Ctrl}* *n*=6, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* *n*=8, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* *n*=6. Arrowheads indicate boutons. Scale bars: **a1-c1**, 20 μ m; **a2-c2**, 10 μ m, **a3-c3**, 3 μ m. Data represent mean \pm SEM.

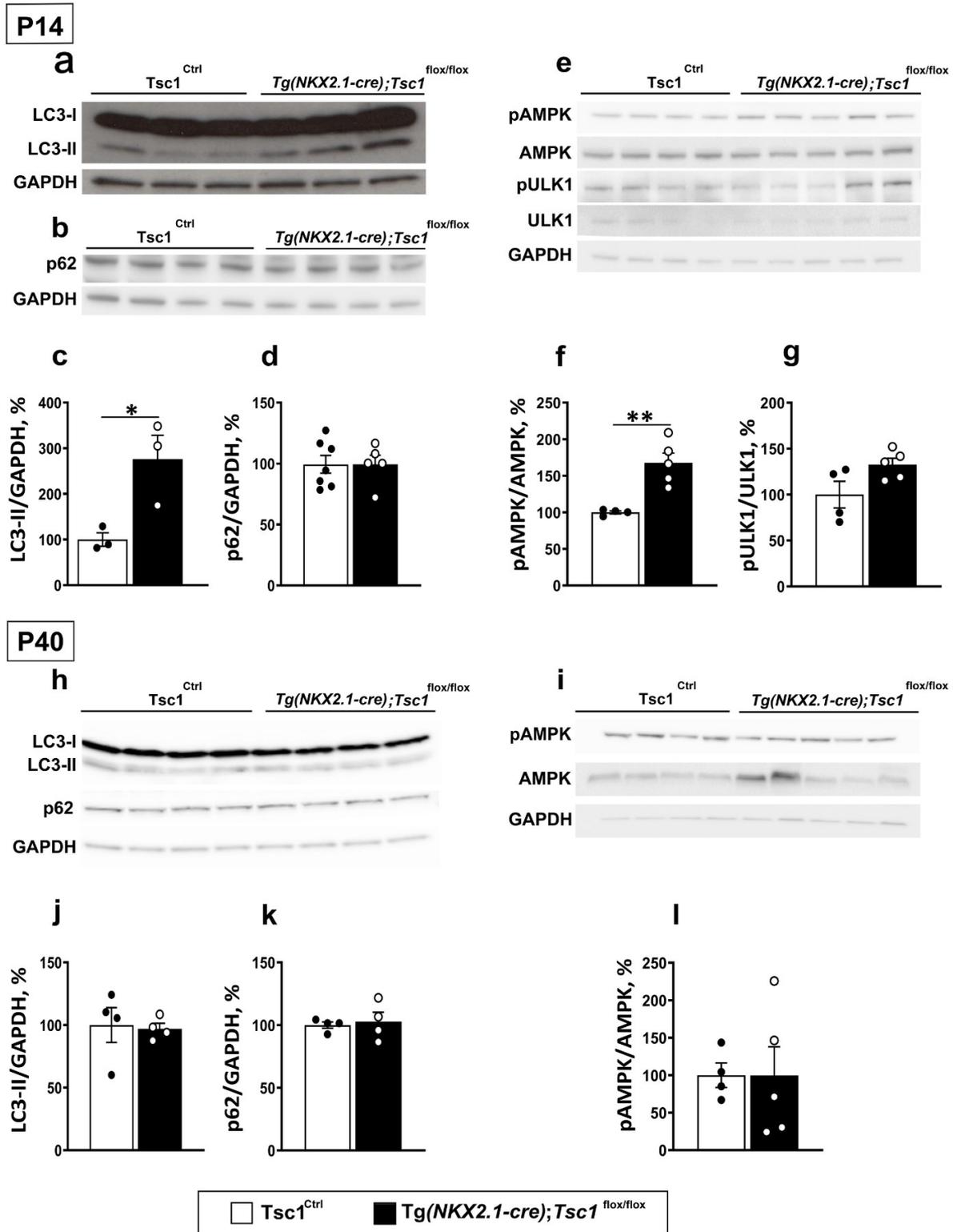


Figure 6. *Tsc1* deletion in GABAergic cells causes transient autophagy dysfunctions in adolescent mice.

Western blot representative bands of LC3-I, LC3-II (**a**), p62 proteins (**b**); pAMPK, AMPK, pULK1 and ULK1 (**e**). (**c-g**) Quantification reveals that LC3-II and pAMPK/AMPK expressions are higher in P14 *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* vs *Tsc1^{Ctrl}* mice (**c, f**; Unpaired t-test: LC3-II * $p=0.0314$; pAMPK/AMPK ** $p=0.003$), while p62 protein expression was unchanged and pULK1/ULK1 expressions showed a trend towards increased expression (**d, g**; Unpaired t-test: p62 $p=0.9937$; pULK1/ULK1 $p=0.065$). **h, i**, Western blot representative bands of LC3-I, LC3-II, p62, pAMPK and AMPK in adult mice and their quantification (**j, k, l**) show no differences between the two genotypes (Unpaired t-test: LC3-II $p=0.8446$; p62 $p=0.7426$; pAMPK/AMPK $p=0.9925$). Molecular weight: LC3-I/II :17/14 kDa; p62: 62 kDa; pAMPK: 62 kDa; AMPK: ~62 kDa; ULK1:140 kDa; pULK1: ~150 kDa; GAPDH: 37 kDa. Number of mice at P14: LC3-II; *Tsc1^{Ctrl}* $n = 3$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n = 3$; p62, pAMPK, AMPK, pULK1, ULK1 *Tsc1^{Ctrl}* $n = 4$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n = 5$. Number of mice at P40: LC3-II and p62; *Tsc1^{Ctrl}* $n = 4$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n = 4$; pAMPK and AMPK; *Tsc1^{Ctrl}* $n = 4$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n = 5$. Data represent mean \pm SEM.

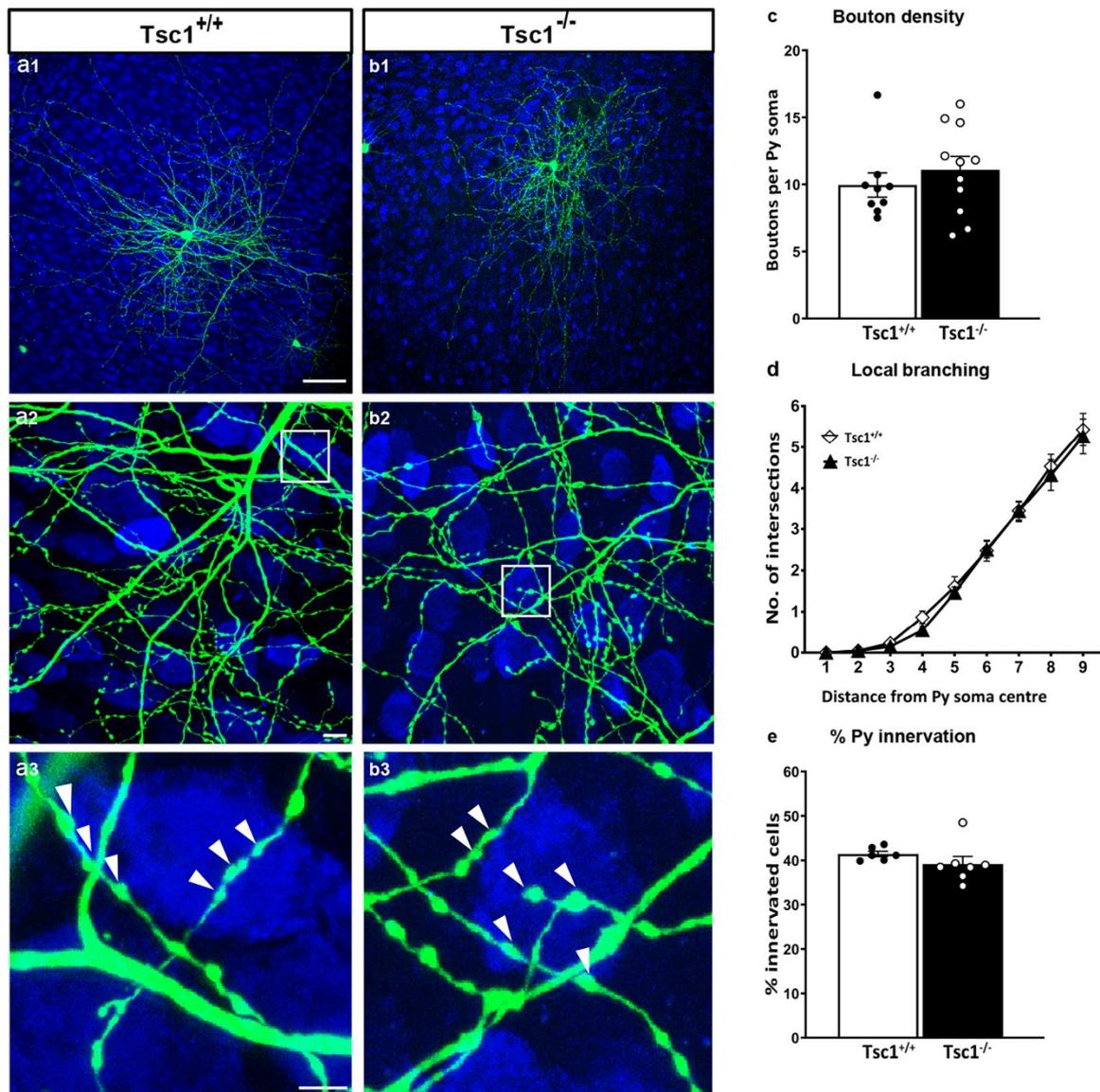


Figure 7. Late-onset *Tsc1* deletion in PV cells does not affect their innervation.

a1, EP 34 $Tsc1^{+/+}$ and **b1**, $Tsc1^{-/-}$ PV cells show similar axonal branching (**a2**, **b2**) and perisomatic boutons (**a3**, **b3**, arrowheads). **c**, Bouton Density (Welch's t test, $p=0.4091$; PV cells: $n=9$ $Tsc1^{+/+}$, $n=11$ $Tsc1^{-/-}$), (**d**) local branching (Welch's t test, $p=0.5789$; PV cells: $n=9$ $Tsc1^{+/+}$, $n=11$ $Tsc1^{-/-}$) and (**e**) percentage of innervation (Welch's t test, $p=0.2448$; PV cells: $n=6$ $Tsc1^{+/+}$, $n=7$ $Tsc1^{-/-}$) are not significantly different between the two groups. Scale bars: **a1-b1**, 50 μm ; **a2-b2**, 10 μm and **a3-b3**, 5 μm . Data in represent mean \pm SEM.

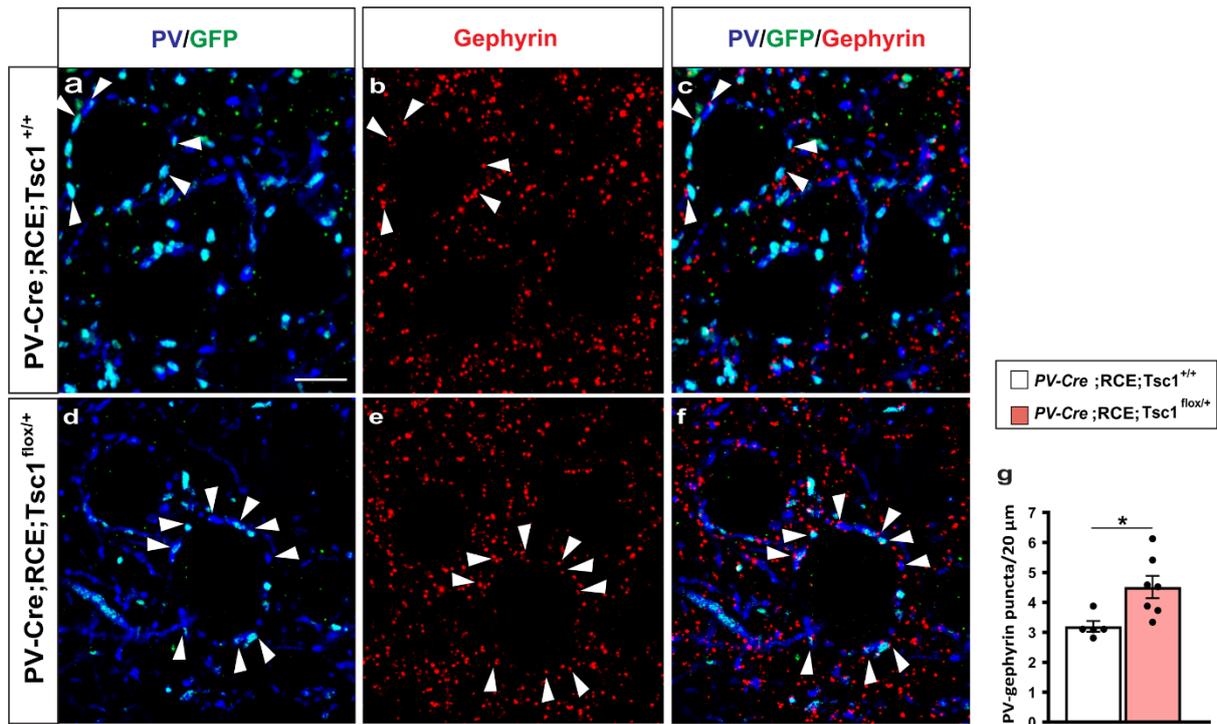


Figure 8. Postnatal onset of *Tsc1* haploinsufficiency in PV cells induces premature putative synapse formation.

a-f, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for PV/GFP (blue/green) and gephyrin (red) in P22 *PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}* (**a-c**) and *PV-Cre;RCE;Tsc1^{flox/+}* mice (**d-f**). White arrowheads indicate PV/Gephyrin colocalized puncta (**c** and **f**). Scale bar: 5 μm. **g**, Quantification of PV/GFP-Gephyrin colocalized puncta (Welch's t test, * $p=0.0121$). Number of mice: $n=5$ for *PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}* and $n=7$ for *PV-Cre;RCE;Tsc1^{flox/+}*. Data represent mean \pm SEM.

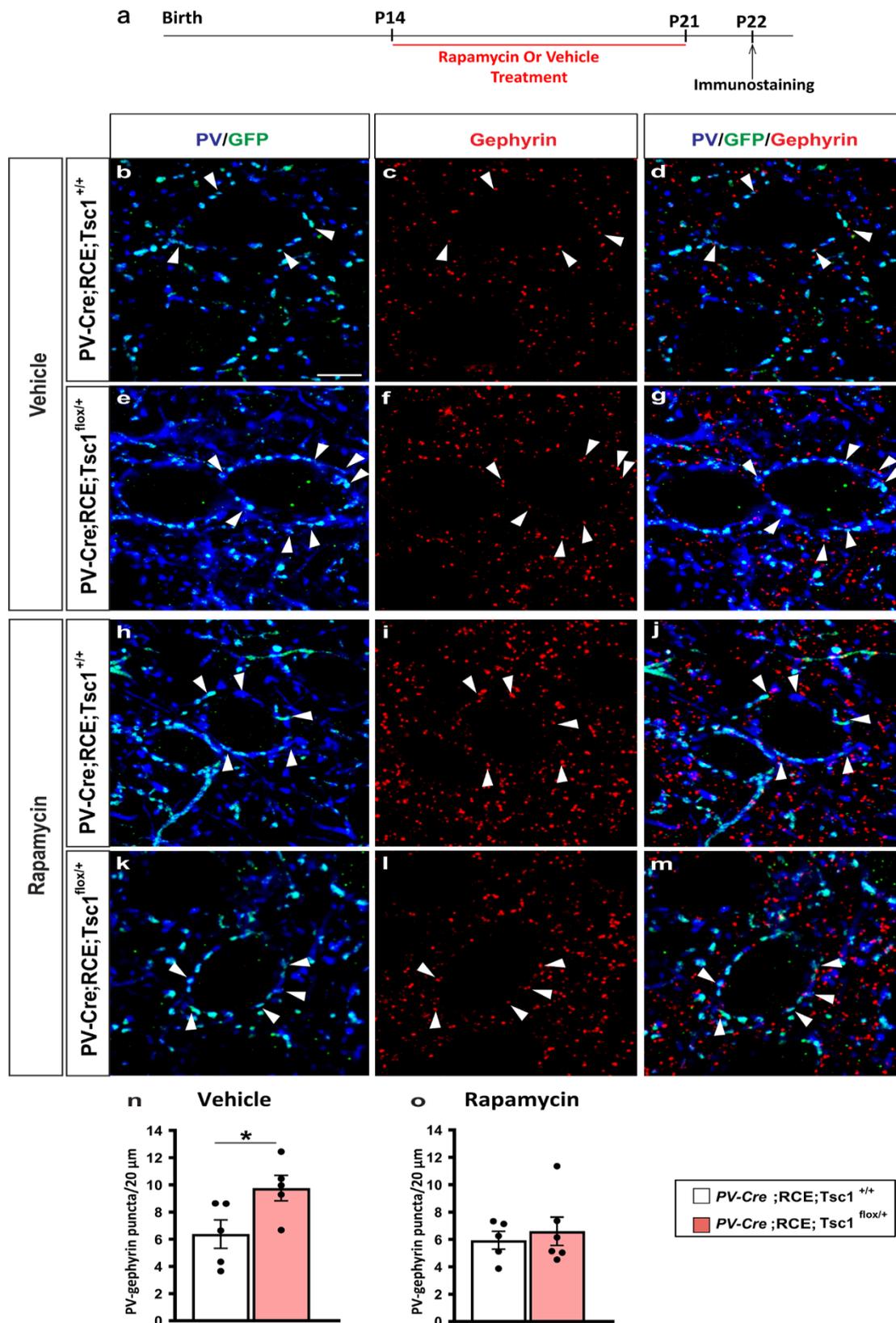


Figure 9. Short term Rapamycin treatment rescues the premature increase of PV cell perisomatic innervation caused by *Tsc1* haploinsufficiency.

a, Schematic of the treatment paradigm. **b-m**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for PV/GFP (blue/green) and gephyrin (red) in Vehicle (**b-g**) and Rapamycin (**i-m**) treated P22 mice showing PV/GFP-Gephyrin colocalized boutons (arrowheads) (**d, g** and **j, m**). Scale bar: 5 μ m. **n, o**, PV/GFP-Gephyrin colocalized puncta in Vehicle-treated (**n**, Welch's t test, * $p=0.0423$) and Rapamycin-treated mice (**o**, Welch's t test, $p=0.6088$). Vehicle treatment: $n=5$ for both *PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}* and *PV-Cre;RCE;Tsc1^{lox/+}* mice. Rapamycin treatment: $n=5$ *PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}*, $n=6$ *PV-Cre;RCE;Tsc1^{lox/+}* mice. Data represent mean \pm SEM.

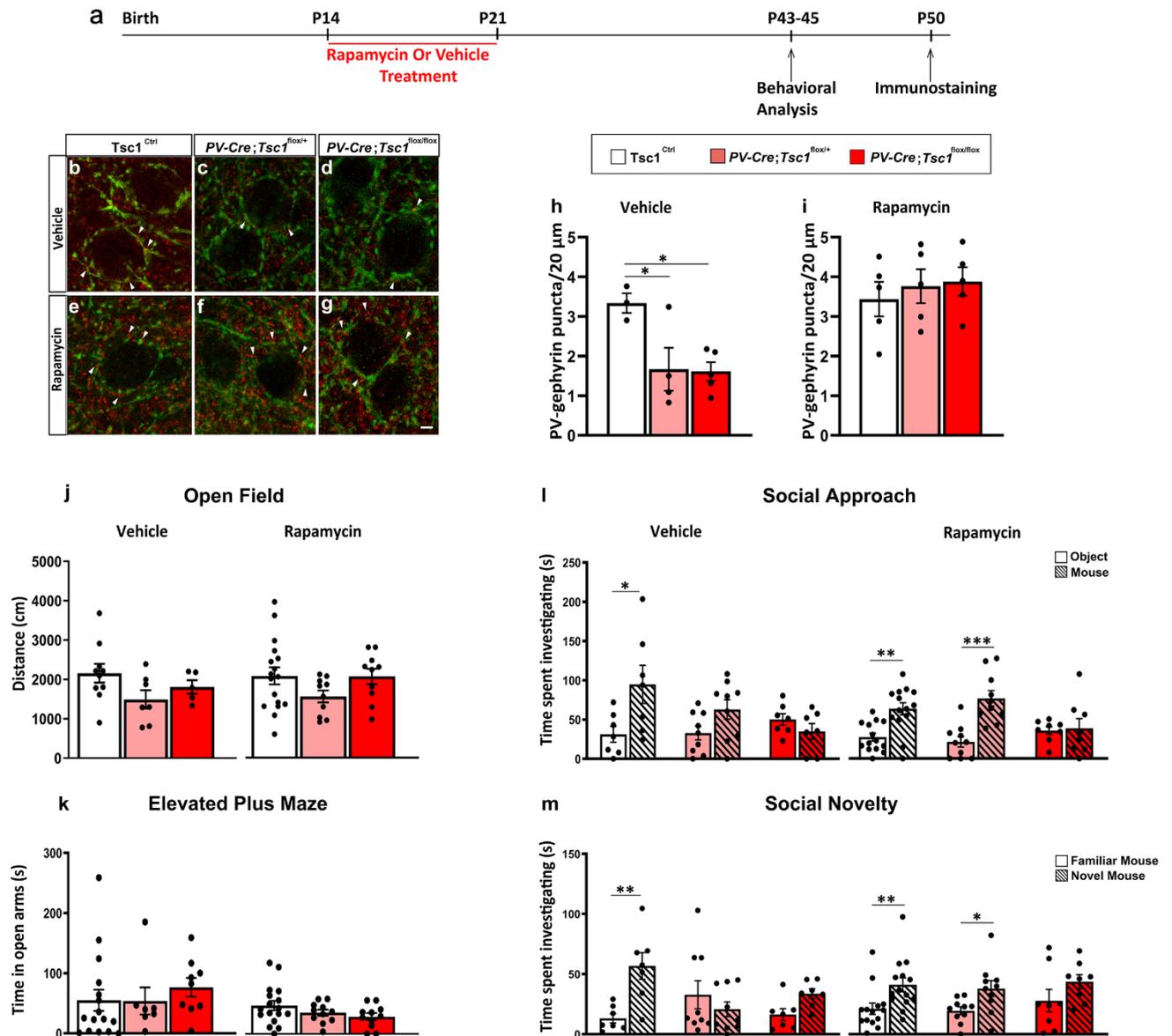


Figure 10. Short term rapamycin treatment rescues loss of PV cell connectivity and social behavior deficits in adult heterozygous mutant mice.

a, Schematic for treatment paradigm. **b-g**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for PV (green) and gephyrin (red) in Vehicle (**b-d**) and Rapamycin (**e-g**) treated mice showing PV-Gephyrin colocalized boutons (arrowheads). **h**, PV-Gephyrin colocalized puncta in Vehicle (One-Way Anova, $*p=0.036$; Tukey's multiple comparisons test: $Tsc1^{Ctrl}$ vs $PV-Cre; Tsc1^{flx/+}$ $*p=0.0401$; $Tsc1^{Ctrl}$ vs $PV-Cre; Tsc1^{flx/flx}$

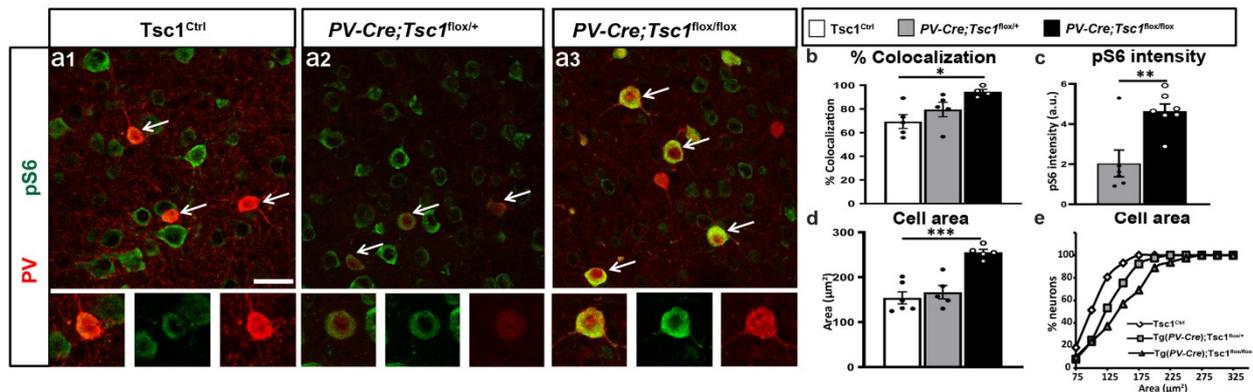
* $p=0.0281$, *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* * $p=0.9942$) and **(i)** Rapamycin treated mice (One-Way Anova, $p=0.7355$; Tukey's multiple comparisons test: *Tsc1^{Ctrl}* vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* $p=0.8421$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *PV-Cre; Tsc1^{fllox/fllox}* $p=0.7298$, *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}* vs *PV-Cre; Tsc1^{fllox/fllox}* $p=0.9774$). Number of vehicle-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=3$; *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}*, $n=4$; *PV-Cre; Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=5$. Number of rapamycin treated mice: $n=5$ for all the genotypes. **j**, Open field test. Vehicle-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=10$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}*, $n=7$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=5$. Rapamycin-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=17$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}*, $n=10$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=10$. **(k)** Elevated plus maze test. Vehicle-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=16$; *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}*, $n=7$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=9$; Rapamycin-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=17$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}*, $n=11$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=11$. **l, m**, Rapamycin treatment from P14-21 rescues social approach (**l**, Two-way ANOVA vehicle, F_{genotype} (2, 20)=1.615 $p=0.2238$, F_{time} (1, 20)=4.789 $p=0.0407$, $F_{\text{genotype*time}}$ (2, 20)=3.395 $p=0.0538$; * $p=0.0230$, Holm-Sidak's multiple comparisons test. Two-way ANOVA rapamycin, F_{genotype} (2, 29)=1.027 $p=0.3709$, F_{time} (1, 29)=22.08 $p<0.0001$, $F_{\text{genotype*time}}$ (2, 29)=4.580 $p=0.0187$; ** $p=0.0019$, *** $p=0.0002$, Holm-Sidak's multiple comparisons test) and social novelty deficits (**m**, Two-way ANOVA vehicle, F_{genotype} (2, 20)=0.8281 $p=0.4513$, F_{time} (1, 20)=5.876 $p=0.0250$, $F_{\text{genotype*time}}$ (2, 20)=6.036 $p=0.0089$; ** $p=0.0053$, Holm-Sidak's multiple comparisons test. Two-way ANOVA rapamycin, F_{genotype} (2, 29)=0.4667 $p=0.6317$, F_{time} (1, 29)=18.84 $p=0.0002$, $F_{\text{genotype*time}}$ (2, 29)=0.09351 $p=0.9110$; ** $p=0.0081$, * $p=0.0336$, Holm-Sidak's multiple comparisons test) in *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}*, but not in *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* mice. Vehicle-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=7$; *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}*, $n=9$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=7$. Rapamycin-treated mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=14$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}*, $n=10$; *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}*, $n=8$. Scale bar: 5 μm . Data represent mean \pm SEM.

2.12. SUPPLEMENTARY TABLE

Gene	Name	Direction	Sequences
TSC1	F4536	Fwd	5'-AGGAGGCCTCTTCTGCTACC-3'
TSC1	R4830	Rev	5'-CAGCTCCGACCATGAAGTG-3'
TSC1	R6548	Rev	5'-TGGGTCCTGACCTATCTCCTA-3'
Nkx2.1Cre	F1	Fwd	5'-AAGGCGGACTCGGTCCACTCCG-3'
Nkx2.1Cre	F2	Fwd	5'-TCCTCCAGGGGACTCAAGATG-3'
Nkx2.1Cre	R1	Rev	5'-TCGGATCCGCCGCATAACCAG-3'
PVCre	148-454-Fwd	Fwd	5'-CAGCCTCTGTTCCACATACTCC-3'
PVCre	149-o106m-Fwd	Fwd	5'- GCTCAGAGCCTCCATTCCCT-3'
PVCre	150-o103m-Rev	Rev	5'- TCACTCGAGAGTACCAAGCAGGCAGGAGATATC- 3'
RCE	RCE-Rosa1	Fwd	5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC-3'
RCE	RCE-Rosa2	Fwd	5'-GAAGGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'
RCE	RCE-Cag3	Rev	5'-CCAGGCGGGC CATTACCGTAAG-3'

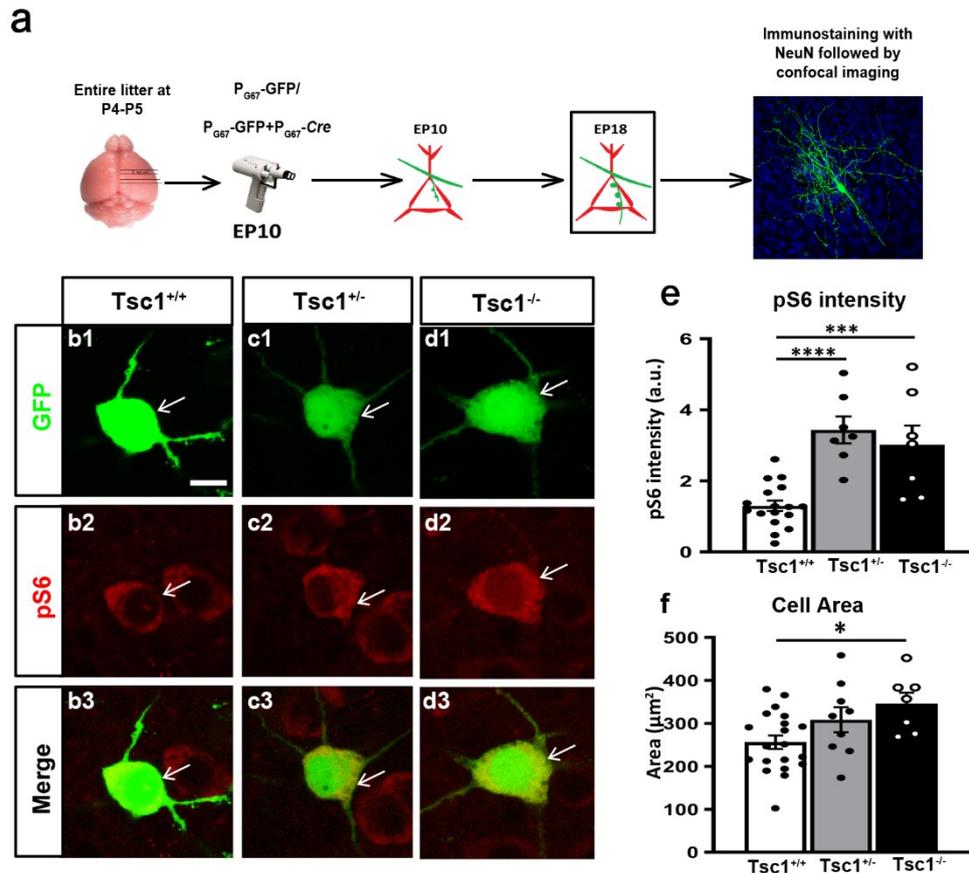
Supplementary Table 1. List of primers used for mouse genotyping.

2.13. SUPPLEMENTARY FIGURES



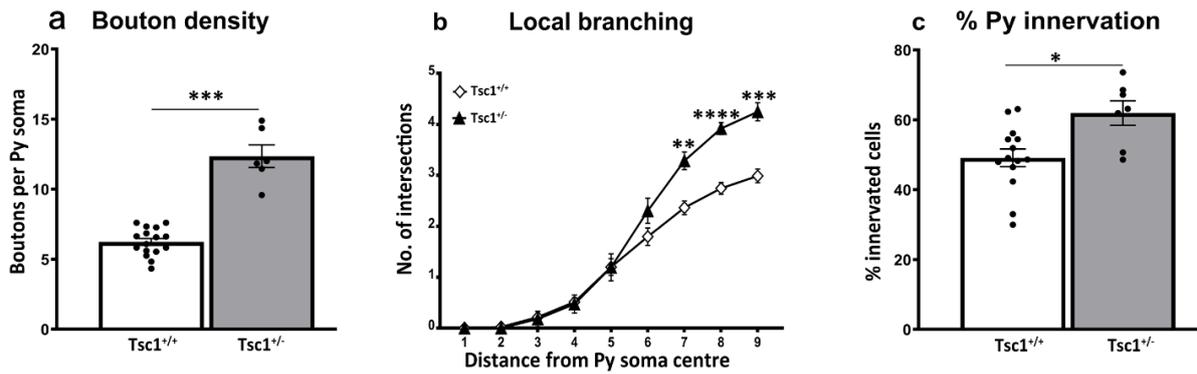
Supplementary Figure 1. Cortical PV cells show increased mTOR activity and somatic hypertrophy in *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* mice.

a, Coronal sections of somatosensory cortex immunostained for PV (red) and pS6 (green) in *Tsc1*Ctrl (a1), *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* (a2) and *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* mice (a3) at P45. Lower panels show individual PV cells. **b**, *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* mice show increased percentage of colocalization of pS6 in PV cells (One-way ANOVA, * $p=0.0254$; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1*Ctrl vs *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* $p=0.1929$; *Tsc1*Ctrl vs *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* * $p=0.0239$). Number of mice: *Tsc1*Ctrl $n=5$, *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* $n=5$, *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* $n=4$. **c**, Quantification of pS6 expression intensity in PV cells normalized to wild-type controls show two-fold increase in *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* mice (Welch's t-test ** $p=0.0093$). Number of mice: *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* $n=6$, *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* $n=7$. **d, e**, PV cells show somatic hypertrophy in homozygous mutant mice. **d** (One-way ANOVA, *** $p=0.0001$; Dunnett's multiple comparisons: *Tsc1*Ctrl vs *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* $p=0.7005$; *Tsc1*Ctrl vs *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* *** $p=0.0001$). Number of mice: *Tsc1*Ctrl $n=6$, *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* $n=5$, *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* $n=5$. **e**, Cumulative distribution (K-S test, * $p<0.001$) at P45. Scale bar, 20 µm. Data represent mean ± SEM.



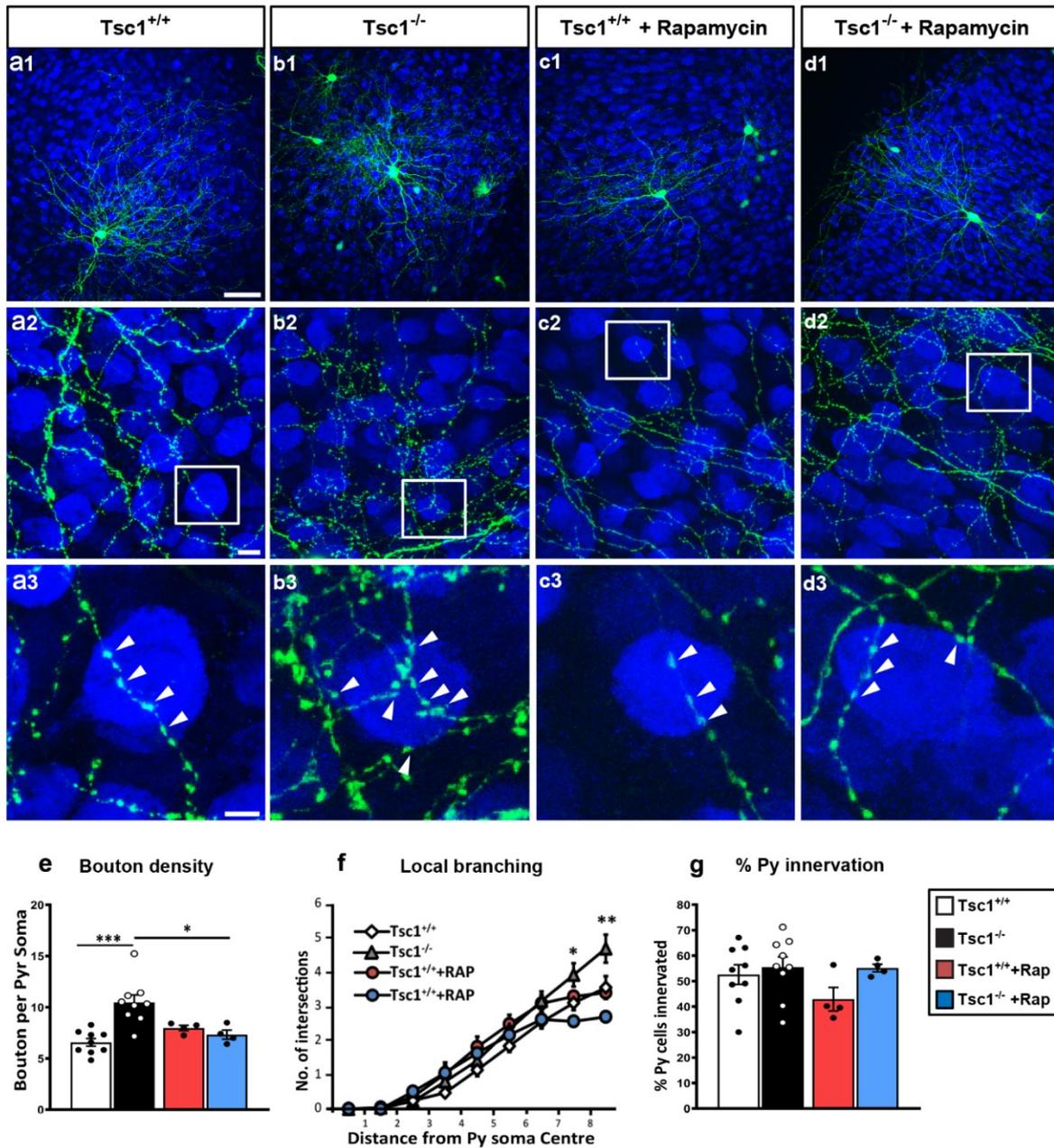
Supplementary Figure 2. *Tsc1* knockout in single PV cells leads to increase in mTOR activity and somatic hypertrophy.

a, Schematics of experimental procedure. **b-d**, PV cells from cortical organotypic cultures transfected with P_{G67} (**b**, *Tsc1*^{+/+} control cells) or P_{G67}-Cre (**c**, *Tsc1*^{+/-} and **d**, *Tsc1*^{-/-}) at EP10 (P5+5 days *in vitro*=Equivalent Postnatal day 10) and immunostained for pS6 (red) at EP18 (P5+13 days *in vitro*=Equivalent Postnatal day 18). **e**, Somatic pS6 intensity is increased in both *Tsc1*^{+/-} and *Tsc1*^{-/-} PV cells compared to *Tsc1*^{+/+} PV cells (One-way ANOVA, ****p<0.0001; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1*^{+/+} vs *Tsc1*^{+/-} ****p<0.0001; *Tsc1*^{+/+} vs *Tsc1*^{-/-} ***p=0.0003). Number of cells: *Tsc1*^{+/+} n = 17, *Tsc1*^{+/-} n=7, *Tsc1*^{-/-} n=7. **f**, *Tsc1*^{-/-} cells have increased soma area (One-way ANOVA, *p=0.0213; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1*^{+/+} vs *Tsc1*^{+/-} p=0.1675; *Tsc1*^{+/+} vs *Tsc1*^{-/-} *p=0.0277). Number of transfected cells: *Tsc1*^{+/+} n=20, *Tsc1*^{+/-} n=9, *Tsc1*^{-/-} n=7. Scale bar, 10µm. Data represent mean ± SEM.



Supplementary Figure 3. *Tsc1* haploinsufficiency in single PV cells causes a premature increase in axon terminal branching and bouton density.

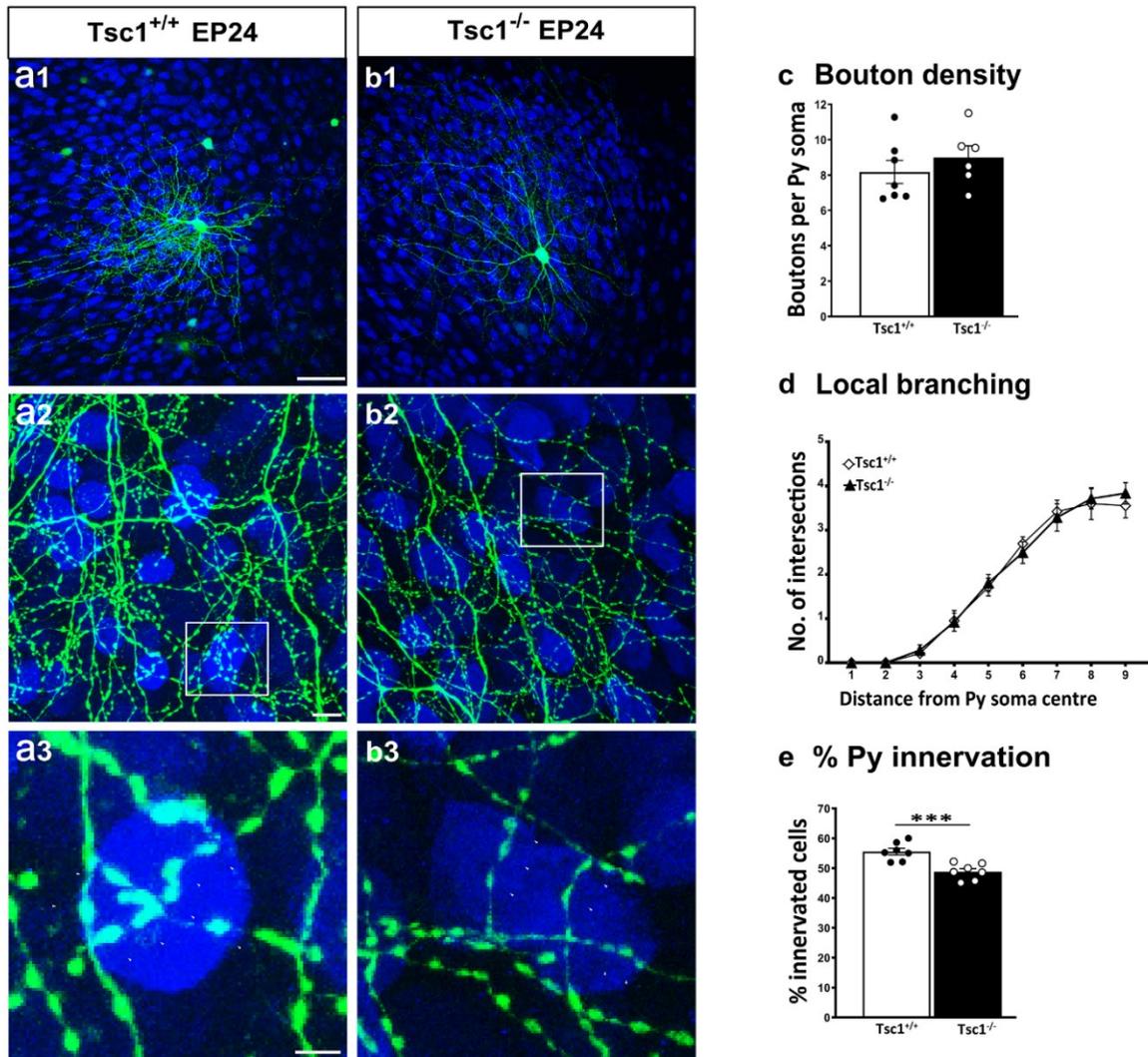
a, PV cells lacking one allele of *Tsc1* show increase in bouton density (Welch's t-test, *** $p=0.0004$), number of PV cells: $n=16$ for *Tsc1^{+/+}*, $n=6$ for *Tsc1^{+/-}* and local branching (**b**) (Welch's t-test, ** $p=0.0014$ (radius7), **** $p<0.0001$ (radius8), *** $p=0.0001$ (radius9)), number of PV cells: $n=15$ for *Tsc1^{+/+}*, $n=6$ for *Tsc1^{+/-}*. **c**, Percentage of innervated cells (Welch's t-test, * $p=0.0114$). Number of PV cells: $n=14$ *Tsc1^{+/+}*, $n=7$ *Tsc1^{+/-}*. Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 4. Premature increase in perisomatic innervation by *Tsc1*^{-/-} PV cells is mTORC1 dependent.

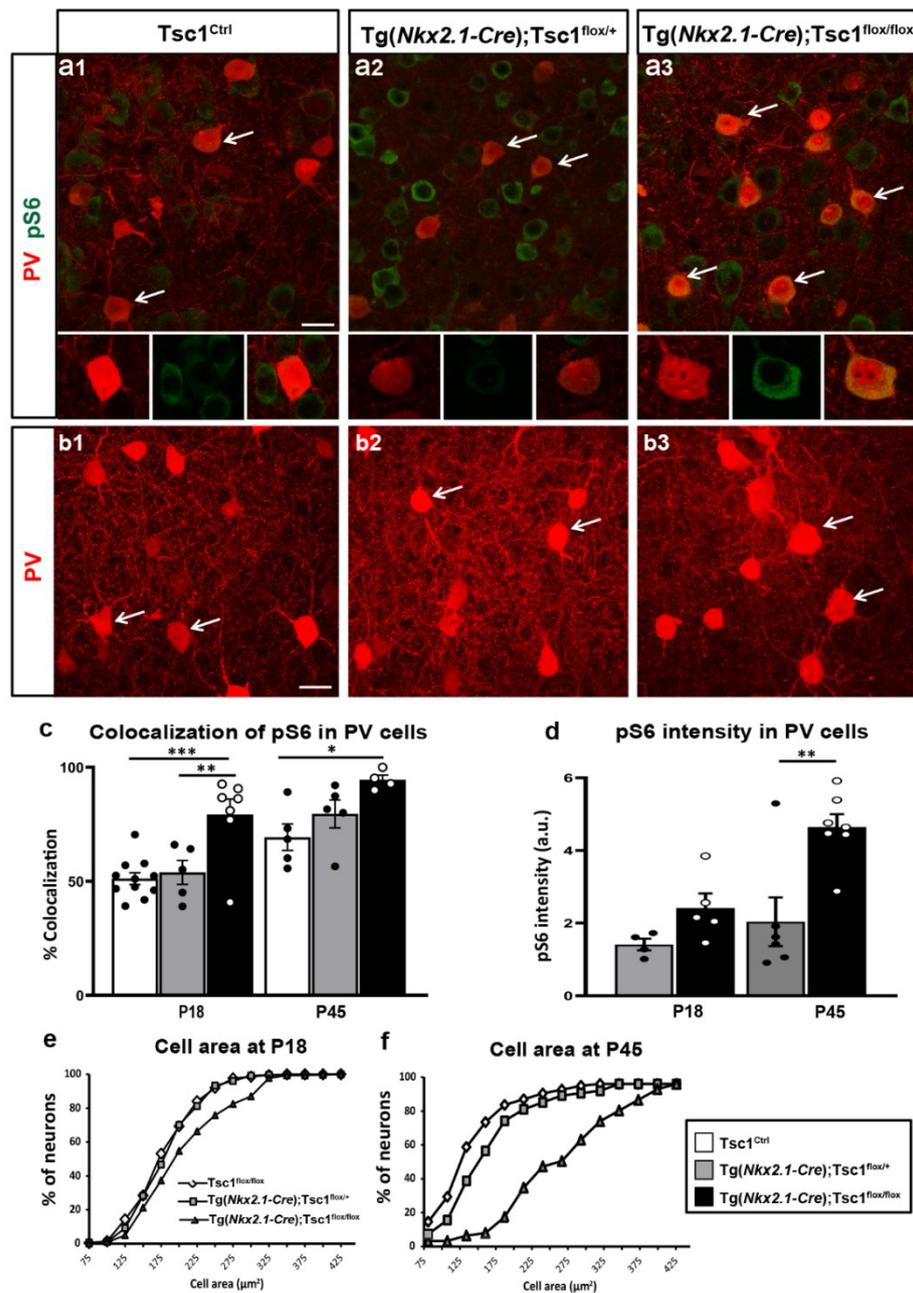
a, b, *Tsc1*^{-/-} PV cell (green) shows more complex terminal axonal branching (**a2, b2**) and increased bouton density at EP18 (**a3, b3**, arrowheads) compared to control, age-matched PV cells. **c, d**, Rapamycin treatment from EP12-18 does not affect bouton density and local branching of *Tsc1*^{+/+} PV cells (**c**), while it normalizes perisomatic innervations formed by *Tsc1*^{-/-}

⁻PV cells (**d**). *Tsc1^{-/-}* PV cells show increased bouton density (**e**) (Two-way ANOVA, $F_{\text{treatment}}$ (1, 22)=1.763 $p=0.1979$, F_{genotype} (1, 22)=6.165 $p=0.0211$, $F_{\text{genotype*treatment}}$ (1, 22)=12.05 $p=0.0022$; * $p=0.0129$, *** $p=0.0001$; Tukey's multiple comparisons test; number of PV cells: $n=9$ *Tsc1^{+/+}*, $n=9$ *Tsc1^{-/-}*, $n=4$ *Tsc1^{+/+}* + Rapamycin, $n=4$ *Tsc1^{-/-}* + Rapamycin) and local branching (**f**) (Two-way ANOVA, F_{radius} (1.532, 16.85)=42.94 $p<0.0001$, $F_{\text{Treatment}}$ (3, 11)=0.9657 $p=0.4433$, F_{genotype} (11, 88)=22.27 $p<0.0001$, $F_{\text{radius*treatment}}$ (24, 88)=1.521 $p=0.0820$; * $p<0.05$, ** $p<0.001$; Bonferroni's multiple comparisons test; number of PV cells: $n=4$ *Tsc1^{+/+}*, $n=3$ *Tsc1^{-/-}*, $n=4$ *Tsc1^{+/+}* + Rapamycin, $n=4$ *Tsc1^{-/-}* + Rapamycin;) compared to the other groups. **g**, Percentage of innervation (Two-way ANOVA, $F_{\text{treatment}}$ (1, 22)=1.207 $p=0.2837$, F_{genotype} (1, 22)=2.782 $p=0.1095$, $F_{\text{genotype*treatment}}$ (1, 22)=1.049 $p=0.3168$; number of PV cells: $n=9$ *Tsc1^{+/+}*, $n=9$ *Tsc1^{-/-}*, $n=4$ *Tsc1^{+/+}* + Rapamycin, $n=4$ *Tsc1^{-/-}* + Rapamycin). Scale bars: **a1-d1**, 100 μm ; **a2-d2** and **a3-d3**, 5 μm . Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 5. PV $Tsc1^{-/-}$ cell innervations at EP24 are morphologically indistinguishable from age-matched controls.

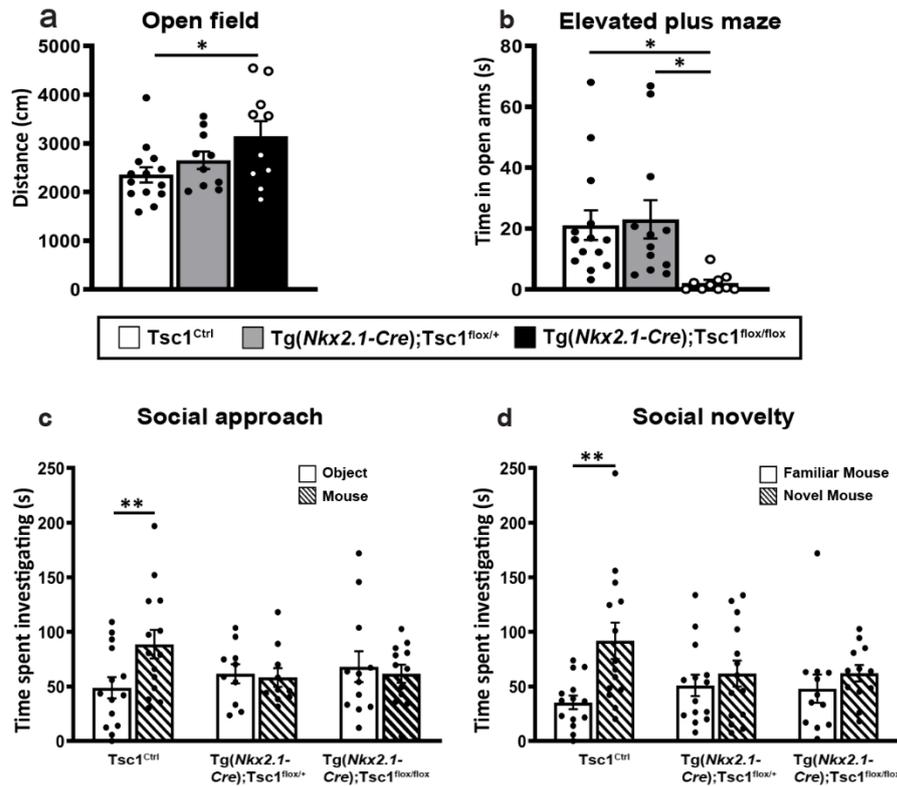
a1, $Tsc1^{+/+}$ and **b1**, $Tsc1^{-/-}$ PV cells show similar axonal branching (**a2**, **b2**) and perisomatic bouton density (**a3**, **b3**, arrowheads). **c**, Bouton density (Welch's t test, $p=0.3920$; Number of PV cells: $n=7$ $Tsc1^{+/+}$, $n=6$ $Tsc1^{-/-}$). **d**, local branching is not significantly different between the two groups (Number of PV cells: $n=5$ $Tsc1^{+/+}$, $n=6$ $Tsc1^{-/-}$). **e**, percentage of innervation is significantly reduced in the $Tsc1^{-/-}$ PV cells (Welch's t test, $***p=0.0009$; Number of PV cells: $n=7$ $Tsc1^{+/+}$, $n=7$ $Tsc1^{-/-}$). Scale bars: **a1-b1**, 50 μm ; **a2-b2**, 10 μm , **a3-b3**, 5 μm . Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 6. Cortical PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice show increased mTOR activity and somatic hypertrophy.

a, Coronal sections of somatosensory cortex immunostained for PV (red) and pS6 (green) (**a**) or PV only (**b**) in *Tsc1^{Ctrl}* (**a1**, **b1**), *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* (**a2**, **b2**) and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice (**a3**, **b3**) at P18. Lower panels show higher magnification of individual PV cells. **c**, In *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice, more PV cells co-localize with pS6 as

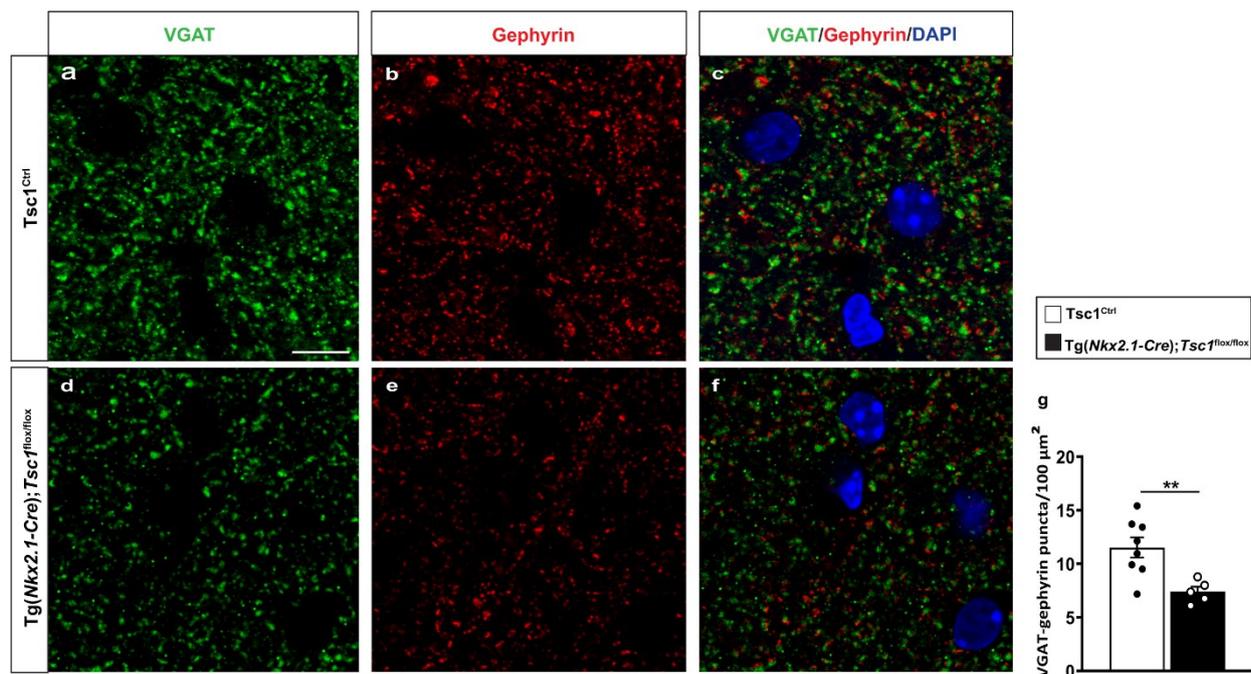
compared to $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ and wild-type mice at P18 (One-way ANOVA, *** $p=0.0005$; Tukey's multiple comparison test: $TscI^{Ctrl}$ vs $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $p=0.9154$; $TscI^{Ctrl}$ vs $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ *** $p=0.0005$; $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ vs $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ ** $p=0.0072$) and at P45 (One-way ANOVA, * $p=0.0254$; Tukey's multiple comparison test: $TscI^{Ctrl}$ vs $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $p=0.3805$; $TscI^{Ctrl}$ vs $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ * $p=0.0202$; $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $TscI^{Ctrl}$ vs $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ *** $p=0.1789$). Number of mice at P18 $TscI^{Ctrl}$ $n=11$, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $n=5$, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ $n=7$; number of mice at P45, $TscI^{Ctrl}$ $n=5$, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $n=5$, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ $n=4$. **d**, pS6 expression intensity in PV cells normalized to wild-type controls at P18 (Welch's t-test $p=0.06$; number of mice at P18, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $n=4$, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ $n=5$) and at P45 (Welch's t-test ** $p=0.0093$; number of mice at P45, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ $n=6$, $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ $n=7$). **e, f**, Quantification of PV cell area shows somatic hypertrophy in $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ mice at both P18 and P45 (P18: K-S test, * $p<0.01$; P45: K-S test, * $p<0.001$), and in $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ mice at P45 (P18: K-S test, * $p<0.05$), $n=11$ $TscI^{Ctrl}$ mice, $n=5$ $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/+}$ mice, $n=7$ $Tg(Nkx2.1-Cre);TscI^{lox/lox}$ mice at P18, $n=6$ mice for all genotypes at P45. Scale bar, 20 μm . Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 7. *Tsc1* knockout in MGE derived neurons leads to social behavioral deficits in young adult mice

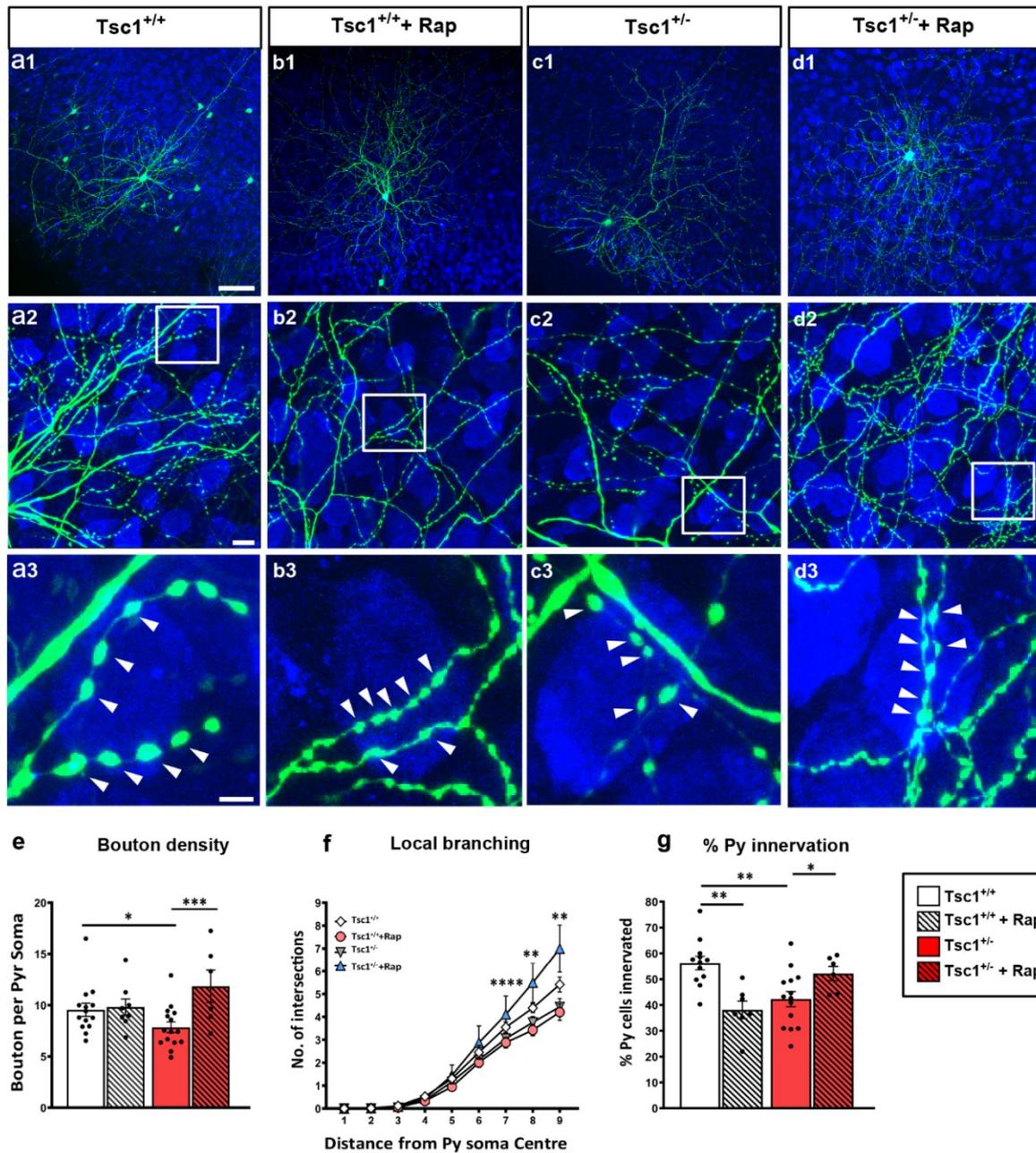
a, Open field test: Quantification of distance travelled during exploratory activity in an open field arena at P33 shows increased exploratory drive in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice (One-way ANOVA, * $p < 0.0407$; Holm-Sidak's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $p = 0.3246$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* * $p = 0.0241$). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* $n = 14$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $n = 10$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n = 10$. **b**, Elevated plus maze: Quantification of time spent in the open arms of elevated plus maze arena at P35 shows increased anxiety like behavior in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice (One-way ANOVA, * $p = 0.0137$; Tukey's multiple comparisons test: *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $p = 0.7755$; *Tsc1^{Ctrl}* vs *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* * $p = 0.0230$). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* $n = 14$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* $n = 12$, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* $n = 10$. **c**, In the 3 chambers, both *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* and *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice do not show preference for the mouse vs

the object (Two-way ANOVA, F_{genotype} (2, 33)=0.2257 $p=0.7992$, F_{time} (1, 33)=1.842 $p=0.1840$, $F_{\text{genotype*time}}$ (2, 33)=4.460 $p=0.0193$; ** $p=0.0055$, Sidak's multiple comparisons test). Number of mice: $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ $n=14$, $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$ $n=10$, $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/lox}}$ $n=12$. **d**, Unlike $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ mice, both $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$ and $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/lox}}$ mice failed to show preference for social novelty (Two-way ANOVA, F_{genotype} (2, 37)=0.2907 $p=0.7494$, F_{time} (1, 37)=9.499 $p=0.0039$, $F_{\text{genotype*time}}$ (2, 37)=2.877 $p=0.0690$; ** $p=0.0016$, Sidak's multiple comparisons test). Number of mice: $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ $n=14$, $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$ $n=14$, $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/lox}}$ $n=12$. Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 8. *Tsc1* knockout in MGE-derived neurons leads to a significant reduction of GABAergic synapses in the olfactory bulb of adult mice.

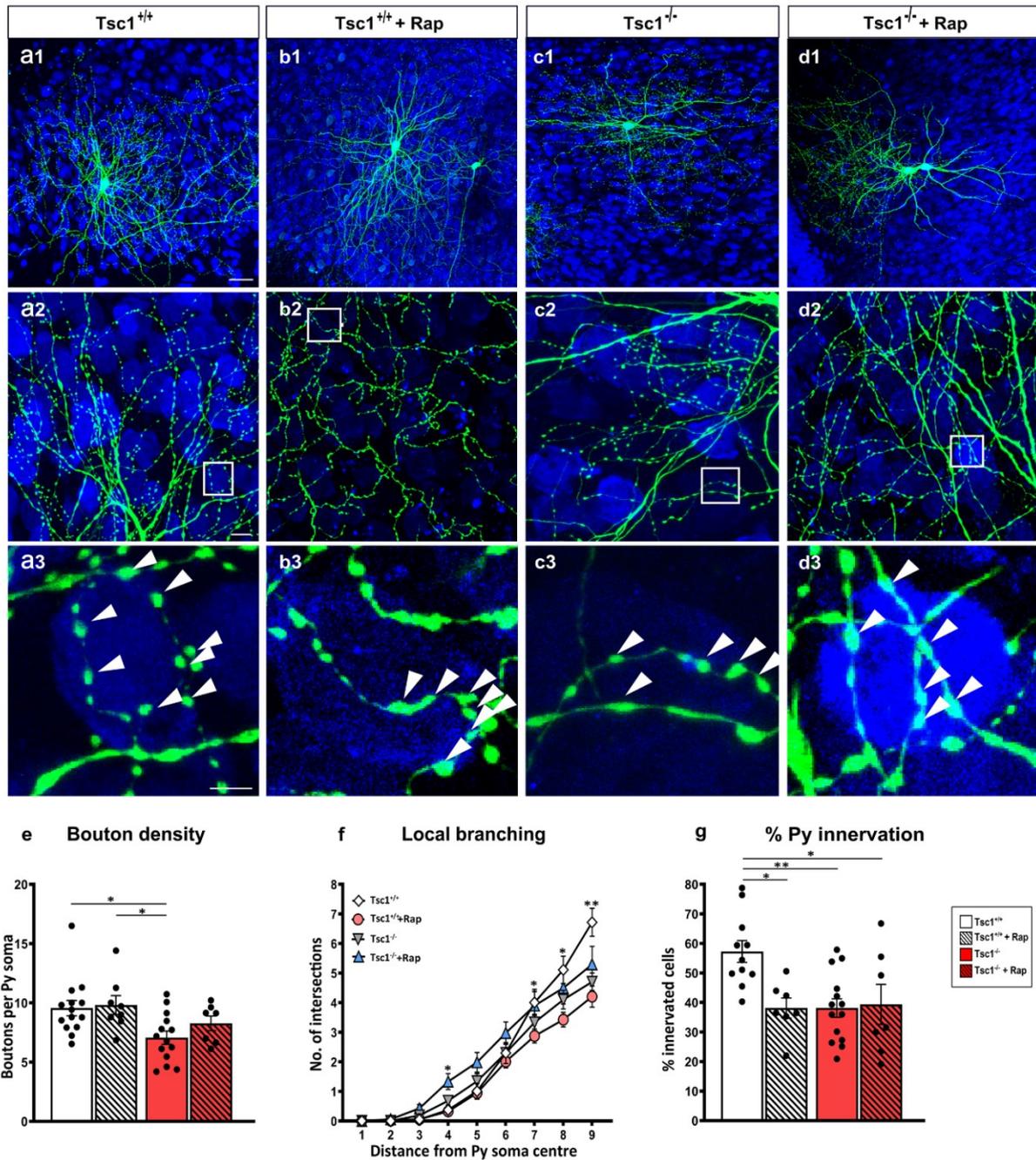
(a-f) Horizontal sections of adult mouse olfactory bulb stained for VGAT (green); gephyrin (red) and DAPI (blue). (g) Quantification of VGAT/Gephyrin shows a decrease of colocalized puncta (Welch's t test, **p=0.003). Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}* n = 8, *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* n= 5. Scale bar: 10μm. Data represent mean ± SEM.



Supplementary Figure 9. Short term Rapamycin treatment rescues loss of perisomatic innervation in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* mice at EP34.

a, b, PV cell (green) among NeuN immunostained neurons (blue) in cortical organotypic cultures from *Tsc1^{Ctrl}* mouse at EP34 where **b** is treated with Rapamycin. **c, d**, PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* where **d** is treated with Rapamycin. **e**, Loss of bouton density in PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/+}* mice is reversed by Rapamycin treatment (Two-way

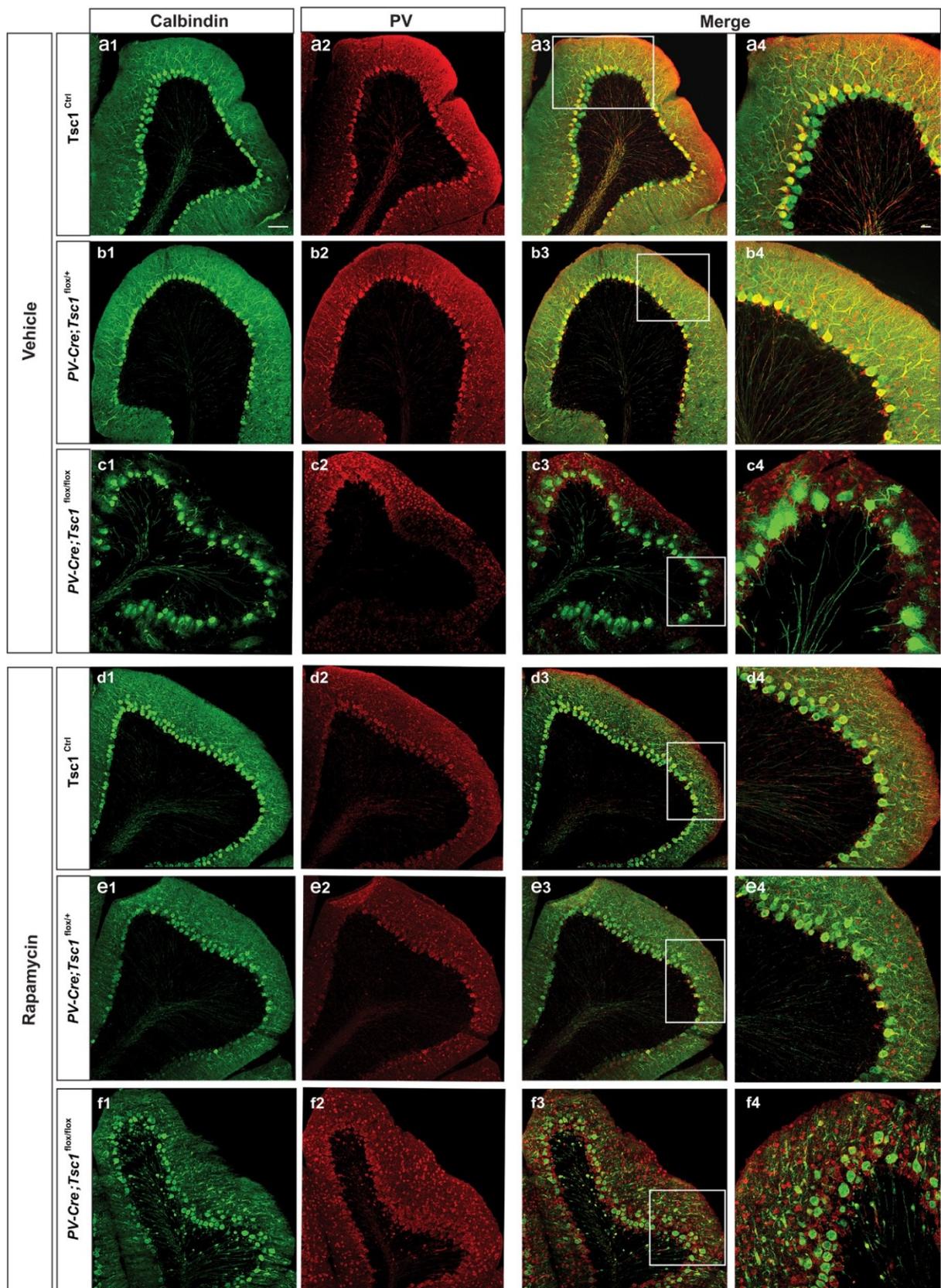
ANOVA, $F_{\text{treatment}} (1, 39)=0.04043$ $p=0.8417$, $F_{\text{genotype}} (1, 39)=6.755$ $p=0.0131$, $F_{\text{genotype*treatment}} (1, 39)=5.252$ $p=0.0274$; * $p<0.05$, ** $p<0.001$; Bonferroni's multiple comparisons test); PV cells: $n=14$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$, $n=14$ $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$, $n=8$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ + Rapamycin, $n=6$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/+}}$ + Rapamycin. Similarly, loss of local branching in PV cells from $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$ mice is reversed by Rapamycin treatment (**f**) (Two-way ANOVA, $F_{\text{radius}} (1.991, 77.65)=308$ $p<0.0001$, $F_{\text{Treatment}}(3, 39)=4.296$ $p=0.0103$, $F_{\text{genotype}}(39, 312)=4.579$ $p<0.0001$, $F_{\text{radius*treatment}} (24, 312)=3.118$ $p<0.0001$, ** $p<0.001$, *** $p<0.001$; Bonferroni's multiple comparisons test); PV cells: $n=14$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$, $n=15$ $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$, $n=8$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ + Rapamycin, $n=6$ $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$ + Rapamycin. **g**, Rapamycin treatment reverses the loss of percentage of innervation in mutant PV cells, while it leads to significant loss of innervation in PV cells from $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ mice (Two-way ANOVA, $F_{\text{genotype}} (1, 35)=0.0002$ $p=0.9883$, $F_{\text{treatment}} (1, 35)=1.583$ $p=0.2167$, $F_{\text{genotype*treatment}} (1, 35)=18.49$ $p=0.0001$, * $p<0.05$, ** $p<0.001$; Bonferroni's multiple comparisons tes). Arrowheads indicate boutons. PV cells: $n=12$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$, $n=14$ $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$, $n=7$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ + Rapamycin, $n=6$ $Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{\text{lox/+}}$ + Rapamycin. Scale bars: **a1-d1**, 10 μm ; **a2-d2** and **a3-d3**, 5 μm . Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 10. Short term Rapamycin treatment does not rescue loss of perisomatic innervations in *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* mice at EP34.

a, b, PV cell (green) among NeuN immunostained neurons (blue) in cortical organotypic cultures from a *Tsc1^{Ctrl}* mouse at EP34 where **b** is treated with Rapamycin. **c, d**, PV cells from *Tg(Nkx2.1-Cre);Tsc1^{lox/lox}* where **d** is treated with Rapamycin. **e, f**, Loss of bouton density (**e**) (Two-way ANOVA, $F_{\text{treatment}} (1, 39)=1.100$ $p=0.3007$, $F_{\text{genotype}} (1, 39)=8.473$ $p=0.0059$,

$F_{\text{genotype} \times \text{treatment}} (1, 39) = 0.4700$ $p = 0.4970$; * $p < 0.05$; Bonferroni's multiple comparisons test; PV cells: $n = 14$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$, $n = 14$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}}$, $n = 8$ $Tsc1^{\text{Ctrl}} + \text{Rapamycin}$, $n = 7$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}} + \text{Rapamycin}$) and terminal branching (f) (Two-way ANOVA, $F_{\text{radius}} (8, 304) = 388.7$ $p < 0.0001$, $F_{\text{Treatment}} (3, 38) = 2.238$ $p = 0.0995$, $F_{\text{genotype}} (38, 304) = 8.573$ $p < 0.0001$, $F_{\text{radius} \times \text{treatment}} (24, 304) = 4.930$ $p < 0.0001$, Bonferroni's multiple comparisons test * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; PV cells: $n = 13$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$, $n = 14$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}}$, $n = 8$ $Tsc1^{\text{Ctrl}} + \text{Rapamycin}$, $n = 7$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}} + \text{Rapamycin}$) in PV cells from $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}}$ mice are only partially reversed by Rapamycin treatment. g, Loss of percentage of innervation in PV cells from $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}}$ is not reversed by Rapamycin treatment. Moreover, Rapamycin treatment in $Tsc1^{\text{Ctrl}}$ mice causes significant loss of innervation (Two-way ANOVA, $F_{\text{treatment}} (1, 35) = 4.422$ $p = 0.0427$, $F_{\text{genotype}} (1, 35) = 4.424$ $p = 0.00427$, $F_{\text{genotype} \times \text{treatment}} (1, 35) = 5.720$ $p = 0.0223$; Bonferroni's multiple comparisons test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; PV cells: $n = 11$ $Tsc1^{\text{Ctrl}}$, $n = 14$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}}$, $n = 7$ $Tsc1^{\text{Ctrl}} + \text{Rapamycin}$, $n = 7$ $Tg(Nkx2.1-Cre); Tsc1^{\text{lox/lox}} + \text{Rapamycin}$). Arrowheads indicate boutons. Scale bars: **a1-d2**, 10 μm ; and **a3-d3**, 5 μm . Data represent mean \pm SEM.



Supplementary Figure 11. Short term Rapamycin treatment does not rescue cerebellar abnormalities in adult homozygous mutant mice.

Coronal sections of cerebellar cortex immunostained for Calbindin (green) and PV (red) in Vehicle treated *Tsc1*^{Ctrl} mice (**a1-a4**), *PV-Cre;Tsc1*^{flx/+} mice (**b1-b4**), *PV-Cre;Tsc1*^{flx/flx} mice (**c1-c4**) and Rapamycin treated *Tsc1*^{Ctrl} mice (**d1-d4**), *PV-Cre;Tsc1*^{flx/+} mice (**e1-e4**), *PV-Cre;Tsc1*^{flx/flx} mice (**f1-f4**). Note that we did not observe any obvious abnormality in *PV-Cre;Tsc1*^{flx/+} mice, while the *PV-Cre;Tsc1*^{flx/flx} mice were significantly affected and the rescue with rapamycin treatment was only partial (**f4**). Scale bars: **a1-f3**, 10 μ m; and **a4-f4**, 5 μ m.

Chapitre III

Second Article

Le précédent article nous a permis de déterminer les mécanismes d'action sous-tendant le fonctionnement altéré des cellules PV dans le modèle conditionnel de la sclérose tubéreuse. Par ailleurs, nous avons trouvé que ces animaux avaient un comportement social atypique caractéristique des maladies du spectre de l'autisme. De plus, les travaux récents ont impliqué des altérations du traitement des informations sensorielles dans la pathophysiologie de l'autisme. À cet égard, dans le présent article intitulé "**Sensory input modulation rescues alterations in parvalbumin cell connectivity and texture discrimination caused by *Tsc1* haploinsufficiency**", nous avons investigué sur de possibles déficits sensoriels, aux niveaux comportemental, immunohistochimique et électrophysiologique, chez notre modèle à l'étude.

Contributions détaillées

Clara Amegandjin : conception, exécution et analyse des expériences relatives aux divers comportements, à la microscopie électronique, à l'immunohistochimie et à l'imagerie ainsi qu'aux diverses expériences concernant le renversement des phénotypes synaptique et comportemental. Rédaction du manuscrit.

Maria Isabel Carreño-Muñoz: conception, exécution et analyse des expériences reliées aux enregistrements électrophysiologiques. Rédaction du manuscrit.

Antoine Farley: participation à l'exécution et aux analyses des expériences sur Vglut1-PSD95 et Vglut2-PSD95.

Antônia Samia Fernandes do Nascimento: assistance technique.

Graziella Di Cristo : conception, coordination, supervision du projet et rédaction du manuscrit.

Sensory input modulation rescues alterations in parvalbumin cell connectivity and texture discrimination caused by *Tsc1* haploinsufficiency

Clara A. Amegandjin^{1,2}, Maria Isabel Carreño-Muñoz^{1,2}, Antoine Farley², Antônia Samia Fernandes do Nascimento², Graziella Di Cristo^{1,2}

Affiliations:

¹ Neurosciences Department, Université de Montréal;

² Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine (CHUSJ) ;

*Corresponding author :

Graziella Di Cristo,

Professor, Department of Neurosciences, Université de Montréal,

Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine,

3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

E-mail: graziella.di.cristo@umontreal.ca

In preparation for submission

3.1. ABSTRACT

In addition to cognitive impairments, autism spectrum disorders (ASDs) often result in sensory processing deficits. However, the neurobiological mechanisms that underlie impaired sensory processing associated with ASDs are poorly understood. Dysregulations of the Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) signalling pathway are frequently associated with ASDs, however its implications in sensory processing deficits are less clear. Here, we show that haploinsufficiency of the mTORC1 negative regulator *Tsc1* restricted to parvalbumin-expressing GABAergic cells (PV cells) is sufficient to cause increased texture discrimination and whisker-evoked responses in somatosensory cortex. We further find that cortical and thalamocortical glutamatergic inputs to PV cells are selectively reduced in adult mice, whereas these inputs did not appear affected yet in pre-adolescent mice. Finally, we identify a sensitive postnatal window during which limiting sensory inputs by whisker trimming is sufficient to normalize PV cell connectivity in pre-adolescent mice, while rescuing deficits in both PV cell outputs and cortical glutamatergic inputs as well as texture discrimination hyper-sensitivity in adult conditional haploinsufficient mice. These results suggest that manipulating inhibition may help ameliorating sensory processing in disorders associated with dysregulated mTORC1 signalling.

3.2. INTRODUCTION

Autism spectrum disorders (ASDs) are characterized by social interaction and communication difficulties as well as repetitive or restricted behaviour. However, a growing number of reports suggest that sensory processing is also affected in a majority of patients with ASDs (Robertson and Baron-Cohen, 2017; Balasco et al., 2019). In fact, sensory abnormalities are now commonly recognized as diagnostic criteria in ASDs, as reported in the last edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-V). About 90% of ASD individuals have atypical sensory experiences, described as both hyper- and hypo-reactivity, with abnormal responses to tactile stimulation representing a very frequent finding (Marco et al., 2011). In particular, recent studies suggest that abnormal responses to touch are highly correlated with, and predictive of, ASD severity. Children with ASDs often exhibit greater sensitivity to light touch than children with other developmental disorders (Wiggins et al., 2009), and touch avoidance during infancy predicts deficits in social development and ASD diagnosis in young children (Mammen et al., 2015). ASDs are heritable, genetically heterogeneous disorders, and some ASD forms have been linked to single-gene mutations (Costa-Mattioli and Monteggia, 2013). In the last two 2 decades, the remarkable progress made in identifying ASD-associated genes resulted in the generation of several ASD mouse models, allowing the dissection of the effects of single mutations on sensory processing, which represent an opportunity for a better comprehension of the neurobiological bases underpinning sensory abnormalities.

The serine/threonine protein kinase mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is a signalling hub, coordinating information between the intra- and extracellular environment (Karalis and Bateup, 2021). In the brain, mTORC1 signalling has been linked to fundamental neural processes such as progenitor proliferation, differentiation, neuronal migration, cell survival, axon and dendrite development, membrane excitability, and synaptic

transmission and plasticity (Jaworski and Sheng, 2006; Switon et al., 2017). Consistent with its multifaceted roles in the nervous system, deregulation of mTORC1 signalling is associated with numerous neurological and psychiatric disorders (Costa-Mattioli and Monteggia, 2013; Lipton and Sahin, 2014; Karalis and Bateup, 2021). Indeed, mutations in genes that encode mTORC1 regulators lead to neurodevelopmental disorders with shared neurological manifestations, collectively referred as “mTORopathies”. Notably, ASD is frequently associated with mTORopathies (Ganesan et al., 2019). In parallel, mTORC1 dysregulation has been observed in several neurodevelopmental and psychiatric disorders, including ASDs (Costa-Mattioli and Monteggia, 2013; Lipton and Sahin, 2014; Karalis and Bateup, 2021). Whether and how mTORC1 signalling dysregulation affect tactile stimuli processing is not well understood.

Several studies suggest that ASD pathogenesis might involve an imbalance between excitation and inhibition (E/I imbalance) (Sohal and Rubenstein, 2019). This hypothesis is supported by several lines of evidence showing that γ -aminobutyric acid (GABA) circuits and neurotransmission are altered in ASD patients and animal models (Marin, 2012; Bozzi et al., 2018). Since GABAergic neurotransmission plays a key role in tactile stimuli processing (Dykes et al., 1984; Swadlow, 2003; Iannone and De Marco Garcia, 2021), alterations in distinct GABAergic cell population connectivity and function might underly these specific sensory dysfunctions in ASD mouse models. Cortical GABAergic neurons differ in morphology, intrinsic physiological properties, and connectivity (Fishell and Rudy, 2011). Parvalbumin (PV) expressing GABAergic interneurons (PV cells), which form synapses specifically on the soma and proximal dendrites of pyramidal cells, represent the largest class of cortical interneurons and are involved in sensory discrimination (Lee et al., 2012; Chen et al., 2018; Goel et al., 2018; Khan et al., 2018). PV cell restricted haploinsufficiency of *Tsc1*, a negative regulator of mTORC1, causes a premature increase in bouton formed by mutant PV

cells, followed by a loss of perisomatic innervation in adult mice, which also show social behavioural deficits (Amegandjin et al., 2021). Of note, treatment with the mTOR inhibitor Rapamycin during the third postnatal week rescues deficits in both PV cell innervation and social behaviour in adult conditional haploinsufficient mice (Amegandjin et al., 2021), suggesting that intervention during a sensitive developmental window may provide long-term neurological protection against the effects of mTORC1 dysregulation. Whether mTORC1 dysregulation specifically in PV cells contribute to tactile stimuli processing abnormalities, and the underlying molecular mechanisms, are not known.

Here, we found that PV cell-specific conditional *Tsc1* heterozygous mice showed increased texture discrimination, which was rescued by short-term rapamycin treatment during the first postnatal week. This phenotype was associated with increased whisker-evoked responses in primary somatosensory cortex. We further found that mutant PV cells showed reduced cortical and thalamocortical glutamatergic inputs in adult, but not preadolescent, mice. Both PV cell connectivity in pre-adolescent and adult mice and texture discrimination in adult mice were rescued by whisker trimming during the third postnatal week, suggesting that modulating sensory inputs during a sensitive developmental time window was sufficient to correct sensory processing abnormalities in adulthood.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Animals

Tsc1 floxed mice with loxP sites flanking exons 17 & 18 of *Tsc1* gene (*Tsc1^{fllox/fllox}*) were purchased from Jackson Laboratories (Cat# 005680). A driver mouse line expressing Cre recombinase, *PV-Cre* (Jackson Laboratories, Cat# 008069) (Runyan et al., 2010) was crossed to the *Tsc1* floxed mice and the respective progenies were backcrossed to generate the

heterozygous and control genotypes within the same litter. To control for the pattern of expression of Cre, we introduced the RCE allele using Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/J mice (Jackson laboratories). The RCE line carries a loxP-flanked STOP cassette upstream of eGFP sequence within the Rosa26 locus. Removal of the loxP-flanked STOP cassette by Cre-mediated recombination allows promoter-specific downstream eGFP expression (Sousa et al., 2009). All mice were housed under standard pathogen-free conditions in a 12h light/dark cycle with *ad libitum* access to sterilized laboratory chow diet. Animals were treated in accordance with Canadian Council for Animal Care and protocols were approved by the Animal Care Committee of CHU Ste-Justine Research Center.

3.3.2. Mice Genotyping

DNA was extracted from mouse tail and genotyped to detect the presence of Cre alleles and Tsc1 conditional and wild-type alleles. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using 3 separate primers: F4536 (5'-AGGAGGCCTCTTCTGCTACC-3'), R4830 (5'-CAGCTCCGACCATGA AGTG -3') and R6548 (5'-TGGGTCCTGACCTATCTCCTA-3') with band sizes of 295bp for the wild-type and 480bp for the floxed allele. 3 separate primers were also used for detecting Cre in *PV*-Cre breeding were F1 (5'-CAGCCTCTGTTCCACATACTCC-3'), F2 (5'- GCTCAGAGCCTCCATTCCCT-3') and R1 (5'-TCACTCGAGAGTACCAAGCAGGCAGGA GATATC-3') which generated 400bp and 526bp (mutant and wild-type) bands. To detect the presence of RCE alleles, 3 separate primers namely, RCE-Rosa1(5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC-3'), RCE-Rosa2 (5'GAAGGAGCGGGAGAAATGGATATG-3') and RCE-Cag3(5'-CCAGGCGGGC CATTACCGTAAG-3') were used which generated 350bp and 550bp bands.

3.3.3. Mouse behavior tests

Room lights were low during all procedures. A camera was mounted above the arena and object exploration was tracked using a computer running the Smart Software (Panlab, Harvard Apparatus). Only males were used in these studies and investigators were blind to genotype during both testing and analysis.

Texture discrimination test: The test was performed in the open-field apparatus. This test was used to assess sensitivity in the mice and consist of three trials. Between trials, the objects and the box were cleaned with 70% ethanol. Mice were first habituated to the open field chamber by allowing free exploration of an empty chamber for 5 min. The subsequent sessions included a learning phase and a testing phase. In the first session (learning phase), the mouse was placed in the testing arena, equidistant to the two identical objects placed in the center of the arena. These objects presented similar textures, shapes, colors, and sizes. The two objects were positioned equidistant from the center of the arena, and equidistant from the walls of the arena. Each mouse was allowed to explore the objects for 10 minutes. Animals were then removed from the testing arena and placed in a transport cage for 5 minutes. During this time, the arena was cleaned with 70% ethanol, and one of the objects was replaced with a novel object that differed from the familiar object only in texture. The mouse was then placed back into the chamber and allowed to explore objects for 10 minutes (testing phase) (Wu et al., 2013; Orefice et al., 2016). The amount of time the mouse spent physically investigating each of the objects was manually determined for all the trials and was used to calculate the discrimination index as well as the total exploration time.

Novel Object recognition test: The novel object recognition was conducted following the same protocol described above, only the testing phase differed since the novel object introduced in that phase differed from the familiar object in shape and color (the texture of both objects was unchanged).

3.3.4. Rapamycin treatment

Rapamycin (3 mg/kg; i.p.) was administered daily to pups from P14 to P21. Rapamycin stock solution (20 mg/ml in 100% ethanol) was stored at -20°C. Before injection, stock solution was diluted in 5% Tween 80 and 5% polyethylene glycol 400 to a final concentration of 1 mg/ml rapamycin in 4% ethanol (Buckmaster and Wen, 2011).

3.3.5. Sensory deprivation

The transient restriction of neonatal vibrissal input was achieved by cutting the whiskers close to the intersection with the skin of P14 pups. Mice were restrained by hand and all whiskers were trimmed every two days to within 1 mm of the skin for 8 days (p14 to P21). Pups were then allowed to mature without further intervention except for weekly cage cleaning. Before behavioral test, all whiskers regrew and were of the equivalent length to untrimmed mice (Sieben et al., 2015; Soumiya et al., 2016).

3.3.6. Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially with saline followed by 4% Paraformaldehyde (PFA 4%) in phosphate buffer (PB 0.1M, pH 7.2). Brains were post-fixed with 4% PFA overnight and subsequently transferred to a 30% sucrose solution in sodium phosphate-buffer (PBS) for 48hrs. They were then frozen in molds filled with Tissue Tek using a 2-Methylpentane bath cooled with a mixture of dry ice and ethanol (~ -70°C). Optimal cutting temperature and coronal sections of 40 µm were obtained using a cryostat (Leica VT100). Brain sections were blocked in 10% normal goat serum (NGS) and 1% Triton X-100 for 2 hr at RT. Slices were then incubated for 48h at 4°C with the following primary antibodies: mouse anti-PSD-95

(1:500, Invitrogen, Cat# MA1045), rabbit anti-Vglut1 (1:100, Invitrogen, Cat# 482400), rabbit anti-Vglut2 (1:500, Synaptic Systems, Cat# 135402), mouse anti-PV (1:1000, Swant, Cat# 235), rabbit anti-PV (1:5000, Swant, Cat# PV27), mouse anti-gephyrin (1:500, Synaptic Systems, Cat# 147021), chicken anti-GFP (1:1000, Abcam, Cat# 13970). It was followed by incubation with secondary antibodies for 2h at RT to visualize primary antibodies. The secondary antibodies used were Alexa-Fluor conjugated 488, 555, 633, and 647 (1:400, Life technologies; 1:1000, Cell Signaling Technology). After rinsing in PBS (three times), the slices were mounted in Vectashield mounting medium (Vector).

3.3.7. Confocal Imaging and Quantitative analysis

All imaging was performed using Leica confocal microscopes (SP8 or SP8-STED). We imaged somatosensory cortex layers 4 and 5 using 63X oil (NA1.3) objective, Zoom 1.5. At least three confocal stacks from 3 different brain sections were acquired in layers 4 (for Vglut2/PSD-95 puncta) and 5 (for PV/gephyrin and Vglut1/PD-95 puncta) with z-step sizes of 0.5. PV+, gephyrin+, PV+/gephyrin+, Vglut1+, Vglut2+, PSD-95+, Vglut1+/PSD-95+ and Vglut2+/ PSD-95+ puncta were counted around GFP positive somata after selecting the confocal plane with the highest soma circumference using ImageJ-Fiji software (custom-made ImageJ-Fiji macro). At least 6-8 GFP positive somata were selected in each confocal stack.

3.3.8. Electron microscopy

The electron microscopy was carried out on 2 groups, *Tsc1*^{Ctrl} and *PV-Cre;Tsc1*^{lox/+} mice, at P60. Mice were anesthetized and perfused with 0.1M PBS (0.9% NaCl in PB 0,2M; pH 7.4) followed by 2,5% glutaraldehyde + 2% PFA in 0.1M PB, pH 7.4. Following perfusion, the brains were further fixed for 2 hours at room temperature (RT) in the perfusion solution.

Transverse 50- μm -thick sections of the brain were cut in cooled PBS with a vibratome (Leica, VT1000S). They were stored at -20°C in antifreeze solution (40% PB, 30% ethylene glycol, 30% glycerol) until used. Sections were immersed in 0.1% borohydride (in PBS) for 15 min at room temperature (RT), washed in PBS, and processed freely floating following a pre-embedding immunoperoxidase protocol previously described (Tremblay et al., 2007). Briefly, after rinsing in PBS, sections were preincubated (1-hour) at RT in a protein blocking solution (Expose Rabbit-Specific HRP/DAB detection IHC Kit, Abcam, Cambridge, UK, ab80437). Then, the sections were incubated for 48 hours at 4°C with rabbit anti-PV (1:1000, Swant, Cat# PV27) in PBS containing 1% NGS, followed by wash (three times in PBS) and incubation for 45 min at RT, in goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Abcam, Expose Kit, Cat# ab80437). After rinsing in PBS, immunoreactivity was visualized with hydrogen peroxide in the presence of di-aminobenzodine (DAB Chromogen, Abcam Expose Kit, Cat# ab80437). Thereafter, sections were rinsed in PB, postfixed flat in 1% osmium tetroxide for 1 hour and dehydrated in ascending concentrations of ethanol (50%, 70%, 90%, 100%, and finally in ethanol anhydrous). They were then treated with propylene oxide and then impregnated in resin overnight (Durcupan ACM; Sigma) at RT, mounted on aclar embedding film (EMS, Hatfield, PA) and cured at 55°C for 48 hours. Areas of interest from the somatosensory cortex (layers 5/6) were excised from the embedded sections and glued to the tip of prepolymerized resin blocks. Ultrathin (50-70 nm) sections were cut with an ultramicrotome (Reichert UltracutS, Leica, Wetzlar, Germany), collected on bare 150 square-mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), stained with lead citrate, and examined at 80 KV with a Philips CM100 electron microscope, equipped with an 8 MB digital camera (AMT XR80).

To analyze the electron microscopy data, cellular profiles were identified according to well established criteria (Tremblay et al., 2007). All PV labeled structures were classified in different categories such as: dendritic shafts, axons and axon terminals. All the subcellular

profiles that were difficult to identify were classified as “unknown”. To provide a better appraisal of the frequency of each type of cellular elements displaying immunolabelling, about eighty to hundred micrographs were randomly taken at 25000X in each animal, corresponding to a total surface of $\sim 2000 \mu\text{m}^2$. Labeled profiles were counted in all micrographs. Results were expressed as number of immunopositive profiles per $100 \mu\text{m}^2$ of neuropil then normalized over results from the control mice. The area of neuropil and synapses lengths were measured using Neurolucida (MicroBrighField).

3.3.9. Surgery for electrode implant

Anesthesia was induced by an intraperitoneal injection of urethane using an initial large dose (1.5 g/kg, i.p.) followed by supplementary small doses (0.1–0.15 g/kg) if necessary during the recording, as indicated by the presence of a withdrawal response of the limb to pinch. The animal was transferred to the stereotaxic apparatus for both surgery and subsequent recording. A craniotomy was performed on the right somatosensory cortex of the brain at the following coordinates: -1.5 mm posterior to Bregma, 2.7 mm lateral to the midline. Electrodes were positioned 0.8 mm deep. A second craniotomy was performed in the contralateral prefrontal lobe where the reference and ground reference wire were placed. Custom-made electrodes were compounds by a cluster of five $50\mu\text{m}$ -diameter-insulated-tungsten wires. Wires tips were $100 \mu\text{m}$ apart to reach different depths. Body temperature was maintained at 36°C – 37°C by a thermostatically controlled heating pad.

3.3.10. EEG recording

EEG recordings were performed using an open-ephys GUI platform (<https://open-ephys.org/>) at a sampling rate of 20 KHz. Custom designed stimuli trigger generator devices

sent triggers directly to the recording system assuring the time precision of the stimuli presentation. Whisker stimulation was presented by a custom 3D printed paddle that rotated by an automatically controlled motor at every stimulus presentation. The position of the paddle was always kept at the same angle. Each stimulation corresponded to a whole rotation of the paddle which lasted for 1 second and the interval between each was fixed at 2 seconds. A total of 100 stimuli were presented and the full protocol lasted 5 minutes.

3.3.11. Data preprocessing

EEG signal was down-sampled to 2000 Hz. A notch filter (59.5–60.5 Hz) was applied to remove residual 60 Hz power-line noise contaminations. A wideband filter (0.5-150 Hz) was also applied. Data were then segmented into periods of 2500 ms (500 ms pre- and 2000 ms post-stimulus onset).

3.3.12. Data Analysis

Signal analysis and quantification was performed using custom MATLAB (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) code, available upon request.

Evoked Related Potentials (ERP): EEG signal was, baseline corrected to the mean voltage of the 150 ms prior stimulus onset and averaged over trial. Baseline-to-peak N1 component was automatically detected by subtracting the minimum voltage (negative peak) within a 10- to 500-millisecond time window after stimulus onset to the averaged baseline value. Analyses were done using Fieldtrip toolbox v 20200932.

Power Spectrum Density (PSD) was calculated using multitaper methods in order to increase spectral resolution. In this case, we used another chronux function called *mtspectrumc*. PSD analyses were performed over periods of stimulation (0-1000 ms after stimuli) and over the

baseline periods (-500 to 0 ms before stimuli). We then performed a baseline correction, following the formula:

$$BLC = 10 * \log_{10} (PSD_{stimulation}/PSD_{baseline})$$

3.3.13. Statistics and reproducibility

All experiments were repeated independently at least two times. All the statistical analyses were performed using Prism 9.0 (GraphPad Software). Prior to making comparisons across values, the normality of distribution was tested using D'Agostino-Pearson test. Differences between 2 experimental groups were assessed using two-tailed t-test or t-test with Welch's correction for normally distributed data and Mann Whitney test for not normally distributed data. All bar graphs represent mean \pm SEM.

3.4. DATA AVAILABILITY

Detailed statistic and all data generated and analyzed in the article are available from the corresponding author upon request.

3.5. RESULTS

3.5.1. Short-term rapamycin treatment rescued aberrant tactile perception caused by PV-cell specific *Tsc1* haploinsufficiency

Tsc1 deletion in postnatal PV cells leads to alterations in social behavior (Amegandjin et al., 2021). Since sensory processing abnormalities may contribute to social behavior alterations, we asked whether this mouse model exhibited deficits in texture discrimination and tactile sensitivity, by using a texture-specific novel object recognition test (textured NORT)

(Orefice et al., 2016; Orefice et al., 2019). Both conditional heterozygous mice and their control littermates preferentially explored the object with novel texture, however the mutant mice showed a significantly higher discrimination index than wild-type ones (Figure 1A). The total amount of time spent investigating objects during the test did not differ between mutants and control littermates (Figure 1B) indicating that mutant mice did not exhibit an aversion to either object, and they did not avoid tactile exploration. To investigate whether these deficits were specific for textured NORT and were not due to a general memory deficit, we tested the novelty seeking behavior of the mice by using a shape NORT in which the objects differed in color and shape but not in texture (Figure 1C,D). In this test, *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice performed similarly to control mice, suggesting that these mice did not have a learning or short-term memory deficits. We have previously shown that a short-term rapamycin treatment during early postnatal development can rescue long term effects on social behavior of PV cell specific- *Tsc1* haploinsufficiency *in vivo* (Amegandjin et al., 2021). We therefore sought to investigate whether a short-term rapamycin treatment could also rescue the textured NORT deficits in conditional heterozygous mice. We treated *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice and control littermates daily with either rapamycin (3 mg/kg; i.p.) or vehicle from P14 to P21 and analyzed textured NORT at P60 (Figure 1E,F). We found that rapamycin treatment completely rescued texture discrimination alterations in *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}*, while it did not have any discernable effects on wild-type littermates (Figure 1F). Therefore, *Tsc1*-mTORC1 signaling dysregulation in PV cells induced aberrant tactile perception that can be permanently rescued with short-term rapamycin treatment during the third postnatal week.

3.5.2. PV-cell specific *Tsc1* haploinsufficient mice showed increased cortical responses to whisker stimulation.

Event-related potentials (ERPs) induced by simple sensory stimulus, such as whisker deflection-evoked potentials, described by the waveform of EEG activity in the first 500 ms after stimulus presentation, are the cortical responses most commonly used to study sensory perception (Modi and Sahin, 2017). Here, we analysed ERPs in *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice and control littermates (Figure 2A). *Mutant* mice exhibited increased amplitude of the N1 component of the ERPs compared to wild-type mice (Figure 2A2), with no changes in ERP temporal dynamics (Figure 2A3).

Since neural oscillations in the gamma band (30-100Hz) are associated with sensory processing and cognition (Cardin, 2016), we analysed power density spectra following whisker stimulation (Figure 2B1). *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice showed a highly significant increase in gamma power compared to wild-type littermates (Figure 2B2). We further investigated whether PV cell-specific *Tsc1* haploinsufficiency lead to temporal changes in distinct oscillation power over the frequency domain. To answer this question, we performed phase amplitude coupling (PAC) analysis. We found significantly increased PAC between theta and gamma bands in conditional heterozygous mice (Figure 2C1, C2), suggesting that sensory stimulations lead to excessively coordination of the temporal organization of oscillatory activity in PV cell-specific *Tsc1* haploinsufficient mice. Altogether, these data suggest that whisker stimulation leads to enhanced cortical responses in mutant, which are consistent with the observed increased tactile perception.

3.5.3. *Tsc1* haploinsufficient PV cells show age-specific alterations of glutamatergic inputs

We sought to identify the cellular correlates underlying the sensory over-responsiveness in the mutant mice. *Tsc1* deletion has been shown to affect glutamatergic synapse formation (Tavazoie et al., 2005; Bateup et al., 2011), we therefore quantified glutamatergic synapses density around PV cell somata by immunostaining cortical slices with pre-synaptic (Vglut1- vesicular glutamate transporter 1) and post-synaptic (PSD-95- post-synaptic density 95) markers in cortical layer 5 (L5) of p60 mice (Figure 3A-D). We found that the density of perisomatic Vglut1+/PSD-95+ puncta was significantly decreased in adult heterozygous mice (Figure 3E) compared to the control $TSC1^{ctrl}$. Furthermore, we analyzed the density of asymmetrical synapses (which represent glutamatergic inputs) onto PV cell dendrites by electron microscopy (Figure 3F-I). We found that while the density of PV-positive dendrites was not significantly different between *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice and wild-types littermates (Figure 3J), the density of dendrites bearing asymmetrical synapses was significantly reduced in the mutant mice (Figure 3K). These results suggest that PV cell-specific *Tsc1*-haploinsufficiency lead to reduced excitatory inputs onto adult PV cells.

In sensory areas, the granular layer 4 (L4) is the primary target of thalamic input, thus it is considered to be the first stage of processing in the laminar hierarchy. Thalamocortical pre-synaptic site can be identified by their immunoreactivity for the vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2) (Bopp et al., 2017). We thus analyzed putative thalamocortical synapses onto PV cell somata, by quantifying the density of Vglut2+/PSD-95+ colocalized puncta in somatosensory cortex L4. We found a significant reduction of Vglut2+/PSD-95+ puncta in adult heterozygous mice (Figure 4), suggesting that the deficits caused by *Tsc1* deletion in PV cells affected both Vglut1+ and Vglut2+ synapses in adult mice.

We previously found that PV-cell restricted, postnatal *Tsc1* haploinsufficiency caused a premature increase in cell synapses formed by mutant PV cells, followed by a loss of

perisomatic innervation in adult mice (Amegandjin et al., 2021). Thus, we sought to investigate the effects of *TSC1* haploinsufficiency on the development of Vglut1+ and Vglut2+ synaptic inputs onto PV cells specifically during the critical developmental time window previously identified, namely P14-21 (Figure 5). Since Cre expression does not reach plateau until the 4th postnatal week in the PV-Cre mouse line we used, we generated *PV-Cre;RCE;Tsc1^{+/+}* and *PV-Cre;RCE;Tsc1^{fllox/+}* mice. The RCE allele carried a coding sequence for GFP downstream a floxed stop codon. Using this strategy, we could identify the somata of recombined PV cells thanks to Cre-dependent GFP expression. In contrast to what was observed in adult mice, Vglut1+/PSD-95+ as well as Vglut2+/PSD-95+ density was not significantly different in P21 conditional heterozygous mice compared to control littermates (Figure 5A-E; F-J).

3.5.4. Short-term whisker deprivation during the third postnatal week rescued connectivity deficits and aberrant tactile perception in *PV-Cre; Tsc1^{fllox/+}* mice

Our data suggest that *Tsc1* haploinsufficiency in PV cells induced tactile hypersensitivity in *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* mice, which is associated with reduced thalamocortical and cortico-cortical inputs onto PV cell somata and reduced PV cell connectivity in adult somatosensory cortex. Since PV cell maturation is dependent on sensory experience (Pizzorusso et al., 2002; Chattopadhyaya et al., 2004), we hypothesized that reduction of PV cell activity through a sensory deprivation manipulation during early postnatal development might be sufficient to lead to long-term rescue of PV cell inputs deficits and, possibly, texture discrimination deficits. To directly test this hypothesis, we transiently restricted the neonatal vibrissal input development by cutting the whiskers of these mice close to the intersection with the skin. Whiskers of *PV-Cre;RCE;Tsc1^{fllox/+}* and their control littermates (*PV-Cre;RCE;Tsc^{+/+}*) were trimmed every two days to within 1 mm of the skin from P14 to P21. We then immunostained and analyzed PV cell perisomatic synaptic inputs and outputs density at the

end of the deprivation period (Figure 6A). We found that this short sensory deprivation was sufficient to normalize the density of PV+/Gephyrin+ putative synapses onto target cell somata (Figure 6B1-B4) in mutant mice to control levels. In addition, the density of both Vglut1+/PSD-95+ and Vglut2+/PSD-95+ synapses onto PV cell somata was not affected by either *Tsc1* haploinsufficiency (Figure 5A-J) or sensory deprivation at this age (Figure 6C1-C4; D1-D4). Furthermore, sensory deprivation completely rescued the density of both PV+/Gephyrin+ and Vglut1+/PSD-95+ , but not Vglut2+/PSD-95+, synapses onto PV cell somata (Figure 7A-E) in the mutant mice. Strikingly, texture discrimination hyper-sensitivity was also rescued in conditional heterozygous adult mice to the levels observed in non-deprived control mice (Figure 7F,G). In contrast, sensory deprived control mice showed a trend towards tactile over-sensitivity (Compare Figure 7F-G and Figure 1A).

In summary, taken together, these data suggest that short-term sensory deprivation during a critical postnatal window is sufficient to maintain PV cell input/output connectivity and to rescue tactile discrimination deficits in the context of *Tsc1* haploinsufficiency.

3.6. DISCUSSION

Abnormal responses to touch are a core symptom in ASDs (Marco et al., 2011). GABAergic circuits play a central role in sensory processing, however whether dysfunctions of specific GABAergic cell circuits give raise to distinct sensory processing abnormalities, in particular regarding to somatosensory processing, was unclear. Here, we used a genetic mouse model to investigate how dysregulation of mTORC1 signalling, which is associated to multiple neurodevelopmental disorders including ADS, specifically in PV cells affects whisker-based texture discrimination. We found that mice carrying PV cell-restricted *Tsc1* haploinsufficiency showed significantly higher texture discrimination. These effects were not due to enhanced

memory since we detected no difference in a shape-novel object recognition test, where objects had identical texture.

PVCre;Tsc1^{+/-} mice showed also impaired social behaviour, in particular they showed no preference for a mouse compared to an object or for a novel mouse compared to a familiar one (Amegandjin et al., 2021). Atypical sensory processing could negatively impact social behaviour. For example, sensory symptoms are predictive of the subsequent appearance of impaired social behaviour and other autistic traits in ASD patients (Mammen et al., 2015; Rozenkrantz et al., 2015). It has been proposed that sensory stimuli and social behaviours may have a reciprocal influence on each other throughout development (Gliga et al., 2014). Supporting this hypothesis, early abnormal sensory sensitivity to stimuli predicts later joint attention and language development (Boyd et al., 2013) and higher levels of social impairment in adults with ASDs (Hilton et al., 2010). Touch in particular seems to play a critical role in several social aspects such as communication (Hertenstein et al., 2006), developing social bonds (Dunbar, 2010) and in brain connectivity (Brauer et al., 2016). In summary, abnormal tactile perception may be associated with and contribute to social dysfunctions. Thus, a better understanding of the neural circuits alterations that disrupt perceptual learning could shed light on the mechanistic basis and generate potential targeted therapeutic approaches for a range of autistic symptoms.

PV cell-restricted *Tsc1* haploinsufficient mice showed significantly increased texture discrimination, and consistently, increased sensory evoked responses following whisker deflection. The observed hyper-sensitivity is consistent with the “intense world theory”, which proposes an excessive functioning of sensory neural circuits as the base of sensory and social impairments. In this context, background-level sensory perception would be enhanced and coupled with deficits in sensory integration. Throughout development, this could lead to an over-specialization for perceiving primary sensory cues at the expense of the ability to navigate

in a socially complex world (Markram and Markram, 2010). This theory could thus offer a mechanism for how an up-regulation in primary sensory perception results in social avoidance and withdrawal.

Several studies showed that mTORC1-mediated signalling regulate glutamatergic synapses formation and plasticity (Bateup et al., 2011; Costa-Mattioli and Monteggia, 2013). In adult PV cell-restricted *Tsc1* haploinsufficient mice, we found that PV cells received less glutamatergic inputs, identified by colocalized Vglut1+/PSD95+ immunofluorescent puncta and asymmetric synapses by EM. Moreover, the density of Vglut2+/PSD95+ putative synapses was also decreased, thus, *TSC1* haploinsufficiency affects both intracortical and thalamocortical inputs onto PV cells in adult mice. Reduced glutamatergic inputs might lead to PV cell hypo-activity, which could contribute to sensory discrimination deficits. For example, impaired visual discrimination in a mouse model of Fragile X syndrome (*Fmr1*^{-/-} mice) correlated with a decreased in PV cell activity and, in turn, chemogenetic-mediated PV cell activation was sufficient to rescue the mutant mouse behavioural phenotype (Goel et al., 2018). In addition, PV cells in adult *PVCre;Tsc1*^{+/-} mice showed significantly reduced perisomatic innervations (Amegandjin et al., 2021), which likely further impaired their function, thus contributing to the behavioural phenotype.

Of note, in young (P22) mutant mice, both Vglut1+/PSD95+ and Vglut2+/PSD95+ putative synapse density on PV cell somata was not different compared to control littermates. *Tsc1*-mTORC1 signalling may play two different age-dependent roles in PV cells. For example, during the first few postnatal weeks, it may selectively promote PV cell synaptic growth, while it may directly affect cortico-cortical and thalamocortical synapse stability onto PV cell somata in adult mice. Reduced glutamatergic inputs onto PV cells may then contribute to PV synaptic loss in adults (Chattopadhyaya et al., 2007). Alternatively, *Tsc1*-mTORC1 signalling dysregulation during an early postnatal developmental window may cause circuit

changes, such as premature PV cell synapse formation (Amegandjin et al., 2021), which may then be directly responsible for the PV cell connectivity alteration and behavioural deficits occurring at later ages. Supporting this latter hypothesis, short-term rapamycin treatment during the third postnatal week was sufficient to rescue both excessive texture discrimination (Figure 7) and social behavioural deficits (Amegandjin et al., 2021) in adult mice.

Furthermore, we cannot exclude that glutamatergic drive onto PV cells may be already altered even in absence of detectable changes in perisomatic synapse density in preadolescent mice. Electrophysiological recording will address this issue. The imbalanced activation of PV cells versus pyramidal neurons might be in part responsible for changing the developmental trajectory of sensory cortex neuronal circuits, therefore contributing to the adult phenotypes. In addition, aberrant neuronal activity might contribute to mTORC1 signalling dysregulation (Bateup et al., 2013). Based on these reasons, we hypothesised that reducing somato-sensory inputs by whisker trimming during the third postnatal week may rescue excessive texture discrimination in adult mice. Supporting this hypothesis, mutant mice, which were whisker-trimmed from P14 to P22, showed a texture discrimination index similar to that of naïve wild-type mice. In addition, sensory deprivation completely rescued the loss of PV cell connectivity (PV+/Geph+ puncta) in pre-adolescent mutant mice, while rescuing both the loss of cortico-cortical synapse inputs (Vglut1+/PSD95+ puncta) and bouton outputs (PV+/Geph+ puncta) in adult mutant mice. In contrast, the loss of putative thalamocortical synapse inputs (Vglut2+/PSD95+ puncta) was not rescued by sensory deprivation in adult mutant mice. Of note, early visual deprivation has been shown to rescue premature PV cell bouton hyperconnectivity and visual acuity regression in a mouse model of Rett's syndrome (Durand et al., 2012), supporting the hypothesis that aberrant sensory-evoked activity during early life may contribute to long-term alterations in cortical connectivity and thus sensory processing.

In contrast to what was observed in mutant mice, whisker-trimmed wild-type mice showed a trend, albeit not significant, towards increased texture discrimination. Future studies will address whether and how PV cells input/output connectivity in wild-type mice is altered by this paradigm of sensory deprivation and how these alterations affect tactile stimuli processing.

3.7. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Kristian Agbogba and Éugénie Branchaud for their technical assistance, Marisol Lavertu-Jolin for helping with automatic quantification of putative synapses, the Comité Institutionnel de Bonne Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR), all the personnel of the animal facility of the Research Center of CHU Sainte-Justine (Université de Montréal), Compute Canada and the Plateforme Imagerie Microscopique of the Research Center of CHU Sainte-Justine for their instrumental technical support. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (G.DC), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), ERA-Net NEURON/DECODE! grant (G.DC) and La Fondation des Étoiles (G.DC.). C.A.A. is supported by an NSERC fellowship. M.I.C-M is supported by Overcôme Syngap1 Fondation.

3.8. AUTHORS CONTRIBUTION

CAA, MIC-M and GDC designed the experiments. CAA, MIC-M, AF, ASF-N performed the experiments. CAA, MIC-M and AF analyzed data. CAA, MIC-M, GDC wrote the manuscript. All authors read and corrected the manuscript.

3.9. COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

3.10. REFERENCES

- Amegandjin CA, Choudhury M, Jadhav V, Carrico JN, Quintal A, Berryer M, Snapyan M, Chattopadhyaya B, Saghatelian A, Di Cristo G (2021) Sensitive period for rescuing parvalbumin interneurons connectivity and social behavior deficits caused by TSC1 loss. *Nat Commun* 12:3653.
- Balasco L, Provenzano G, Bozzi Y (2019) Sensory Abnormalities in Autism Spectrum Disorders: A Focus on the Tactile Domain, From Genetic Mouse Models to the Clinic. *Front Psychiatry* 10:1016.
- Bateup HS, Takasaki KT, Saulnier JL, Deneffrio CL, Sabatini BL (2011) Loss of Tsc1 in vivo impairs hippocampal mGluR-LTD and increases excitatory synaptic function. *J Neurosci* 31:8862-8869.
- Bateup HS, Deneffrio CL, Johnson CA, Saulnier JL, Sabatini BL (2013) Temporal dynamics of a homeostatic pathway controlling neural network activity. *Front Mol Neurosci* 6:28.
- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KA, Schuhknecht GF (2017) An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *J Neurosci* 37:2435-2448.
- Boyd BA, Woodard CR, Bodfish JW (2013) Feasibility of exposure response prevention to treat repetitive behaviors of children with autism and an intellectual disability: a brief report. *Autism* 17:196-204.
- Bozzi Y, Provenzano G, Casarosa S (2018) Neurobiological bases of autism-epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. *Eur J Neurosci* 47:534-548.
- Brauer J, Xiao Y, Poulain T, Friederici AD, Schirmer A (2016) Frequency of Maternal Touch Predicts Resting Activity and Connectivity of the Developing Social Brain. *Cereb Cortex* 26:3544-3552.
- Buckmaster PS, Wen X (2011) Rapamycin suppresses axon sprouting by somatostatin interneurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52:2057-2064.
- Cardin JA (2016) Snapshots of the Brain in Action: Local Circuit Operations through the Lens of gamma Oscillations. *J Neurosci* 36:10496-10504.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, Huang ZJ (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24:9598-9611.
- Chen CC, Lu J, Yang R, Ding JB, Zuo Y (2018) Selective activation of parvalbumin interneurons prevents stress-induced synapse loss and perceptual defects. *Mol Psychiatry* 23:1614-1625.
- Costa-Mattioli M, Monteggia LM (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 16:1537-1543.
- Dunbar RI (2010) The social role of touch in humans and primates: behavioural function and neurobiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 34:260-268.

- Durand S, Patrizi A, Quast KB, Hachigian L, Pavlyuk R, Saxena A, Carninci P, Hensch TK, Fagiolini M (2012) NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of Mecp2. *Neuron* 76:1078-1090.
- Dykes RW, Landry P, Metherate R, Hicks TP (1984) Functional role of GABA in cat primary somatosensory cortex: shaping receptive fields of cortical neurons. *J Neurophysiol* 52:1066-1093.
- Fishell G, Rudy B (2011) Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Annu Rev Neurosci* 34:535-567.
- Ganesan H, Balasubramanian V, Iyer M, Venugopal A, Subramaniam MD, Cho SG, Vellingiri B (2019) mTOR signalling pathway - A root cause for idiopathic autism? *BMB Rep* 52:424-433.
- Gliga T, Jones EJ, Bedford R, Charman T, Johnson MH (2014) From early markers to neuro-developmental mechanisms of autism. *Dev Rev* 34:189-207.
- Goel A, Cantu DA, Guilfoyle J, Chaudhari GR, Newadkar A, Todisco B, de Alba D, Kourdougli N, Schmitt LM, Pedapati E, Erickson CA, Portera-Cailliau C (2018) Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. *Nat Neurosci* 21:1404-1411.
- Hertenstein MJ, Verkamp JM, Kerestes AM, Holmes RM (2006) The communicative functions of touch in humans, nonhuman primates, and rats: a review and synthesis of the empirical research. *Genet Soc Gen Psychol Monogr* 132:5-94.
- Hilton CL, Harper JD, Kueker RH, Lang AR, Abbacchi AM, Todorov A, LaVesser PD (2010) Sensory responsiveness as a predictor of social severity in children with high functioning autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 40:937-945.
- Iannone AF, De Marco Garcia NV (2021) The Emergence of Network Activity Patterns in the Somatosensory Cortex - An Early Window to Autism Spectrum Disorders. *Neuroscience* 466:298-309.
- Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34:205-219.
- Karalis V, Bateup HS (2021) Current Approaches and Future Directions for the Treatment of mTORopathies. *Dev Neurosci*:1-16.
- Khan AG, Poort J, Chadwick A, Blot A, Sahani M, Mrsic-Flogel TD, Hofer SB (2018) Distinct learning-induced changes in stimulus selectivity and interactions of GABAergic interneuron classes in visual cortex. *Nat Neurosci* 21:851-859.
- Lee SH, Kwan AC, Zhang S, Phoumthippavong V, Flannery JG, Masmanidis SC, Taniguchi H, Huang ZJ, Zhang F, Boyden ES, Deisseroth K, Dan Y (2012) Activation of specific interneurons improves V1 feature selectivity and visual perception. *Nature* 488:379-383.
- Lipton JO, Sahin M (2014) The neurology of mTOR. *Neuron* 84:275-291.

- Mammen MA, Moore GA, Scaramella LV, Reiss D, Ganiban JM, Shaw DS, Leve LD, Neiderhiser JM (2015) Infant Avoidance during a Tactile Task Predicts Autism Spectrum Behaviors in Toddlerhood. *Infant Ment Health J* 36:575-587.
- Marco EJ, Hinkley LB, Hill SS, Nagarajan SS (2011) Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings. *Pediatr Res* 69:48R-54R.
- Marin O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13:107-120.
- Markram K, Markram H (2010) The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front Hum Neurosci* 4:224.
- Modi ME, Sahin M (2017) Translational use of event-related potentials to assess circuit integrity in ASD. *Nat Rev Neurol* 13:160-170.
- Orefice LL, Zimmerman AL, Chirila AM, Sleboda SJ, Head JP, Ginty DD (2016) Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. *Cell* 166:299-313.
- Orefice LL, Mosko JR, Morency DT, Wells MF, Tasnim A, Mozeika SM, Ye M, Chirila AM, Emanuel AJ, Rankin G, Fame RM, Lehtinen MK, Feng G, Ginty DD (2019) Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. *Cell* 178:867-886 e824.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248-1251.
- Robertson CE, Baron-Cohen S (2017) Sensory perception in autism. *Nat Rev Neurosci* 18:671-684.
- Rozenkrantz L, Zachor D, Heller I, Plotkin A, Weissbrod A, Snitz K, Secundo L, Sobel N (2015) A Mechanistic Link between Olfaction and Autism Spectrum Disorder. *Curr Biol* 25:1904-1910.
- Runyan CA, Schummers J, Van Wart A, Kuhlman SJ, Wilson NR, Huang ZJ, Sur M (2010) Response features of parvalbumin-expressing interneurons suggest precise roles for subtypes of inhibition in visual cortex. *Neuron* 67:847-857.
- Sieben K, Bieler M, Roder B, Hanganu-Opatz IL (2015) Neonatal Restriction of Tactile Inputs Leads to Long-Lasting Impairments of Cross-Modal Processing. *PLoS Biol* 13:e1002304.
- Sohal VS, Rubenstein JLR (2019) Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 24:1248-1257.
- Soumiya H, Godai A, Arais H, Mori S, Furukawa S, Fukumitsu H (2016) Neonatal Whisker Trimming Impairs Fear/Anxiety-Related Emotional Systems of the Amygdala and Social Behaviors in Adult Mice. *PLoS One* 11:e0158583.
- Sousa VH, Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Fishell G (2009) Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1:i1-10.

- Swadlow HA (2003) Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cereb Cortex* 13:25-32.
- Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J (2017) Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience* 341:112-153.
- Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8:1727-1734.
- Tremblay ME, Riad M, Bouvier D, Murai KK, Pasquale EB, Descarries L, Doucet G (2007) Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 501:691-702.
- Wiggins LD, Robins DL, Bakeman R, Adamson LB (2009) Brief report: sensory abnormalities as distinguishing symptoms of autism spectrum disorders in young children. *J Autism Dev Disord* 39:1087-1091.
- Wu HP, Ioffe JC, Iverson MM, Boon JM, Dyck RH (2013) Novel, whisker-dependent texture discrimination task for mice. *Behav Brain Res* 237:238-242.

3.11. FIGURES

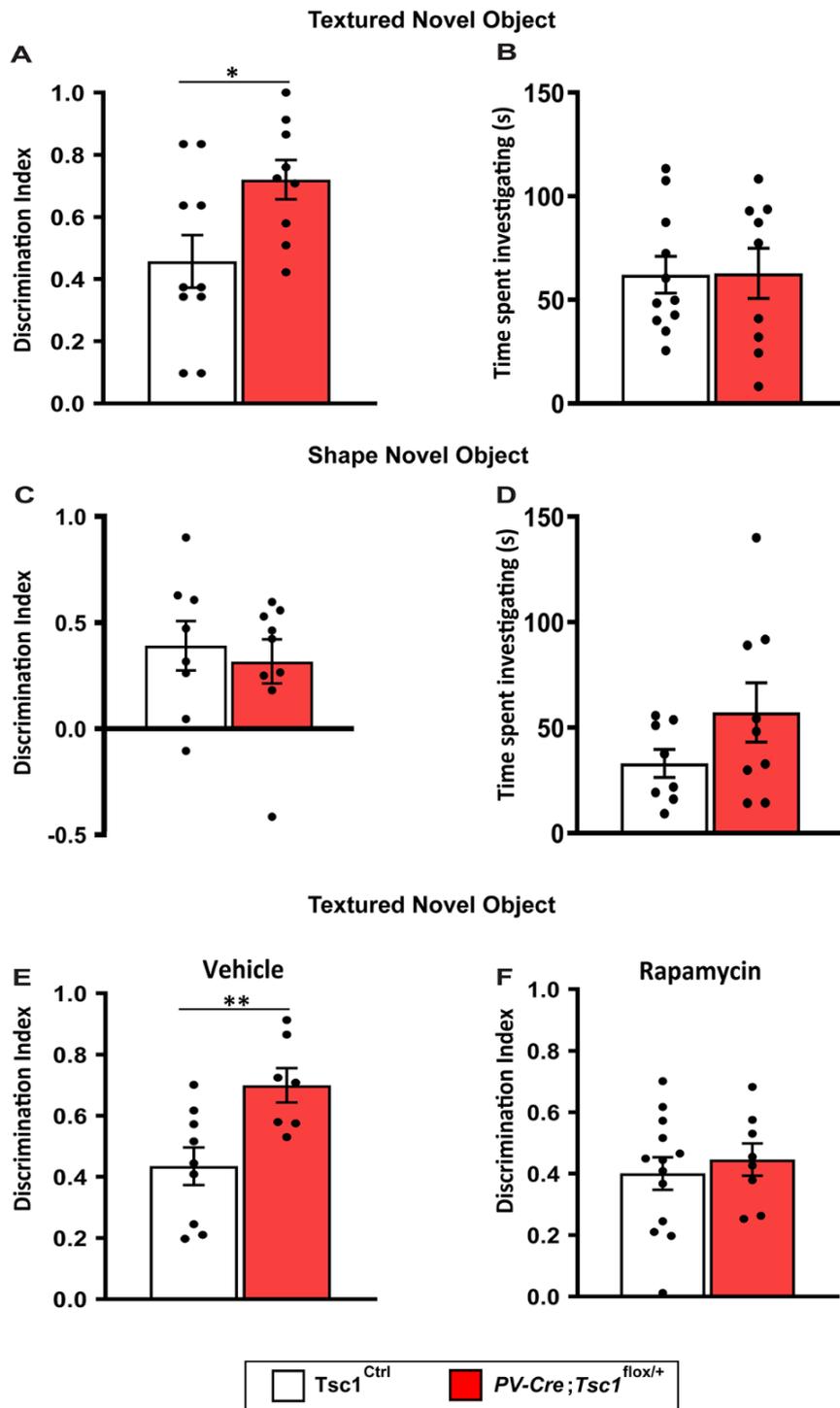


Figure 1: Adult mice with *TSCI* haploinsufficiency in PV cells show aberrant texture discrimination.

A, *PV-cre;TscI^{fllox/+}* mice show a higher preference for the textured novel object than *TscI^{Ctrl}* (Welch's t-test: * $p=0.0245$). **B**, Time spent investigating the objects is similar for both genotypes (Welch's t-test: $p=0.2101$). Number of mice: *TscI^{Ctrl}* $n=10$; *PV-Cre;TscI^{fllox/+}* $n=9$. **C**, Mutant and control mice show similar shape novel object discrimination index (Mann Whitney test: $p=0.6058$) and **D**, time spent investigating the objects (Welch's t-test: $p=0.1470$). Number of mice: *TscI^{Ctrl}* $n=8$; *PV-Cre;TscI^{fllox/+}* $n=9$. **E**, discrimination index of vehicle treated mice (Welch's t-test: ** $p=0.0068$). Number of mice: *TscI^{Ctrl}* $n=9$; *PV-Cre;TscI^{fllox/+}* $n=7$. **F**, Rapamycin treatment from p14-21 recues textured novel object discrimination alterations in *PV-Cre;TscI^{fllox/+}* mice (Welch's t-test: $p=0.5564$). Number of mice: *TscI^{Ctrl}* $n=13$; *PV-Cre;TscI^{fllox/+}* $n=8$. Bar graphs represent mean \pm SEM, dots represent single mouse data.

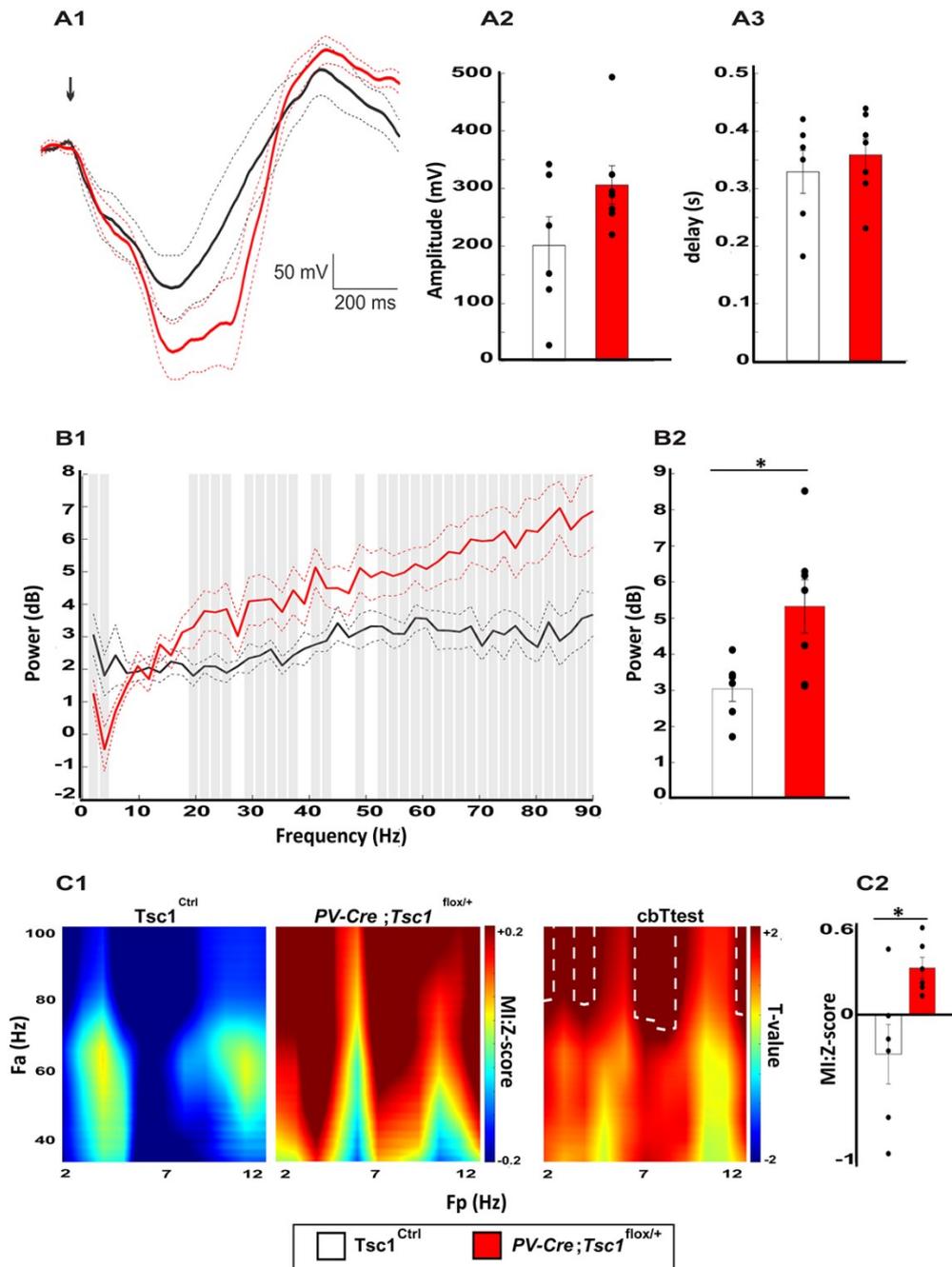


Figure 2: PV-specific *TSC1* knockdown induces alterations in evoked oscillatory activity following whisker stimulation without difference in ERP profiles.

A1-A3: Whisker ERP profile. **A1:** Superposed grand average traces. Black arrow represents the beginning of the stimulation. **A2-A3:** Bar plot shows N1 amplitude (**A1**, t-test; $t(11)=-1.2950$, $p=0.2218$) and delay (**A2**, t-test; $t(11)=-0.6471$, $p=0.5309$). **B1:** Baseline corrected Power Density Spectra. **B2-B3:** Bar plot shows evoked gamma, 30-100 Hz, (**B2**, t-test; $t(11)=-$

2.6553, *p=0.0224). **C1**: Phase-amplitude comodulograms and cluster-based statistics. Statistical differences (p<0.05) are marked by white dotted lines. **C2**, Bar plot shows z-score values corresponding to theta (7-8 Hz)/high gamma (70-95 Hz) PAC (t-test; t(11)=-2.7039, *p=0.0222). Number of mice: *Tsc1*^{Ctrl} n=6; *PV-Cre;Tsc1*^{lox/+} n=7. Bar and line graphs represent mean ± SEM. Dots represent single mouse data.

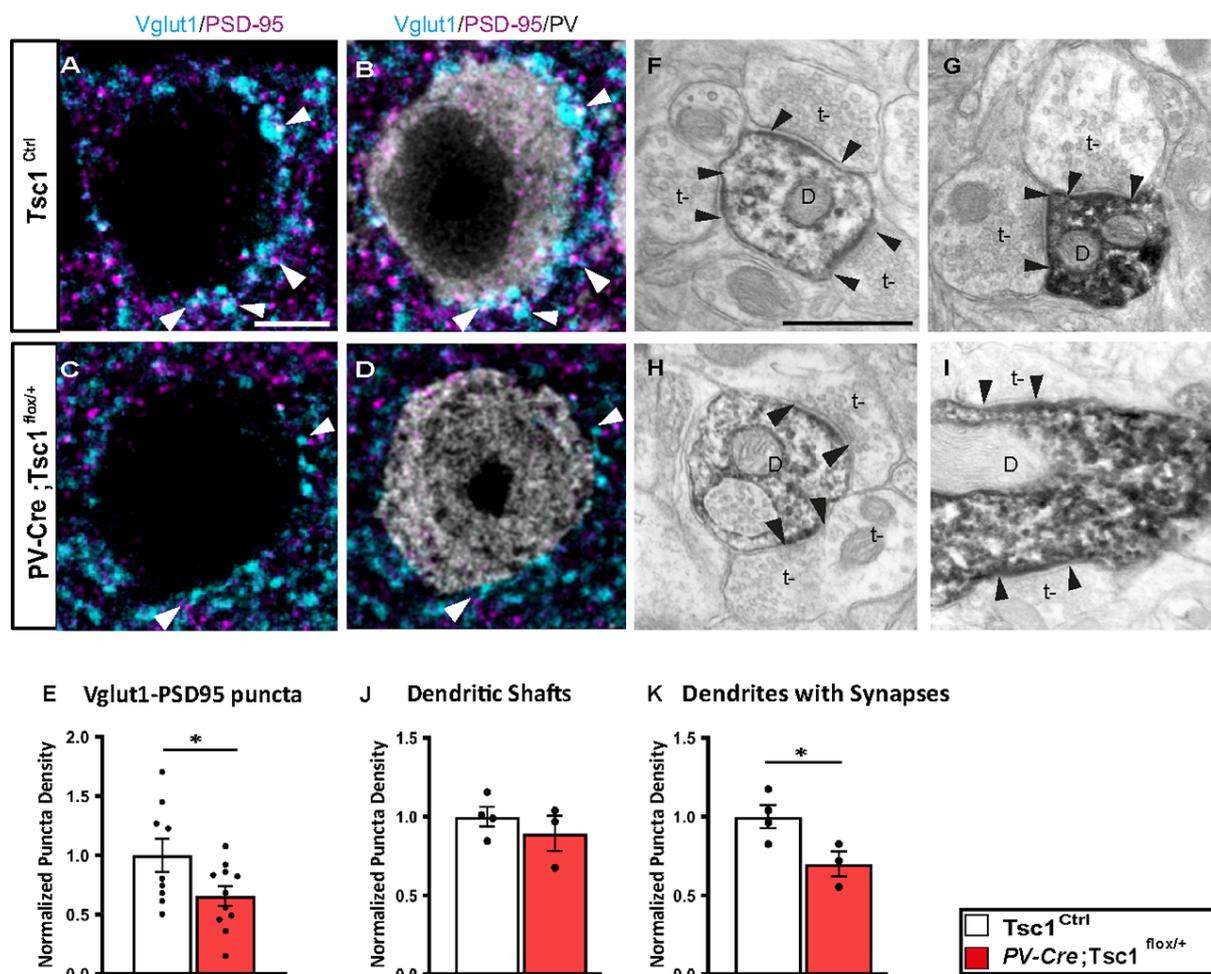


Figure 3: Adult mice with *Tsc1* haploinsufficient PV cells show reduced density of excitatory inputs.

A-D, Representative confocal images of somatosensory cortex coronal sections immunostained for Vglut1 (cyan), PSD-95 (magenta) and PV (gray) from P60 *Tsc1*^{Ctrl} (**A**, **B**) and *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+} (**C**, **D**) mice. White arrowheads indicate Vglut1/PSD-95 colocalized boutons. **E**, Vglut1/PSD-95 colocalized puncta onto PV cells somata are significantly decreased in *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+} mice (Unpaired t-test: * $p=0.0417$). Number of mice: $n=9$ for *Tsc1*^{Ctrl} and $n=11$ for *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+}. Scale bar: 5 μm . **F-I**, PV-immunolabeled dendritic branches in somatosensory cortex of *Tsc1*^{Ctrl} (**F**, **G**) and *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+} (**H**, **I**) at P60 showing multiple asymmetric synapses (arrowheads) between unlabeled axon terminal (t-) and a labeled

dendritic shaft (indicated with a D in the microphotographs). **J**, Overall, PV+ dendritic branch density is no different between the two genotypes (Welch's t-test, $p=0.4665$). **K**, Quantification of PV+ dendrites bearing synapses shows a significant decrease in *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* mice compared to control littermates (Welch's t-test, $*p=0.0422$). Arrowheads indicate presence of PSDs (post synaptic density) in the dendrites. Number of mice: *Tsc1^{Ctrl}*, $n=4$; *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}*, $n=3$. Scale bar, 500 nm. Bar graphs represent mean \pm SEM. Dots represent single mouse data.

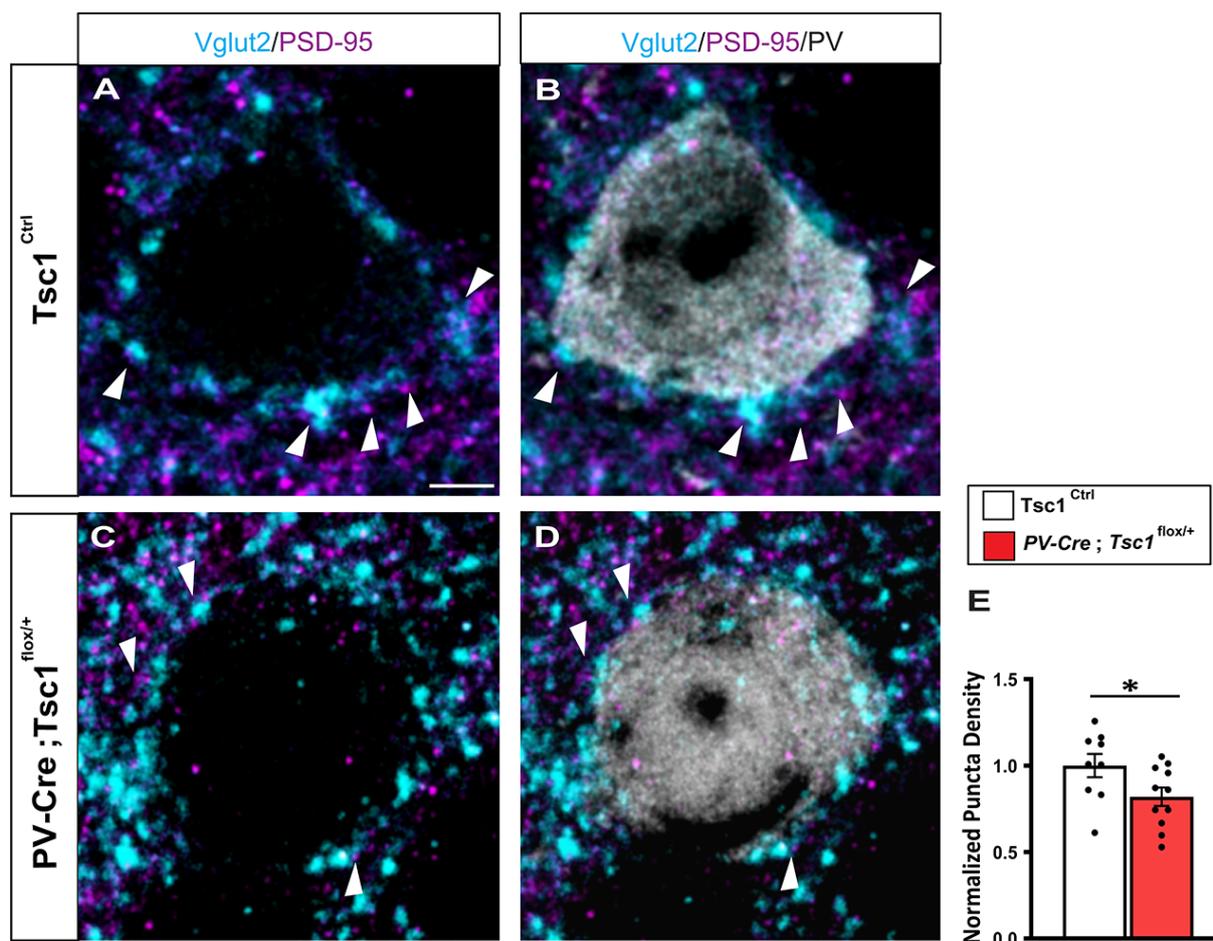


Figure 4: Adult mice with PV cell-specific *TSC1* haploinsufficiency show reduced density in thalamocortical inputs onto PV cell somata.

A-D, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut2 (cyan), PSD-95 (magenta) and PV (gray) in P60 *Tsc1^{Ctrl}* (A, B) and *PV-Cre; Tsc1^{flox/+}* mice (C, D). White arrowheads indicate Vglut2/PSD-95 colocalized puncta. Scale bar: 5 μ m. E, Quantification of Vglut2/PSD-95 colocalized puncta (Unpaired t test, * $p=0.0476$). Number of mice: $n=9$ for *Tsc1^{Ctrl}* and $n=11$ for *PV-Cre; Tsc1^{flox/+}*. Bar graphs represent mean \pm SEM. Dots represent single mouse data.

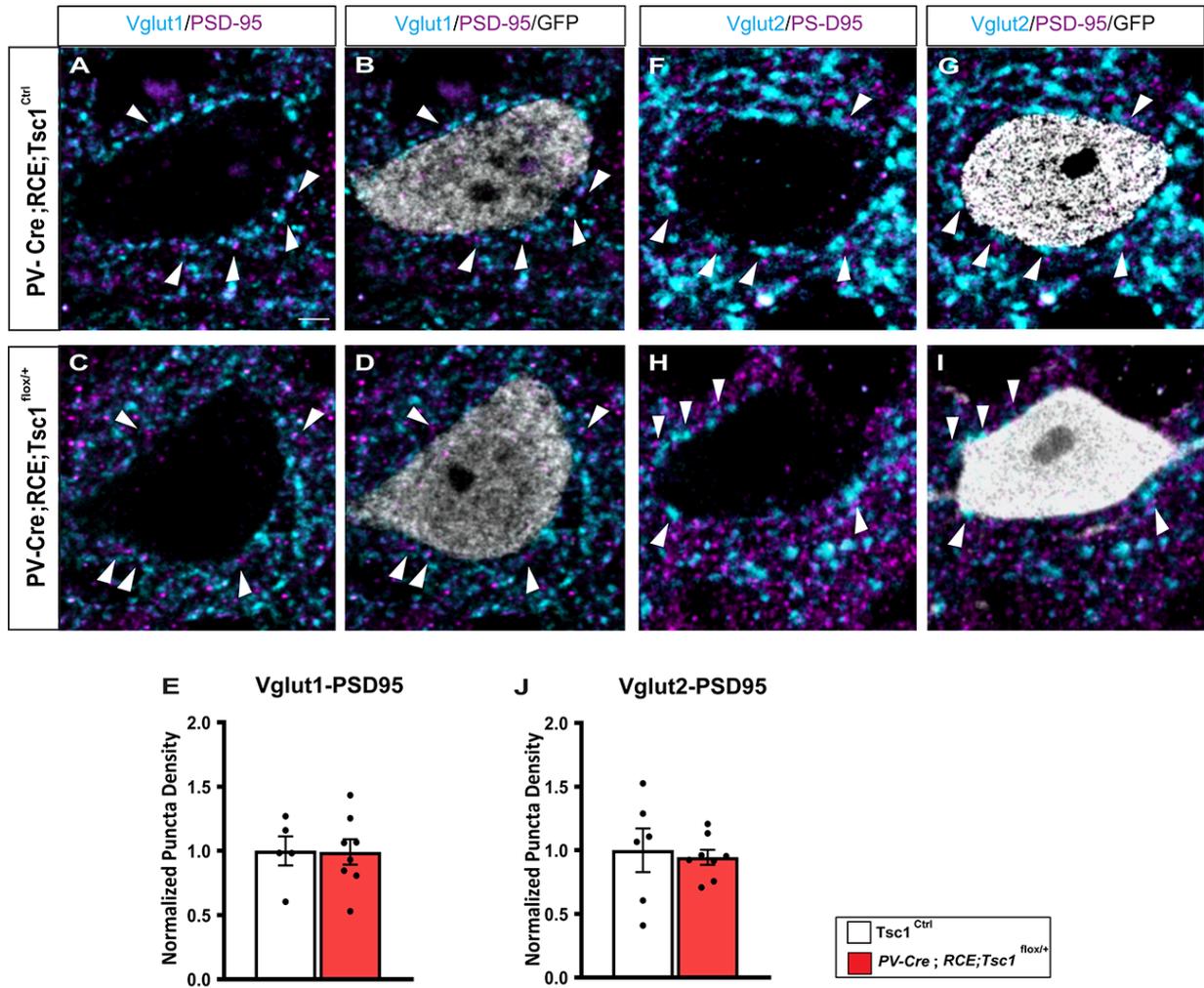


Figure 5: Thalamocortical and cortico-cortical inputs onto PV cell somata are not altered by *TSC1* haploinsufficiency in P21 mice.

A-D, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut1/PSD-95 (cyan/magenta) and GFP (gray) in P21 *Tsc1*^{Ctrl} (**A**, **B**) and *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+} (**C**, **D**) mice. **E**, Vglut1/PSD-95 colocalized puncta density is not different between the two genotypes (Welch's t test, $p=0.9543$). Number of mice: $n=5$ for *Tsc1*^{Ctrl} and $n=8$ for *PV-Cre;RCE;Tsc1*^{flox/+}. **F-I**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut2/PSD-95 (cyan/magenta) and GFP (gray) in P21 *Tsc1*^{Ctrl} (**F**, **G**) and *PV-Cre;Tsc1*^{flox/+} (**H**, **I**) mice. **J**, Vglut2/PSD-95 colocalized puncta density around PV cell somata

is not affected in *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* mice (Welch's t test, $p=0.7707$). Number of mice: $n=6$ for *Tsc1^{Ctrl}* and $n=8$ for *PV-Cre;RCE;Tsc1^{lox/+}*. Arrowheads indicate Vglut1/PSD-95 and Vglut2/PSD-95 colocalized boutons. Scale bar: 5 μm . Bar graphs represent mean \pm SEM. Dots represent single mouse data.

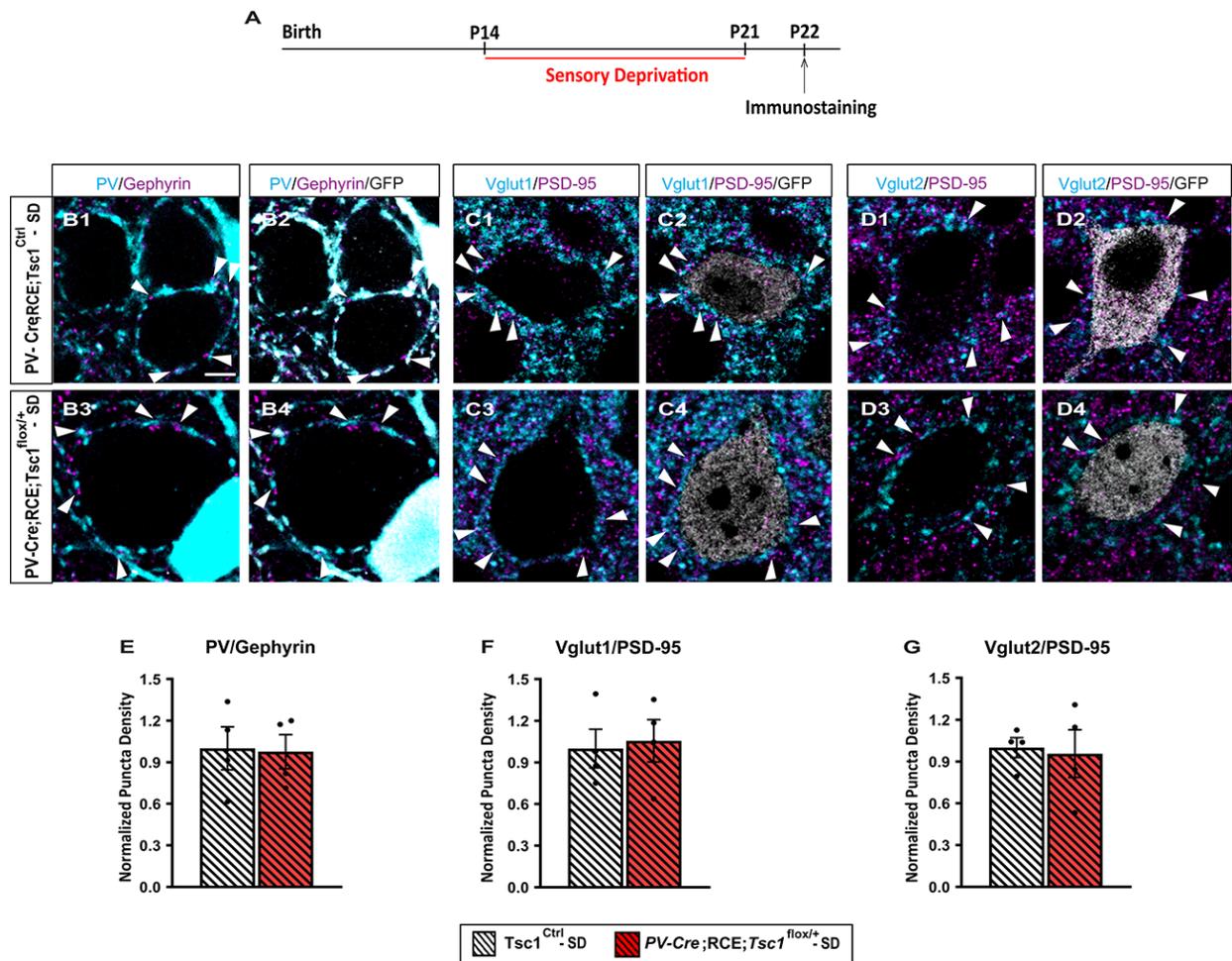


Figure 6: Sensory deprivation during a sensitive time window rescues PV cells perisomatic connectivity in young mutant mice.

A, Schematic for sensory privation paradigm. **B1-B4**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for PV (cyan), Gephyrin (magenta) and GFP (gray) in P22 *Tsc1^{Ctrl}* (**B1, B2**) and *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* (**B3, B4**) mice. **C1-C4**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut1 (cyan), PSD-95 (magenta) and GFP (gray) in P22 *Tsc1^{Ctrl}* (**C1, C2**) and *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* (**C3, C4**) mice. **D1-D4**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut2 (cyan), PSD-95 (magenta) and GFP (gray) in P22 *Tsc1^{Ctrl}* (**D1, D2**) and *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* (**D3, D4**) mice. Arrowheads show PV/Gephyrin, Vglut1/PSD-95 and Vglut2/PSD-95 colocalized boutons. **E**, PV/Gephyrin colocalized puncta (Mann Whitney test, $p > 0.0999$); Vglut1/PSD-95 colocalized puncta (Mann

Whitney test, $p=0.8857$); Vglut2/PSD-95 colocalized puncta (Mann Whitney test, $p=0.8857$).

Number of mice: $n=4$ for both genotypes. Scale bar: $5\ \mu\text{m}$. Bar graphs represent mean \pm SEM.

Dots represent single mouse data.

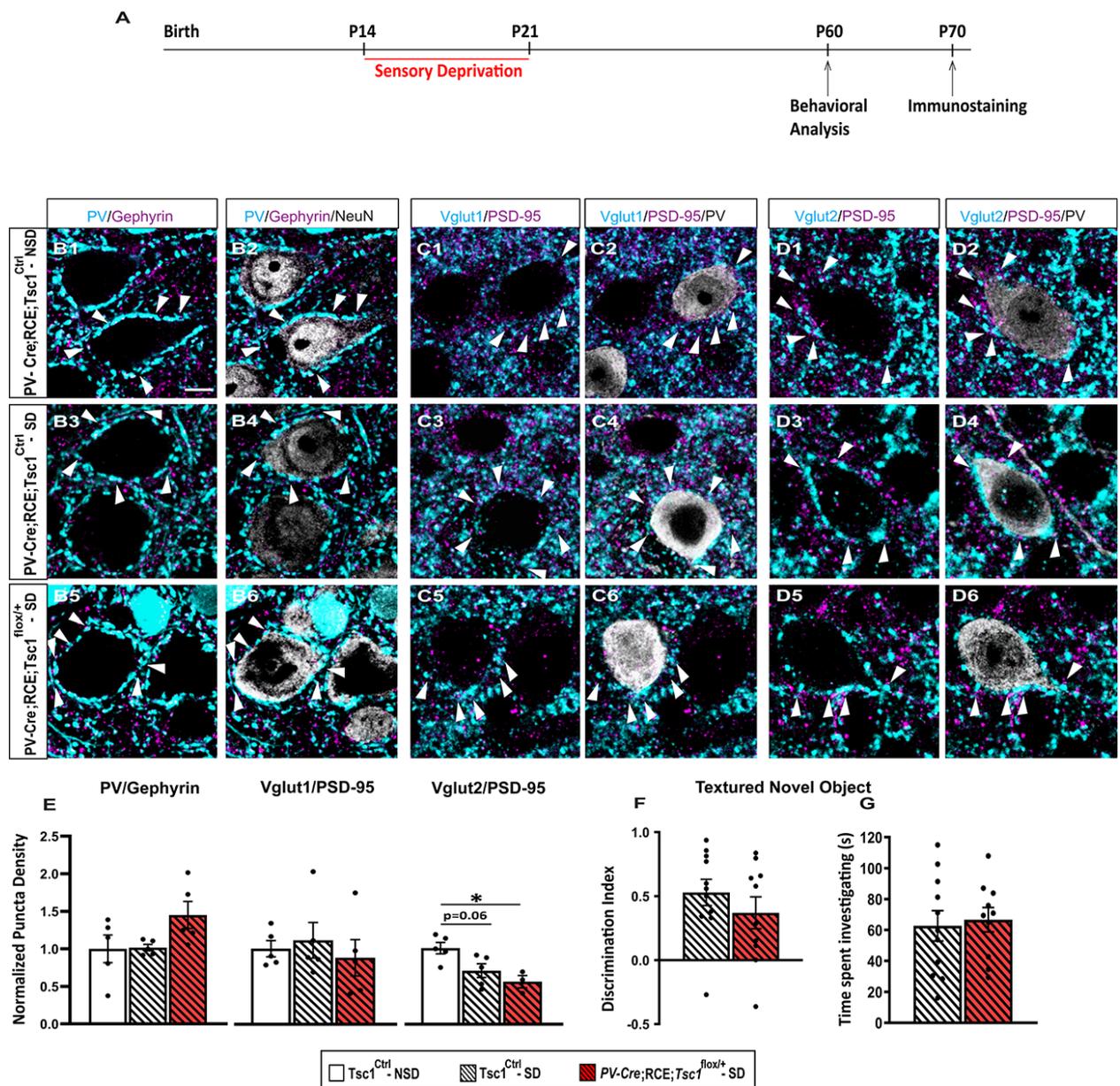


Figure 7: Sensory deprivation during a sensitive time window rescues PV cells perisomatic connectivity and textured novel object discrimination deficits in adult mutant mice.

A, Schematic for sensory deprivation paradigm. **B1-B6**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for PV (cyan), Gephyrin (magenta) and GFP (gray) in P70 $Tsc1^{Ctrl}$ non-deprived mice (NSD) (**B1**, **B2**), $Tsc1^{Ctrl}$ deprived mice (SD) (**B3**, **B4**) and $PV-$

Cre;Tsc1^{fllox/+} deprived mice (**B5, B6**). **C1-C6**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut1 (cyan), PSD-95 (magenta) and GFP (gray) in P70 *Tsc1^{Ctrl}* - NSD (**C1, C2**), *Tsc1^{Ctrl}* - SD (**C3, C4**) and *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD (**C5, C6**) mice. **D1-D6**, Representative immunostained sections of somatosensory cortex labeled for Vglut2 (cyan), PSD-95 (magenta) and GFP (gray) in P70 *Tsc1^{Ctrl}* - NSD (**D1, D2**), *Tsc1^{Ctrl}* -SD (**D3, D4**) and *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD (**D5, D6**) mice. Arrowheads show PV/Gephyrin, Vglut1/PSD-95 and Vglut2/PSD-95 colocalized boutons. **E**, PV/Gephyrin colocalized puncta (One-way ANOVA, $p=0.0955$; Tukey's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* - NSD vs *Tsc1^{Ctrl}* - SD $p=0.9970$; *Tsc1^{Ctrl}* - NSD vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD $p=0.1289$; *Tsc1^{Ctrl}* - SD vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD $p=0.1452$); Vglut1/PSD-95 colocalized puncta (One-way ANOVA, $p=0.7299$; Tukey's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* - NSD vs *Tsc1^{Ctrl}* - SD $p=0.9219$; *Tsc1^{Ctrl}* - NSD vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD $p=0.9087$; *Tsc1^{Ctrl}* - SD vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD $p=0.7078$); Number of mice: $n=5$ for both genotypes; Vglut2/PSD-95 colocalized puncta (One-way ANOVA, $p=0.0152$; Tukey's multiple comparisons: *Tsc1^{Ctrl}* - NSD vs *Tsc1^{Ctrl}* - SD $p=0.0605$; *Tsc1^{Ctrl}* - NSD vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD $*p=0.0175$; *Tsc1^{Ctrl}* - SD vs *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD $p=0.5297$). Number of mice: $n=5$ for *Tsc1^{Ctrl}* - NSD; $n=5$ for *Tsc1^{Ctrl}* -SD and $n=3$ for *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* - SD. Scale bar: 5 μm . **F**, Sensory deprivation from P14-21 rescues texture discrimination in adult mice (Welch's t test, $p=0.3363$). **G**, time spent investigating the objects (Welch's t-test: $p=0.7538$). Number of mice: $n=11$ for *Tsc1^{Ctrl}* and $n=10$ for *PV-Cre;RCE;Tsc1^{fllox/+}*. Bar graphs represent mean \pm SEM. Dots represent single mouse data.

Chapitre IV

Discussion générale

Les évidences scientifiques accumulées ces dernières années suggèrent que les maladies neurodéveloppementales à l'instar de l'autisme et les comorbidités associées telles que l'épilepsie auraient partiellement pour origines les changements dans les fonctions et la connectivité des interneurons GABAergiques, ce qui aboutit à un déséquilibre dans la balance excitation/inhibition (E/I) dans les circuits corticaux [197]. De leur naissance jusqu'à leur maturité, les interneurons GABAergiques acquièrent une combinaison de caractéristiques moléculaires, cellulaires et physiologiques. La plupart des études investiguant les mécanismes importants pour le développement des interneurons s'est concentrée sur le rôle des facteurs de transcription, ainsi la question relative à une implication des voies de signalisation cellulaires dans le développement de ces cellules demeure entière [80, 99, 100, 112, 198-200]. Alors que le rôle de la voie de signalisation mTORC1 et des gènes *TSC* ait été extensivement étudié dans les neurones excitateurs, la littérature concernant leur implication dans le développement et le fonctionnement des interneurons GABAergiques demeure pauvre [36, 63, 69]. Des études récentes ont souligné par exemple le rôle crucial de la signalisation de PTEN (un autre inhibiteur de la voie mTORC1, se trouvant en aval de TSC1) et aussi de l'activité neuronale des cellules pyramidales dans l'établissement du nombre adéquat de cellules SST et PV [201, 202]. Les cellules PV représentent la plus grande population d'interneurons corticaux et sont caractérisées par leurs capacités de décharge rapide ainsi qu'une connectivité péri-somatique. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle une signalisation mTORC1 aberrante dans la sclérose tubéreuse serait à l'origine des anomalies développementales et fonctionnelles des cellules PV.

C'est ainsi que dans le chapitre II, en utilisant des approches génétiques que ce soit en cultures organotypiques ou *in vivo*, nous avons investigué dans quelles mesures une haploinsuffisance ou un *knock-out* de *TSC1* restreint aux cellules PV affecterait le développement et la maintenance de ces dernières. De manière importante, nous prouvons que

l'absence de *TSCI* dans les cellules PV résulte en une hypo-connectivité chez les souris adultes. Le phénotype synaptique observé s'accompagne de comportements sociaux déficitaires. Les données présentées dans le chapitre III sont des arguments en faveur d'une implication des déficits sensoriels dans les troubles du spectre de l'autisme et le bon fonctionnement des cellules PV constitue un acteur majeur dans les comportements sociaux et sensoriels affectés dans les maladies neurodéveloppementales relatives au dysfonctionnement de la voie mTORC1-TSC1 [203, 204].

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui stipulent que la perte de TSC1 au cours du développement a un effet détriminaire sur la connectivité des synapses qui serait à la base des déficits comportementaux dans la sclérose tubéreuse [80, 205, 206].

4.1. Altérations de la connectivité des cellules PV dans la sclérose tubéreuse

La maturation de l'innervation des cellules PV est un long processus postnatal qui ne se stabilise que vers la fin du premier mois dans le cortex des rongeurs. En effet, il a été montré que 14 jours après la naissance (jour postnatal 14; P14), les boutons synaptiques péri-somatiques formés par ces cellules sont petits et mal organisés autour des somas des cellules pyramidales. De P18 à P24, on note une augmentation de la densité des terminaisons axonales aussi bien dans le neuropile qu'autour des somas des cellules pyramidales, quoique ces dernières restent tout autant désorganisées. Vers la fin de la 4^e semaine postnatale, les boutons présynaptiques continuent par se développer (en nombre et en taille) jusqu'à former des anneaux parfaits autour du corps cellulaire des cellules pyramidales [120].

Nos données montrent que la perte de *TSCI* dans les cellules PV induit premièrement une augmentation importante du nombre de boutons synaptiques formés par ces cellules à p18 suivi par une diminution drastique de la connectivité de leurs synapses chez les souris adultes. Ainsi, nous nous sommes demandé si la perte de la connectivité observée chez les adultes

mutants découlait de la formation précoce des boutons synaptiques pendant la phase initiale de développement ou au contraire, serait-on en présence de deux évènements distincts? En d'autres mots, la voie mTORC1-TSC1 remplit-elle le même rôle durant les différentes phases de croissances du développement postnatal des cellules PV? Nos données *in vitro* (cultures organotypiques) et *in vivo* révèlent que la perte drastique observée chez les adultes est le résultat du développement précoce des boutons synaptiques chez les souris jeunes et représente un processus qui passe effectivement par la voie mTOR. Nous avons pu confirmer ces résultats grâce à un traitement à la rapamycine entre P10 et P18. Le traitement pendant cette courte période était suffisant pour restaurer un développement normal des boutons synaptiques, à un niveau qui est comparable à celui des animaux contrôles.

Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle cette période de développement représentait une « **période critique** » durant laquelle la présence de *TSCI* est nécessaire pour le développement adéquat de la connectivité des cellules PV. En effet, lorsqu'en culture organotypique, nous avons introduit la mutation à EP26 (*equivalent postnatal date 26*), c'est-à-dire après le développement et la stabilisation des innervations PV, nous n'avons pas obtenu à l'âge adulte le phénotype d'hypo-connectivité. Ainsi, en l'absence de *TSCI*, le schéma de développement linéaire des innervations de PV décrit plus haut se complexifie énormément. Notamment, on assiste à une hyper-connectivité suivie par une hypo-connectivité. De ces observations, on pourrait alors se demander quels sont les mécanismes qui pourraient expliquer ce développement biphasique des innervations PV chez les mutants *TSCI*? Par ailleurs est-ce que ces innervations précoces représentent des synapses fonctionnelles? Cela, l'on l'ignore.

Dans notre étude, nous avons utilisé des marqueurs pré et post-synaptiques tels que la PV et la géphyrine pour identifier *in vivo* les connexions formées par les cellules PV sur les cellules pyramidales. La colocalisation de ces deux marqueurs nous a certes renseigné sur la présence de synapses mais dans le but de vérifier la fonctionnalité de ces dernières, nous

aurions pu procéder au marquage et à la quantification des boutons synaptiques avec la synaptotagmine 2. En effet la synaptotagmine 2 est un senseur calcique qui indique la présence de synapses matures et fonctionnelles, de plus, elle est exclusivement exprimée par les cellules PV [207]. D'un autre côté, la condensation des filets périneuronaux (PNNs), enrichis en protéoglycanes, autour du corps cellulaire des interneurons PV coïncide avec leur maturation [208]. L'étude des PNNs aurait pu alors nous renseigner sur l'état de maturation des cellules PV. Ainsi une condensation plus importante des PNNs autour des cellules PV mutantes comparativement aux cellules contrôles signifierait que la formation précoce des boutons est le reflet d'une maturation prématurée de toute la cellule. Tout cela étant dit, dans le but de répondre sans ambiguïté à notre questionnement, des enregistrements électrophysiologiques des divers courants (miniatures, spontanés ou évoqués à savoir les courants inhibiteurs postsynaptiques ainsi que les courants excitateurs postsynaptiques voire du « *paired recording* » pour évaluer l'état général du circuit) auraient été nécessaires.

Récemment, il a été montré qu'une délétion de *TSC1* spécifiquement dans les interneurons SST résulte en une altération des propriétés électrophysiologiques de ces dernières que ce soit dans les mutants conditionnels hétérozygotes et homozygotes. Plus particulièrement, on observe une réduction globale du nombre et de la force synaptique uniquement chez les homozygotes [80], ce qui suggère que la formation et le raffinement de la connectivité synaptique des cellules PV est de loin plus sensible à l'haploinsuffisance de *TSC1* que les cellules SST, même si ces deux populations d'interneurones possèdent la même origine anatomique. De nos investigations, il en ressort que nos souris hétérozygotes *PV-Cre;Tsc1^{lox/+}* et homozygotes *PV-Cre;Tsc1^{lox/lox}* se phénotypent, ce qui constitue un argument que les découvertes faites dans nos études sont applicables à la sclérose tubéreuse qui rappelons-le est une maladie autosomique dominante et dont les patients sont hétérozygotes pour le gène muté. Une autre étude, bien qu'utilisant le même modèle expérimental que nous n'a guère trouvé

aucun phénotype, notamment physiologique [66]. Les auteurs ont alors conclu que les divers symptômes neurologiques caractérisant la sclérose tubéreuse devraient être majoritairement alloués aux neurones pyramidaux excitateurs. Cette divergence pourrait néanmoins s'expliquer par le fait que les auteurs de cette étude ont effectué les expérimentations vers l'âge P28-P30, ce qui représente une fenêtre de temps située après la phase de formation précoce que nous avons observé à P18 mais aussi avant la phase de la perte synaptique que nous avons notée vers P34, cette perte synaptique ayant été validée par les données en microscopie électronique. Bien plus, nos données sont en accord avec celles d'une étude qui a montré grâce à l'optogénétique qu'une haploinsuffisance de *TSC1* résulte en une hyperactivation de la voie mTORC1 accompagnée d'une diminution de l'inhibition synaptique des cellules pyramidales [206].

4.2. Mécanismes moléculaires sous-jacents la perte synaptique

a. Autophagie

Indéniablement, les altérations du décours temporel de la connectivité des cellules PV résultent d'une synergie de plusieurs mécanismes cellulaires. La délétion de *TSC1* aboutit en une hyperactivation de mTORC1 et promeut ainsi la croissance cellulaire par l'intermédiaire de la synthèse protéique [12, 209]. En outre, la croissance cellulaire représente un processus qui est étroitement régulé par l'autophagie qui dépend de la capacité de la cellule à surveiller les niveaux de nutriments ou d'acides aminés ainsi que les niveaux d'ATP [28]. De plus, l'activation de mTORC1 affecte l'autophagie plaçant ainsi cette dernière au cœur du développement précoce de la connectivité des cellules PV observé chez les animaux *TSC1*-déficients. Par ailleurs, l'implication de l'autophagie dans la genèse des déficits comportementaux dans les maladies neurodéveloppementales et neuropsychiatriques a été largement investiguée ces dernières années. En réduisant l'autophagie dans les interneurons GABAergiques du néocortex, grâce à une délétion de l'*Atg7* (*autophagy-related protein 7*,

protéine essentielle à la dégradation cellulaire et à son recyclage), il a été montré que les animaux montraient des déficits comportementaux similaires aux animaux avec une délétion d'Atg7 dans les neurones excitateurs. Ainsi, l'autophagie, voie majeure en aval de la voie mTORC1 serait régulée dans les cellules inhibitrices tout comme excitatrices par les mêmes mécanismes [210]. D'un autre côté, il a été montré que les neurones *TSCI/2* déficients affichent une augmentation de l'activité autophagique, augmentation qui est dépendante de l'activation de l'AMPK. En effet, dans ces cellules, la perte de *TSCI/2* suivie de l'activation de mTORC1 entraîne une accumulation du marqueur de l'autophagie LC3-II (*autophagosomal lipidated microtubule-associated protein 1 light chain 2*) et du substrat p62 (*protein 62*). Par ailleurs, dans ces neurones, on note également une diminution de la phosphorylation d'ULK1 spécifiquement à la sérine 757 régulée par mTORC1 ainsi qu'une augmentation de l'activation d'AMPK et une phosphorylation AMPK-dépendante d'ULK1 à la sérine 555 [211].

Nous avons ainsi investigué le niveau d'expression des divers marqueurs de l'autophagie. Pour ce faire, nous avons généré une autre lignée de souris à savoir *Tg(NKx2.1-cre)/TSCI^{fllox}* afin d'inactiver *TSCI* dans les cellules PV dès l'âge embryonnaire. Mentionnons ici qu'il était nécessaire d'avoir cette lignée du fait que l'expression de PV soit postnatale, elle ne débute que vers P10 et n'atteint son pic d'expression qu'au cours de la 3^e semaine postnatale. Chez ces mutants conditionnels, l'on a observé une augmentation de la forme phosphorylée d'AMPK et du niveau d'expression de LC3-II ainsi qu'une tendance à l'augmentation de la phosphorylation d'ULK1. Nos résultats sont alors consistants avec l'étude de Di Nardo et collègues. NKx2.1 est un facteur de transcription exprimé vers l'âge embryonnaire E10.5 par les précurseurs des cellules GABAergiques dans l'EGM d'où proviennent les cellules PV et SST [212]. À cet égard, on peut se demander si les données obtenues en utilisant cette lignée sont applicables lorsque *TSCI* n'est absent que des cellules PV. Dans cette perspective, nous avons investigué le profil du développement des cellules PV chez les souris *Tg(NKx2.1-*

cre)/Tsc1^{lox} et avons trouvé que ces dernières phénotypent en tout point de vue les souris *PV-Cre;Tsc1^{lox}*. Ainsi, on peut conclure que les déficits de l'autophagie observés sont pertinents pour expliquer le développement biphasique des cellules PV. De plus, les déficits sont restreints à la période de développement précoce observée (P10-P18) suggérant qu'une autophagie défectueuse concomitante à la formation précoce des boutons synaptiques serait à la base de la perte synaptique observée chez les souris adultes.

Les cellules GABAergiques représentent une minorité de cellules corticales ce qui constituait un défi pour pouvoir détecter par Western Blot de petits changements dans les niveaux d'expression des protéines autophagiques. Pour y remédier, nous avons extrait les protéines du bulbe olfactif qui représente une région très riche en cellules GABAergiques. Néanmoins, nous nous sommes assurés au préalable que l'absence de TSC1 provoquait également une perte de synapses dans le bulbe olfactif des mutants adultes. Une autre façon de contourner ce défi aurait été le triage des cellules PV par le FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) [213]. Cela nous aurait permis d'extraire et d'étudier de manière plus ciblée les niveaux d'expression des protéines autophagiques spécifiquement dans les cellules PV du cortex.

Par ailleurs, les dysfonctionnements d'autophagie observés sur la base des niveaux d'expression de LC3-II, ULK1 et AMPK sont des processus intimement dépendants de l'activation de la voie AMPK. Il aurait été important d'investiguer l'efficacité de la rapamycine à réguler l'expression de ces protéines. En d'autres mots, la régulation de l'autophagie serait-elle suffisante pour renverser les déficits de la connectivité et sociaux observés dans nos mutants? Cette question mériterait qu'on s'y penche car cela permettrait d'établir l'autophagie en tant que processus moléculaire majeur sous-jacent les divers symptômes de la TSC. À cet égard, un traitement des animaux ou des tranches en cultures organotypiques avec la dorsomorphine (un inhibiteur de la voie AMPK) permettrait de déchiffrer l'implication de cette

voie et de l'autophagie dans le développement adéquat des cellules PV sous le contrôle de la voie mTORC1. De plus, AMPK joue un rôle crucial dans la régulation du recrutement des mitochondries ainsi que leur positionnement aux terminaisons pré-synaptiques [214].

Somme toute, l'autophagie constitue un processus de contrôle de qualité cellulaire et métabolique permettant la suppression des organelles endommagées et la récupération de l'énergie par le recyclage du matériel cytoplasmique pendant que les organelles à éliminer sont englouties dans des vésicules à double membrane dénommées les autophagosomes. *Ainsi, une autophagie compromise et l'accumulation des organelles défectueux à l'instar des mitochondries pourrait représenter une cause sous-jacente à la perte synaptique observée dans notre modèle d'étude* [28, 210, 215].

b. Les mitochondries

Dans les neurones, les mitochondries constituent un réseau réticulaire très dynamique subissant constamment des remodelages. Afin de subvenir aux besoins locaux en ATP et d'exercer leur rôle de tamponnage de calcium, les mitochondries sont transportées le long des microtubules [216]. Inversement, les mitochondries défectueuses ou dysfonctionnelles retournent dans le corps cellulaire pour être dégradées. Le maintien d'une population adéquate et fonctionnelle de mitochondries dans les neurones est très critique et implique un équilibre entre la biogenèse mitochondriale et leur renouvellement, ce phénomène est assuré par l'intermédiaire d'une dégradation autophagique effective de mitochondries âgées ou endommagées, un processus nommé "mitophagie". Les dysfonctionnements de la mitochondrie contribuent à une panoplie de maladies, autant neurodéveloppementales que neurodégénératives, faisant des mitochondries une cible potentielle dans les thérapies pharmacologiques [217]. Nombreuses sont les évidences d'après lesquelles les dysfonctionnements mitochondriaux seraient importants dans le spectre de l'autisme. Bien que

peu nombreuses, des études ont associé aussi des dysfonctionnements mitochondriaux aux syndromes génétiques du spectre autistique tels que, le syndrome d'Angelman, le syndrome de Rett et la sclérose tubéreuse [218-220]. Dans la sclérose tubéreuse, il a été montré par microscopie électronique (ME) une accumulation de mitochondries dans le corps cellulaire des neurones des animaux mutants, comparativement aux animaux contrôles. Par ailleurs, cette étude rapportait également une augmentation de la quantité d'ADN mitochondrial. D'après ces auteurs, cette augmentation de l'ADN mitochondrial observé pourrait découler d'une genèse excessive de mitochondries ou d'un défaut de dégradation des mitochondries endommagées [221].

D'un autre côté, le transport axonal est essentiel pour la fonction neuronale. Des régions localisées des neurones à l'instar des cônes de croissance et des synapses expérimentent de fortes demandes énergétiques. Ce besoin en ATP ne peut être comblé par une diffusion à partir du corps cellulaire mais doit être prise en charge localement dans les neurones. Les mitochondries, étant les organelles responsables de la production d'ATP et du tamponnage du calcium intracellulaire, sont activement transportées et positionnées dans le neurone afin de pourvoir aux besoins locaux de la cellule. Ainsi, dans les neurones de l'hippocampe en cultures, il a été montré que 20 à 30% de mitochondries étaient mobiles (il n'y a pas de différence entre leur transport antérograde ou rétrograde). Par contre, *in vivo*, seulement 10% des mitochondries seraient mobiles avec une préférence pour le transport antérograde [216]. Une autre étude récente, bien que concordant avec la précédente quant à l'accumulation de mitochondries dans le corps cellulaire des neurones des animaux TSC2-déficients ou même des neurones reprogrammés à partir des iPSCs (*inducible pluripotent stem cells*) provenant des patients avec la mutation infirme l'hypothèse d'une augmentation de la genèse mitochondriale en tant que telle. En revanche, les auteurs ont montré que dans les axones du corps calleux des animaux mutants, le transport rétrograde des mitochondries est renforcé, contribuant à une progressive

déplétion de mitochondries des axones, incluant des sites présynaptiques [220, 221]. Le transport rétrograde est requis dans l'homéostasie car il intervient dans la récupération de protéines et organelles âgées ou endommagées des axones distaux pour une dégradation ou recyclage dans le corps cellulaire [216]. En somme, toutes ces données corroborent l'idée d'un rôle d'une mitophagie défectueuse dans la sclérose tubéreuse amenant les auteurs à proposer le rétablissement de l'homéostasie des mitochondries comme cible thérapeutique dans cette pathologie.

Les études présentées ci-dessus ont investigué les déficits de la mitophagie ainsi que la perte de l'homéostasie des mitochondries dans les cellules excitatrices. Rares sont celles ayant soulevé l'hypothèse d'une implication mitochondriale dans les cellules inhibitrices en général et plus spécifiquement dans les cellules PV. Il a été montré que les cellules PV, afin de remplir leurs fonctions de cellules à décharge rapide utilisent bien plus d'énergie comparativement aux autres neurones du cortex, ce qui les rend hautement vulnérables aux stress métaboliques. Cette dépense énergétique est soutenue grâce à la génération d'ATP par les mitochondries. Subséquemment, les corps cellulaires, terminaisons présynaptiques ainsi que les dendrites des cellules PV sont extrêmement riches en mitochondries, ces dernières possèdent une grande taille et sont enrichies en cytochrome c qui constitue une protéine importante dans le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire des mitochondries [222-224].

À la lumière de tout ce qui a été dit dans cette section, l'homéostasie de la mitochondrie pourrait constituer un autre mécanisme sous-jacent la dualité observée dans le développement de la connectivité des cellules PV, surtout que la voie mTORC1 est importante pour la biogenèse des mitochondries. De plus, l'établissement des synapses est un processus énergivore. On pourrait imaginer le scénario d'après lequel pendant la phase initiale de développement, les cellules TSC1-déficientes produisent une quantité importante de mitochondries mais ces dernières seraient incapables de soutenir les besoins énergétiques aux

terminaisons présynaptiques à cause d'anomalies majeures dans leur transport, ce qui pourrait expliquer qu'à la longue ces synapses bien que formées finissent par être éliminées [216, 217].

c. Implication des microglies dans la sclérose tubéreuse

Les microglies sont des cellules du système immunitaire inné du SNC dont les fonctions ont été longtemps un mystère [225]. La majorité de nos connaissances sur la microglie a été acquise dans un contexte de maladie, en effet, elles ont été longtemps considérées comme les défenseurs du cerveau contre les dommages biologiques. Cela étant, dans le but de remplir leurs fonctions, elles passeraient de « latentes » à « activées » [226] . Au cours du développement du SNC, les synapses extra-numéraires sont sculptées par un processus d'élimination de synapses ou d'élagage [227-232]. Schafer et al. ont émis l'hypothèse selon laquelle les microglies constitueraient l'une des plus grandes médiatrices cellulaires de raffinement synaptique dans le cortex visuel. Ils ont ainsi montré que la microglie englobait les terminaisons présynaptiques des RGCs (*Retinal ganglion cells*) dans le LGN (*Lateral geniculate nucleus*) durant le pic d'élagage suivi d'une diminution de cet englobement vers P10 coïncidant avec l'acquisition des territoires spécifiques de chaque œil [232]. Une étude similaire, réalisée dans l'hippocampe, a permis de confirmer le mécanisme moléculaire par lequel la microglie contribuerait à l'élagage des synapses [231]. En somme, une régulation appropriée de la densité synaptique découlant d'un équilibre exquis entre la formation et l'élimination des synapses au cours du développement du cerveau est requise pour le fonctionnement adéquat du cerveau [233]. Ainsi, l'élagage des synapses, du moins excitatrices, par la microglie est nécessaire pour le développement normal du cerveau [231].

De récentes études ont fourni les arguments en faveur de l'implication de la microglie dans le développement des circuiteries inhibitrices dans le cerveau murin. Dans une étude élégante, Thion et al, ont montré qu'une activation immunitaire maternelle et des déficits

microgliaux pendant la grossesse a un impact dichotomique sur le câblage des synapses formées par les interneurons PV sur leurs cibles excitatrices. Dans ces modèles d'études, les adultes montraient une diminution de la force synaptique des cellules PV, inversement, les cellules PV des souris juvéniles montraient une augmentation de la force des connections unitaires ainsi qu'une inhibition horizontale aberrante [234]. Ce phénomène n'est pas sans rappeler le développement biphasique de la connectivité PV que nous avons décrit dans le chapitre II de cette thèse faisant de l'activité des microglies un mécanisme possiblement affecté dans notre modèle expérimental. Par ailleurs, des données transcriptomiques ont permis d'établir l'existence de diverses populations de microglies. En effet, il a été montré qu'une population spécifique de microglies, celle exprimant les GABA_BRs sont celles qui sont nécessaires à l'élagage des synapses inhibitrices. De fait, l'ablation de ces récepteurs GABA dans les microglies conduit à des dysfonctionnements dans l'élagage des synapses inhibitrices sans aucunement affecter les synapses excitatrices [235]. À la lumière de ces données, il serait alors intéressant d'investiguer l'activité de ces microglies spécialisées dans le modèle à l'étude dans cette thèse. D'un autre côté, outre le complément, diverses voies en aval de l'activation de la microglie ont été identifiées à l'instar de TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), phosphatidylsérine, SXR2 (*sushi repeat protein X-linked 2*), les unes étant protectrices (TREM2 et phosphatidylsérine) tandis que l'autre (SXR2) fait l'opposé [233, 236, 237]. Lequel de ces facteurs serait préférentiellement affecté par la voie mTORC1? Quoiqu'il en soit, il a été montré que l'autophagie microgliale est impliquée dans le raffinement synaptique. Ainsi, la perte de la protéine Atg7 spécifiquement dans les microglies conduit à des déficits dans l'élagage des épines dendritiques des neurones excitateurs ainsi que dans les comportements sociaux de ces animaux [238]. Cette étude a ainsi établi la relation entre l'autophagie qui est sous le contrôle de la voie mTORC1 et le bon fonctionnement de la microglie.

4.3. La sclérose tubéreuse : un trouble de période critique?

Les troubles du spectre de l'autisme à l'instar de la sclérose tubéreuse sont caractérisés par les déficits de la socialisation. Nous avons à cet égard évalué l'interaction sociale de notre modèle expérimental par l'intermédiaire du test à trois chambres qui permet de déterminer l'approche sociale ainsi que la préférence pour la nouveauté sociale. Contrairement aux animaux contrôles, les animaux mutants *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* et *PV-Cre;Tsc1^{fllox/fllox}* ne montraient aucune différence significative quant au temps d'interaction avec une souris comparativement à un objet dans l'approche sociale, par ailleurs, elles n'avaient pas de préférence entre la souris familière et la nouvelle souris. Ainsi, ces mutants avaient des déficits aussi bien dans l'approche sociale que dans la nouveauté sociale. Ce phénotype ne pourrait être alloué aux problèmes moteurs ni à de l'anxiété car nous n'avons détecté aucune différence dans leur activité motrice. Ainsi, l'absence partielle ou complète de *TSC1* dans les cellules PV provoque une altération de l'exploration sociale des animaux. Par la suite, afin de déterminer la pertinence de la période critique identifiée dans le chapitre II, nous avons traité les animaux mutants et contrôles avec la rapamycine (3 mg/Kg; i.p.) ou le véhicule de P14 à P21 avec le raisonnement que ce court traitement serait suffisant pour renverser les phénotypes de connectivité et comportementaux identifiés. En effet, nous avons trouvé que le traitement à la rapamycine restreint à cette période de développement spécifique restaure totalement la connectivité défectueuse des hétérozygotes et homozygotes adultes. Quant aux déficits du comportement social, ils sont entièrement renversés par ce court traitement dans les hétérozygotes alors qu'étonnamment le phénotype social des homozygotes demeure in affecté par la rapamycine. Ce phénomène semble singulier quand l'on considère que les déficits de connectivité et sociaux sont similaires chez les animaux hétérozygotes et homozygotes.

Des études récentes ont suggéré le rôle déterminant du cervelet dans la symptomatique de l'autisme [173]. Par ailleurs, les cellules de Purkinje et les cellules granuleuses du cervelet

expriment également la PV. À cet effet, une délétion de *Tsc1* spécifiquement dans les cellules de Purkinje résultent en des anomalies dans les interactions sociales chez ces animaux. Également, ces phénotypes sociaux pouvaient être renversés par un traitement à la rapamycine continu initié soit à P7 ou à 6 semaines postnatales [79, 177]. Tandis qu'aucune anomalie du cervelet n'ait été détecté chez les souris *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}*, l'anatomie cérébelleuse des souris *PV-Cre;Tsc1^{flox/flox}* était grandement affectée, de plus cette anomalie morphologique n'était pas corrigée par la rapamycine, ce qui pourrait être la base de la persistance des déficits sociaux chez ces derniers. Il est tout à fait possible que la période critique pour améliorer les phénotypes cérébelleux soit différente de celle décrite dans notre étude.

Il a été démontré que les diverses périodes critiques région-dépendante sont régulées par la balance E/I dans le cerveau au cours du développement [239, 240]. Les études dans le système visuel des rongeurs ont montré que particulièrement le niveau du neurotransmetteur GABA et la maturation de la circuiterie PV sont cruciaux dans l'ouverture et la fermeture appropriées des périodes critiques [240, 241]. Du fait que les périodes critiques soient si étroitement régulées, elles deviennent alors vulnérables lorsque l'équilibre E/I est perdue [242].

Des études cliniques investiguant l'effet de l'éverolimus (un dérivé de la rapamycine) sur le phénotype TSC a rapporté que les patients traités présentaient une réduction de la taille des SEGAs ainsi qu'une réduction de la fréquence des crises épileptiques [91, 92]. Toutefois, ses effets sur l'amélioration de la cognition et du comportement autistique chez les patients TSC demeurent mitigés car les études s'étant penchées sur le sujet rapportent des résultats très hétérogènes [243-247]. La caractéristique de ces études est l'exclusion des enfants de moins de 4 ans. Pourtant, il a été rapporté que dans l'autisme mais aussi dans des cas de négligence extrême ou d'isolation, une thérapie comportementale intense s'avère bénéfique lorsqu'administrée aussi tôt que possible. Afin de prendre avantage de cette fenêtre d'opportunité, une intervention comportementale chez des jeunes patients de 2 à 3 ans a été

suggérée [248]. Nos données suggèrent aussi qu'un traitement initié à un jeune âge serait critique pour l'amélioration de certains aspects cognitifs et comportementaux sur le long terme. Par ailleurs, la dissection de mécanismes moléculaires et cellulaires à la base des périodes critiques représenterait un atout majeur dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de restaurer le fonctionnement et la plasticité normaux dans les circuits neuronaux affectés [242].

4.4. Les anomalies du traitement sensoriel tactile dans la sclérose tubéreuse

Au-delà des déficits cognitifs et comportementaux, les maladies du spectre de l'autisme sont également caractérisées par des déficits du traitement sensoriel. En effet, ces déficits sont retrouvés de manière ubiquitaire dans toutes les maladies neurodéveloppementales et jouent un rôle central dans la genèse des déficits comportementaux et cognitifs qui y sont associés [249, 250]. Pourtant, les études mécanistiques dans les modèles animaux de l'autisme se sont traditionnellement intéressées aux circuits et synapses localisés dans les régions du cerveau relatives aux fonctions cognitives [251] tandis que peu d'emphase a été mise sur les mécanismes contribuant aux déficits du traitement sensoriel, particulièrement dans les circuits corticaux primaires dont la fonction est d'intégrer l'information sensorielle ascendante des aires corticales supérieures. Par ailleurs, la cognition requiert l'intégration des signaux provenant de l'environnement externe par l'intermédiaire des aires sensorielles primaires qui permettent le décodage des stimuli externes afin de faciliter la construction interne des représentations du monde extérieur [252]. De façon frappante, il a été rapporté qu'environ 95% des patients souffrant de l'autisme présentent une réactivité aberrante aux stimuli sensoriels incluant les stimuli tactiles. De fait, de ce nombre, 60.9% présentent une sensibilité tactile altérée couplée à une sensibilité accrue aux vibrations et à la douleur thermique [253-255]. D'ailleurs, une partie de la littérature sur le sujet révèle que les réactions anormales au toucher

sont hautement corrélées avec la sévérité des symptômes de l'autisme. Les enfants souffrant de l'autisme présentent habituellement une grande sensibilité aux touches légers comparativement aux enfants avec d'autres maladies développementales [256]. Ainsi, l'évitement du toucher pendant l'enfance constitue à présent un outil de prédiction de déficits dans le développement social et a été intégré dans le diagnostic de l'autisme chez de jeunes enfants [257]. À cet effet, il est alors surprenant de constater que bien que la sensibilité tactile soit communément présente dans l'autisme, elle a reçu moins d'attention que la sensibilité auditive par exemple [258]. Quel rôle joue l'axe mTOR-TSC1 dans le développement du phénotype sensoriel? Sachant que les souris hétérozygotes conditionnelles *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* présentent des déficits sociaux, caractéristiques de l'autisme, nous avons soumis les souris au test de discrimination de texture afin d'évaluer leur sensibilité tactile [259]. Les souris *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* tout autant que les contrôles montraient une préférence pour le nouvel objet qui différait de l'objet familier uniquement de par leur texture. Toutefois, les *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* interagissaient plus longuement avec le nouvel objet comparativement aux contrôles. Ce phénotype n'étant pas dû à un déficit de mémoire, l'absence de TSC1 dans les cellules PV aboutit alors à une hypersensibilité tactile chez ces animaux.

Récemment, l'étude de divers modèles de l'autisme tels que *MeCP2*, *Shank3B*, *Fmr1* [194, 195], *Syngap1* (*Synaptic Ras-GTPase activating protein 1*) [252] a montré que dans ces modèles, contrairement à ce que nous avons trouvé, ces souris présentaient une hyposensibilité. Cette divergence pourrait s'expliquer par plusieurs raisons : 1-les gènes mutés dans ces différents modèles affectent de manière non uniforme les circuits sensoriels conduisant ultimement à un phénotype sensoriel divergent, 2 - il existe une relation plus complexe entre la voie mTOR-TSC1 et les cellules PV comparativement aux cellules glutamatergiques. Rappelons ici que nous travaillons avec des mutants conditionnels alors que les études précitées avaient des modèles porteurs d'une mutation germinale. Il serait intéressant d'investiguer sur

la sensibilité tactile d'un modèle de mutation germinale de *TSC1*. La comparaison de ces deux lignées permettrait de faire la part quant à la contribution des cellules PV dans le phénotype et celle du gène *TSC1* en soi. Mais aussi, dans leur étude, Orefice et al., voulant évaluer l'implication du SNP dans les déficits tactiles ont procédé à une privation sensorielle par l'intermédiaire de la coupe de moustaches des animaux 3 jours avant le test dans le but de les obliger à interagir avec les objets avec la peau et les pattes qui constituent les premiers éléments du SNP. Ce qui rend la comparaison avec ces modèles un peu compliquée.

Afin de confirmer le phénotype d'hypersensibilité dans notre modèle d'étude, il serait judicieux de soumettre les animaux à d'autres tests à l'instar du test de la plaque chauffante pour évaluer leur sensibilité thermique ou le test de l'inhibition de pré-impulsion qui permettrait de déterminer des déficits plausibles d'habituation, ce qui expliquerait que les hétérozygotes retournent tout le temps explorer l'objet avec la nouvelle texture.

Quoiqu'il en soit, les mécanismes par lesquels les déficits du traitement sensoriel contribueraient aux phénotypes comportementaux communs à l'autisme ne commencent qu'à être graduellement élucidés.

4.5. Mécanismes se trouvant en arrière du déficit sensoriel dans la sclérose tubéreuse.

Comparativement à la recherche portant sur les symptômes de base de l'autisme, très peu de travaux se sont intéressés à la compréhension des mécanismes en arrière des anomalies du système sensoriel tactile identifiées dans la pathologie. Pourtant, ces anomalies pourraient jouer un rôle majeur dans la genèse même de ces symptômes de base [193]. Les quelques données disponibles reflètent l'hétérogénéité des circuits du cerveau.

Chez les souris hétérozygotes *Syngap1* caractérisées par une hyposensibilité tactile, il a été rapporté une diminution de l'activité des neurones dans les couches supérieures (couches 2/3)

du cortex somato-sensoriel, diminution découlant de la combinaison d'une réduction de l'excitabilité intrinsèque couplée à la réduction de la connectivité synaptique des neurones localisés dans cette région. Étonnamment, ces résultats ne s'appliquent pas aux autres couches du cortex poussant les auteurs à conclure que l'hétérozygotie de *Syngap1* a des effets régions-dépendantes. De plus, une restriction de la mutation aux cellules glutamatergiques du cerveau antérieur (souris *Emx1-Syngap1*) aboutissait à un phénotype similaire à celui décrit plus haut amenant les auteurs de cette étude à affirmer que des dysfonctionnements dans les circuits corticaux seraient la cause primaire des déficits tactiles identifiés dans ce modèle d'étude plutôt qu'une conséquence de dysfonctionnements sensoriels d'autres circuits tels que les neurones mécanorécepteurs ou les relais thalamiques [252]. La conclusion de cette étude, sans doute pertinente dans le cadre de la mutation de *Syngap1*, est toutefois étonnante surtout lorsqu'on sait que toutes les modalités sensorielles exceptée l'olfaction sont prises en charge par le thalamus. En effet, le thalamus transmet les signaux sensoriels ascendants au cortex et joue également un rôle majeur dans la maturation des colonnes corticales et des cartes sensorielles au travers des vagues spontanées d'activité au cours du développement [260]. Ainsi, la couche 4 du cortex constitue le premier site de réception de la connectivité thalamique et est à cet effet considéré comme la première station de traitement de l'information sensorielle dans la hiérarchie laminaire. Aussi, une autre particularité des neurones thalamiques est qu'ils expriment sélectivement le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Vglut2)[261].

Ceci étant, nous nous sommes demandé si l'hypersensibilité des souris *PV-Cre;Tsc1^{fllox/+}* pourrait découler de dysfonctionnements dans les projections thalamocorticales, sachant aussi qu'il a été précédemment démontré qu'une délétion de *TSC1* affectait la formation des synapses glutamatergiques. En accord avec le rôle prépondérant que joue la voie mTOR-TSC1 dans la formation des synapses glutamatergiques, nous avons trouvé que les synapses intra-corticales marquées par le transporteur vésiculaire du glutamate de type 1

(Vglut1) ainsi que celles d'origine thalamique reconnaissables par le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Vglut2) de nos mutants comparativement aux contrôles ne montraient pas de déficits à P21 mais plutôt à P60. Ainsi, l'haploinsuffisance de *TSCI* dans les cellules PV affecte de manière similaire les synapses excitatrices formées sur le corps cellulaire de ces dernières. Soulignons que la quantification de ces synapses s'est faite autour des corps cellulaires de cellules PV, qui on le sait, ne sont pas les structures de prédilection des synapses excitatrices. Il nous aurait fallu marquer les dendrites de ces cellules à l'aide de l'anticorps contre MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*) et y quantifier ces synapses excitatrices, qu'elles soient d'origine thalamique ou corticale. Néanmoins, un argument en notre faveur est que nous avons procédé à la quantification des cellules excitatrices sur les dendrites des cellules PV à P60 par la microscopie électronique dans la couche 5 du cortex somato-sensoriel et avons trouvé des résultats similaires à ceux obtenus avec Vglut1. Identifier la contribution spécifique de ces dysfonctionnements synaptiques constituerait un atout dans la compréhension des mécanismes sous-tendant l'hypersensibilité décrite dans la section précédente.

En outre, des études récentes ont amené le milieu scientifique à définir également l'autisme comme une pathologie du SNP. En effet, Orefice et al. ont montré un dysfonctionnement des neurones mécanosensoriels périphériques et de leurs connections dans la moelle épinière dans divers modèles d'autisme tels que MeCP2, Shank3, Fmr1, dysfonctionnement qui résulterait d'une perte de l'inhibition présynaptique dépendante de GABA_ARs (Orefice et al, 2016). Dans le but de consolider l'étiologie SNP de l'autisme, ces mêmes auteurs ont par la suite montré qu'une mutation restreinte des gènes précités aux neurones sensoriels périphériques aboutissait aux déficits comportementaux caractéristiques de la pathologie établissant la contribution majeure des neurones périphériques dans la genèse des symptômes. Étonnamment, ces mutations restreintes à la périphérie affectaient les cellules PV du cortex somatosensoriel et de l'amygdale (Orefice et al, 2019). Somme toute, les déficits

sensoriels dans l'autisme sont à l'image de la complexité des relations entre les circuits neuronaux.

4.6. Le niveau d'activité des cellules PV : élément central du phénotype des souris *PV-Cre;Tsc1^{lox}*?

De façon similaire aux autres neurones du SNC, un surplus d'interneurones GABAergiques est engendré au cours du développement. En effet, chez les souris, il a été rapporté la génération d'un surplus d'environ 30% d'interneurones, qui par la suite sont éliminés grâce à une mort cellulaire programmée entre la fin de la première semaine postnatale et le début de la deuxième. Dans le but d'élucider les mécanismes contrôlant cette mort cellulaire, il a été suggéré une implication de l'activité des cellules pyramidales dans le réseau neuronal. Cette hypothèse a été confirmée en augmentant ou diminuant l'excitabilité des cellules pyramidales durant la période d'apoptose par l'intermédiaire des DREADDs (*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*). Ainsi, l'augmentation ou la diminution de l'activité de ces cellules aboutit respectivement à un accroissement ou réduction de la survie des interneurones corticaux [100]. Au-delà de l'importance de l'activité dans la survie des interneurones, il a été également montré que le développement des circuits neuronaux nécessite une régulation précise et activité-dépendante de la croissance axonale, de l'établissement de leurs connectivités et de la formation des synapses [262, 263]. En tant que médiateurs clés de l'activité neuronale, les neurotransmetteurs sont appropriés pour sculpter les connectivités neuronales. Leur relâche permet de coupler, avec une précision spatio-temporelle la transmission à la morphogenèse et au raffinement des synapses. Eu égard à cela, le rôle de la signalisation GABA a été investigué dans la formation et la maturation des synapses formées par les cellules GABAergiques. Cette étude a révélé qu'en l'absence de GAD67 qui est le précurseur majeur de GABA, on assiste à un déficit de la maturation des synapses

périsomatiques établies par les cellules PV dans le cortex visuel de ces animaux. Inversement, une augmentation de son expression accélère la maturation de ces synapses. Vu que les niveaux d'expression intracellulaires de GABA et de GAD67 sont régulés par l'activité neuronale, ces données suggèrent alors que la synthèse de GABA dépendante de l'expression de GAD67 est un mécanisme activité-dépendant nécessaire à la sculpture de l'innervation inhibitrice [124]. Une autre étude se basant sur une approche différente, à savoir une réduction de l'excitabilité des cellules PV ou suppression complète de la relâche du neurotransmetteur par les cellules PV, a rapporté qu'alors que la diminution de l'excitabilité par l'allostatine n'affecte pas la maturation des synapses formées par ces cellules, la suppression de la relâche de neurotransmetteur par le TeNT-Lc (*Tetanus Neurotoxin Type-Light chain*) conduit dans un premier temps à une hyper-connectivité de ces synapses pendant la phase initiale de leur formation suivie par une hypo-connectivité vers l'âge adulte [18].

Ce phénotype n'est pas sans rappeler celui que nous avons décrit dans nos travaux. En effet, nos données montrent qu'une délétion spécifique de *TSCI* dans les cellules PV conduit à un développement biphasique de leur connectivité (une hyper-connectivité chez les jeunes souris suivie par une hypo-connectivité chez les adultes). La similarité de ces deux phénotypes suggère que l'activité neuronale dans les cellules PV pourrait représenter le nœud du problème. Une façon de vérifier cette hypothèse dans le futur serait de déterminer le niveau d'activité des cellules PV dans les animaux contrôles comparativement aux mutants. À cet effet, l'on pourrait se servir de la quantification de l'expression de c-Fos dans les cellules PV de ces animaux. Il a été montré que le niveau d'expression de c-Fos à la suite d'une stimulation périphérique représente un marqueur fiable de l'activité neuronale [264]. Logiquement, on pourrait s'attendre à ce que les cellules PV *TSCI*-déficientes aient une faible expression de c-Fos comparativement aux contrôles, ce qui suggérerait une implication de l'activité neuronale dans les déficits de connectivité décrits dans cette thèse.

Aussi, l'activité neuronale est sous le contrôle des informations sensorielles que le cerveau reçoit. Il a été montré qu'une privation sensorielle (provoquée par la coupe des moustaches entre P1 et P10) entraînait une plus grande expression de c-Fos dans certaines régions du cerveau chez les souris sensoriellement privées [265]. D'un autre côté, la privation sensorielle affecte plus sévèrement les interneurons inhibiteurs que les neurones excitateurs [266]. La privation sensorielle serait donc un bon outil pour restaurer un niveau basal d'activité. Nous avons alors soumis les souris *PV-Cre;Tsc1^{flox/+}* tout comme les contrôles à une privation sensorielle restreinte à la période critique de développement identifiée dans notre étude et avons trouvé que cette courte privation sensorielle était suffisante pour renverser le phénotype d'hypersensibilité observé chez les hétérozygotes adultes. De plus, le phénotype d'hyperconnectivité et d'hypo-connectivité a été également renversé respectivement chez les souris pré-adolescentes et les adultes. Ces données constituent un argument en faveur de l'activité neuronale comme le point central des symptômes de la sclérose tubéreuse. Étonnamment, chez les souris contrôles privées sensoriellement, on assiste à une tendance vers une hypersensibilité tactile. D'autres expériences seront nécessaires pour déterminer l'impact de la privation sensorielle sur les circuits normaux. Ceci suggère qu'à tout moment dans le cerveau, un équilibre exquis du niveau d'activité doit être gardé.

D'un autre côté, l'activité neuronale entraîne de rapides changements d'expression du calcium interne [267, 268]. Ainsi, une autre façon plus efficace de mesurer le niveau d'activité dans les cellules PV serait de transférer le cortex somatosensoriel des animaux avec des vecteurs viraux calciques tel que l'adénovirus-GCaMP6 Cre-dépendant et mesurer les événements calciques somatiques dans des souris éveillées (l'anesthésie perturbant l'activité neuronale) grâce à la microscopie par excitation à deux-photons [252, 269]. L'on pourrait s'attendre à ce que les cellules PV des animaux mutants présentent un plus faible niveau d'activité ainsi que peu d'événements calciques comparativement aux contrôles.

Ultimement, on pourrait directement activer la cellules PV avec des DREADDs (un adénovirus Cre-dépendant pour une activation sélective dans les cellules PV) pendant l'exploration tactile des animaux. L'activation spécifique des cellules PV pourrait aboutir à une récupération du phénotype [270].

ChapitreV

Conclusions

Les données obtenues au cours de nos cinq années d'investigation permettent d'élucider le rôle dichotomique de la voie TSC1-mTOR dans le développement postnatal des synapses inhibitrices formées par les cellules PV mais aussi des synapses excitatrices qui les innervent. Ainsi, l'absence de *Tsc1* entraîne une hyperactivation de la voie mTOR, ce qui résulte dans un premier temps en un développement précoce des synapses inhibitrices suivi par la perte drastique de ces dernières. De plus, dans les synapses excitatrices formées autour de ces cellules *Tsc1*-déficientes, le rôle de la voie TSC1-mTOR s'avère tout autant complexe. Alors que le développement des synapses thalamocorticales et intra-corticales n'est pas affecté dans les souris pré-adolescentes dans le modèle à l'étude, ces dernières présentent des déficits chez les souris adultes. Le scénario complexe que l'on pourrait imaginer serait que l'impact de la délétion de la voie mTOR-TSC1 sur les synapses glutamatergiques innervant les cellules PV n'est détectable qu'après la phase de développement de ces synapses. L'on pourrait ainsi attribuer à cette voie une fonction du maintien de la stabilité de ces synapses chez les adultes. Par ailleurs l'absence de *TSC1* dans les cellules PV provoque des altérations dans les comportements sociaux et des déficits sensoriels, ces deux déficits font partie des symptômes de base des maladies du spectre de l'autisme. Ainsi, ces données viennent consolider la littérature déjà existante sur l'implication des cellules PV dans le déclenchement des symptômes de l'autisme.

Quoique divers traitements aient été proposés pour tenter d'améliorer la vie des patients souffrant de l'autisme, aucun d'entre eux n'a été malheureusement assez efficace pour renverser totalement le phénotype acquis. Cela pourrait être dû au fait que les études cliniques excluent généralement les enfants (et à raison, dans la plupart des cas) des cohortes de patients. Pourtant, nos données suggèrent l'existence d'une fenêtre de développement critique au cours de laquelle un court traitement produit des effets bénéfiques à long terme sur la connectivité des cellules PV ainsi que les déficits comportementaux.

Somme toute, les cellules PV n'ont pas fini de livrer leurs secrets, alors, approfondir les mécanismes régulant leur développement reste primordial afin d'identifier les meilleures cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies neurodéveloppementales en général et en particulier des maladies du spectre de l'autisme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kim, S.G., G.R. Buel, and J. Blenis, *Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway*. Mol Cells, 2013. **35**(6): p. 463-73.
2. Lipton, J.O. and M. Sahin, *The neurology of mTOR*. Neuron, 2014. **84**(2): p. 275-91.
3. Sato, A., *mTOR, a Potential Target to Treat Autism Spectrum Disorder*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2016. **15**(5): p. 533-43.
4. Hung, C.M., et al., *mTOR-dependent cell survival mechanisms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
5. Huang, K. and D.C. Fingar, *Growing knowledge of the mTOR signaling network*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **36**: p. 79-90.
6. Chong, Z.Z., et al., *Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders*. Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(6): p. 374-91.
7. Yang, H., et al., *mTOR kinase structure, mechanism and regulation*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 217-23.
8. Alayev, A. and M.K. Holz, *mTOR signaling for biological control and cancer*. J Cell Physiol, 2013. **228**(8): p. 1658-64.
9. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.
10. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, *Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 310-22.
11. Dibble, C.C. and L.C. Cantley, *Regulation of mTORC1 by PI3K signaling*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(9): p. 545-55.
12. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **169**(2): p. 361-371.
13. Petroulakis, E., et al., *mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy*. Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 195-9.
14. Zhou, H. and S. Huang, *The complexes of mammalian target of rapamycin*. Curr Protein Pept Sci, 2010. **11**(6): p. 409-24.
15. Nicklin, P., et al., *Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy*. Cell, 2009. **136**(3): p. 521-34.
16. Avruch, J., et al., *Amino acid regulation of TOR complex 1*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(4): p. E592-602.
17. Smith, E.M., et al., *The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18717-27.
18. Baho, E. and G. Di Cristo, *Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner*. J Neurosci, 2012. **32**(3): p. 911-8.
19. Huberman, A.D., M.B. Feller, and B. Chapman, *Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 479-509.
20. Buffelli, M., et al., *Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 430-4.
21. Bosman, L.W. and A. Konnerth, *Activity-dependent plasticity of developing climbing fiber-Purkinje cell synapses*. Neuroscience, 2009. **162**(3): p. 612-23.
22. Buffington, S.A., W. Huang, and M. Costa-Mattioli, *Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction*. Annu Rev Neurosci, 2014. **37**: p. 17-38.
23. Choe, H.K. and J. Cho, *Comprehensive Genome-Wide Approaches to Activity-Dependent Translational Control in Neurons*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(5).
24. Kleijer, K.T., et al., *Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(6): p. 1037-62.

25. Lasarge, C.L. and S.C. Danzer, *Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation*. Front Mol Neurosci, 2014. **7**: p. 18.
26. Perez-Alvarez, M.J., et al., *Role of mTORC1 Controlling Proteostasis after Brain Ischemia*. Front Neurosci, 2018. **12**: p. 60.
27. Ben-Sahra, I. and B.D. Manning, *mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth*. Curr Opin Cell Biol, 2017. **45**: p. 72-82.
28. Ebrahimi-Fakhari, D., et al., *Impaired Mitochondrial Dynamics And Mitophagy In Neuronal Models Of Tuberous Sclerosis Complex*. Cell Rep, 2016. **17**(8): p. 2162.
29. Dobashi, Y., et al., *Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(5): p. 476-95.
30. Gallagher, L.E., L.E. Williamson, and E.Y. Chan, *Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms*. Cells, 2016. **5**(2).
31. Kassai, H., et al., *Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases*. Cell Rep, 2014. **7**(5): p. 1626-1639.
32. Kim, J.K. and J.H. Lee, *Mechanistic Target of Rapamycin Pathway in Epileptic Disorders*. J Korean Neurosurg Soc, 2019. **62**(3): p. 272-287.
33. Hentges, K.E., et al., *FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13796-801.
34. Lee, D.Y., *Roles of mTOR Signaling in Brain Development*. Exp Neurobiol, 2015. **24**(3): p. 177-85.
35. Kwon, C.H., et al., *Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice*. Neuron, 2006. **50**(3): p. 377-88.
36. Tavazoie, S.F., et al., *Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2*. Nat Neurosci, 2005. **8**(12): p. 1727-34.
37. Choi, Y.J., et al., *Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2485-95.
38. Meikle, L., et al., *A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival*. J Neurosci, 2007. **27**(21): p. 5546-58.
39. Uhlmann, E.J., et al., *Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures*. Ann Neurol, 2002. **52**(3): p. 285-96.
40. Cloetta, D., et al., *Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis*. J Neurosci, 2013. **33**(18): p. 7799-810.
41. Thomanetz, V., et al., *Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology*. J Cell Biol, 2013. **201**(2): p. 293-308.
42. Bercury, K.K., et al., *Conditional ablation of raptor or rictor has differential impact on oligodendrocyte differentiation and CNS myelination*. J Neurosci, 2014. **34**(13): p. 4466-80.
43. Wahl, S.E., et al., *Mammalian target of rapamycin promotes oligodendrocyte differentiation, initiation and extent of CNS myelination*. J Neurosci, 2014. **34**(13): p. 4453-65.
44. Nie, D., et al., *Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance*. Nat Neurosci, 2010. **13**(2): p. 163-72.
45. Dixon-Salazar, T.J., et al., *MHC class I limits hippocampal synapse density by inhibiting neuronal insulin receptor signaling*. J Neurosci, 2014. **34**(35): p. 11844-56.
46. Yoon, B.C., K.H. Zivraj, and C.E. Holt, *Local translation and mRNA trafficking in axon pathfinding*. Results Probl Cell Differ, 2009. **48**: p. 269-88.
47. Li, N., et al., *mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists*. Science, 2010. **329**(5994): p. 959-64.
48. Raab-Graham, K.F., et al., *Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites*. Science, 2006. **314**(5796): p. 144-8.
49. Lu, Y., S. Belin, and Z. He, *Signaling regulations of neuronal regenerative ability*. Curr Opin Neurobiol, 2014. **27**: p. 135-42.

50. Park, K.K., et al., *Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway*. Science, 2008. **322**(5903): p. 963-6.
51. Verma, P., et al., *Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration*. J Neurosci, 2005. **25**(2): p. 331-42.
52. Hoeffler, C.A. and E. Klann, *mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease*. Trends Neurosci, 2010. **33**(2): p. 67-75.
53. Beaumont, V., et al., *Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation*. Neuron, 2001. **32**(3): p. 489-501.
54. Casadio, A., et al., *A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis*. Cell, 1999. **99**(2): p. 221-37.
55. Tang, S.J., et al., *A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 467-72.
56. Hoeffler, C.A., et al., *Removal of FKBP12 enhances mTOR-Raptor interactions, LTP, memory, and perseverative/repetitive behavior*. Neuron, 2008. **60**(5): p. 832-45.
57. Banko, J.L., et al., *The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus*. J Neurosci, 2005. **25**(42): p. 9581-90.
58. Hou, L. and E. Klann, *Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression*. J Neurosci, 2004. **24**(28): p. 6352-61.
59. Banko, J.L., et al., *Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression*. J Neurosci, 2006. **26**(8): p. 2167-73.
60. Auerbach, B.D., E.K. Osterweil, and M.F. Bear, *Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology*. Nature, 2011. **480**(7375): p. 63-8.
61. Urbanska, M., L. Swiech, and J. Jaworski, *Developmental plasticity of the dendritic compartment: focus on the cytoskeleton*. Adv Exp Med Biol, 2012. **970**: p. 265-84.
62. Huang, W., et al., *mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory*. Nat Neurosci, 2013. **16**(4): p. 441-8.
63. Ehninger, D., et al., *Reversal of learning deficits in a Tsc2+/- mouse model of tuberous sclerosis*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 843-8.
64. Antion, M.D., et al., *Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity*. Learn Mem, 2008. **15**(1): p. 29-38.
65. Bateup, H.S., et al., *Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of tuberous sclerosis*. Neuron, 2013. **78**(3): p. 510-22.
66. Zhao, J.P. and A. Yoshii, *Hyperexcitability of the local cortical circuit in mouse models of tuberous sclerosis complex*. Mol Brain, 2019. **12**(1): p. 6.
67. Nelson, S.B. and V. Valakh, *Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders*. Neuron, 2015. **87**(4): p. 684-98.
68. Cox, R.L., et al., *Multiple Critical Periods for Rapamycin Treatment to Correct Structural Defects in Tsc-1-Suppressed Brain*. Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 409.
69. Bateup, H.S., et al., *Loss of Tsc1 in vivo impairs hippocampal mGluR-LTD and increases excitatory synaptic function*. J Neurosci, 2011. **31**(24): p. 8862-9.
70. Kosillo, P., et al., *Tsc1-mTORC1 signaling controls striatal dopamine release and cognitive flexibility*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 5426.
71. Benthall, K.N., S.L. Ong, and H.S. Bateup, *Cortico-striatal Transmission Is Selectively Enhanced in Striatonigral Neurons with Postnatal Loss of Tsc1*. Cell Rep, 2018. **23**(11): p. 3197-3208.
72. de Vries, P.J., *Targeted treatments for cognitive and neurodevelopmental disorders in tuberous sclerosis complex*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(3): p. 275-82.

73. Yeung, K.S., et al., *Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism*. Mol Autism, 2017. **8**: p. 66.
74. Davis, P.E., et al., *Tuberous Sclerosis: A New Frontier in Targeted Treatment of Autism*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(3): p. 572-83.
75. Uysal, S.P. and M. Sahin, *Tuberous Sclerosis Complex: A review of the past, present and future*. Turk J Med Sci, 2020.
76. Crino, P.B., K.L. Nathanson, and E.P. Henske, *The tuberous sclerosis complex*. N Engl J Med, 2006. **355**(13): p. 1345-56.
77. Julich, K. and M. Sahin, *Mechanism-based treatment in tuberous sclerosis complex*. Pediatr Neurol, 2014. **50**(4): p. 290-6.
78. Crino, P.B., *mTOR signaling in epilepsy: insights from malformations of cortical development*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(4).
79. Tsai, P.T., et al., *Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice*. Nature, 2012. **488**(7413): p. 647-51.
80. Malik, R., et al., *Tsc1 represses parvalbumin expression and fast-spiking properties in somatostatin lineage cortical interneurons*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4994.
81. Meikle, L., et al., *Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function*. J Neurosci, 2008. **28**(21): p. 5422-32.
82. Talos, D.M., et al., *The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35885.
83. Burket, J.A., et al., *NMDA receptor activation regulates sociability by its effect on mTOR signaling activity*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2015. **60**: p. 60-5.
84. Alfaiz, A.A., et al., *TBC1D7 mutations are associated with intellectual disability, macrocrania, patellar dislocation, and celiac disease*. Hum Mutat, 2014. **35**(4): p. 447-51.
85. Capo-Chichi, J.M., et al., *Disruption of TBC1D7, a subunit of the TSC1-TSC2 protein complex, in intellectual disability and megalencephaly*. J Med Genet, 2013. **50**(11): p. 740-4.
86. Kwiatkowski, D.J., et al., *A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(5): p. 525-34.
87. Zeng, L.H., et al., *Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex*. Ann Neurol, 2008. **63**(4): p. 444-53.
88. Way, S.W., et al., *The differential effects of prenatal and/or postnatal rapamycin on neurodevelopmental defects and cognition in a neuroglial mouse model of tuberous sclerosis complex*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(14): p. 3226-36.
89. Anderl, S., et al., *Therapeutic value of prenatal rapamycin treatment in a mouse brain model of tuberous sclerosis complex*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(23): p. 4597-604.
90. Tsai, V., et al., *Fetal brain mTOR signaling activation in tuberous sclerosis complex*. Cereb Cortex, 2014. **24**(2): p. 315-27.
91. Krueger, D.A., et al., *Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis*. N Engl J Med, 2010. **363**(19): p. 1801-11.
92. Krueger, D.A., et al., *Everolimus treatment of refractory epilepsy in tuberous sclerosis complex*. Ann Neurol, 2013. **74**(5): p. 679-87.
93. Selten, M., H. van Bokhoven, and N. Nadif Kasri, *Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders*. F1000Res, 2018. **7**: p. 23.
94. Lim, L., et al., *Optimization of interneuron function by direct coupling of cell migration and axonal targeting*. Nat Neurosci, 2018. **21**(7): p. 920-931.
95. Rudy, B., et al., *Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons*. Dev Neurobiol, 2011. **71**(1): p. 45-61.

96. Di Cristo, G., et al., *GABAergic circuit development and its implication for CNS disorders*. *Neural Plast*, 2011. **2011**: p. 623705.
97. Le Magueresse, C. and H. Monyer, *GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex*. *Neuron*, 2013. **77**(3): p. 388-405.
98. Paul, A., et al., *Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity*. *Cell*, 2017. **171**(3): p. 522-539 e20.
99. Rossignol, E., *Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders*. *Neural Plast*, 2011. **2011**: p. 649325.
100. Lim, L., et al., *Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons*. *Neuron*, 2018. **100**(2): p. 294-313.
101. Fishell, G. and B. Rudy, *Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are"*. *Annu Rev Neurosci*, 2011. **34**: p. 535-67.
102. Lee, S., et al., *The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors*. *J Neurosci*, 2010. **30**(50): p. 16796-808.
103. Petryniak, M.A., et al., *Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain*. *Neuron*, 2007. **55**(3): p. 417-33.
104. Cobos, I., U. Borello, and J.L. Rubenstein, *Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth*. *Neuron*, 2007. **54**(6): p. 873-88.
105. Colasante, G., et al., *Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons*. *J Neurosci*, 2008. **28**(42): p. 10674-86.
106. Kitamura, K., et al., *Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans*. *Nat Genet*, 2002. **32**(3): p. 359-69.
107. Le, T.N., et al., *GABAergic Interneuron Differentiation in the Basal Forebrain Is Mediated through Direct Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase Isoforms by Dlx Homeobox Transcription Factors*. *J Neurosci*, 2017. **37**(36): p. 8816-8829.
108. Stuhmer, T., et al., *Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression*. *Development*, 2002. **129**(1): p. 245-52.
109. Wang, Y., et al., *Dlx5 and Dlx6 regulate the development of parvalbumin-expressing cortical interneurons*. *J Neurosci*, 2010. **30**(15): p. 5334-45.
110. Sussel, L., et al., *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*, 1999. **126**(15): p. 3359-70.
111. Sandberg, M., et al., *Transcriptional Networks Controlled by NKX2-1 in the Development of Forebrain GABAergic Neurons*. *Neuron*, 2016. **91**(6): p. 1260-1275.
112. Liodis, P., et al., *Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes*. *J Neurosci*, 2007. **27**(12): p. 3078-89.
113. Vogt, D., et al., *Lhx6 directly regulates Arx and CXCR7 to determine cortical interneuron fate and laminar position*. *Neuron*, 2014. **82**(2): p. 350-64.
114. Mi, D., et al., *Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo*. *Science*, 2018. **360**(6384): p. 81-85.
115. Huang, Z.J., *Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation pattern: role of GABA signalling and beyond*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 9): p. 1881-8.
116. Huang, Z.J., G. Di Cristo, and F. Ango, *Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(9): p. 673-86.
117. Tamas, G., E.H. Buhl, and P. Somogyi, *Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex*. *J Physiol*, 1997. **500** (Pt 3): p. 715-38.
118. Wang, Y., et al., *Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex*. *Cereb Cortex*, 2002. **12**(4): p. 395-410.

119. Morales, B., S.Y. Choi, and A. Kirkwood, *Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 8084-90.
120. Chattopadhyaya, B., et al., *Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period*. J Neurosci, 2004. **24**(43): p. 9598-611.
121. Jiao, Y., et al., *Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits*. J Neurosci, 2006. **26**(34): p. 8691-701.
122. Hartman, K.N., et al., *Activity-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons*. Nat Neurosci, 2006. **9**(5): p. 642-9.
123. Owens, D.F. and A.R. Kriegstein, *Is there more to GABA than synaptic inhibition?* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(9): p. 715-27.
124. Chattopadhyaya, B., et al., *GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex*. Neuron, 2007. **54**(6): p. 889-903.
125. Oh, W.C. and K.R. Smith, *Activity-dependent development of GABAergic synapses*. Brain Res, 2019. **1707**: p. 18-26.
126. Brose, N., *Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system*. Naturwissenschaften, 1999. **86**(11): p. 516-24.
127. Sudhof, T.C., *Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 903-11.
128. Missler, M., et al., *Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis*. Nature, 2003. **423**(6943): p. 939-48.
129. Dudanova, I., et al., *Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation*. J Comp Neurol, 2007. **502**(2): p. 261-74.
130. Chubykin, A.A., et al., *Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2*. Neuron, 2007. **54**(6): p. 919-31.
131. Chih, B., H. Engelman, and P. Scheiffele, *Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins*. Science, 2005. **307**(5713): p. 1324-8.
132. Li, J., et al., *Molecular Dissection of Neuroligin 2 and Slitrk3 Reveals an Essential Framework for GABAergic Synapse Development*. Neuron, 2017. **96**(4): p. 808-826 e8.
133. Geisler, S., et al., *Presynaptic alpha2delta-2 Calcium Channel Subunits Regulate Postsynaptic GABAA Receptor Abundance and Axonal Wiring*. J Neurosci, 2019. **39**(14): p. 2581-2605.
134. Chattopadhyaya, B., *Molecular mechanisms underlying activity-dependent GABAergic synapse development and plasticity and its implications for neurodevelopmental disorders*. Neural Plast, 2011. **2011**: p. 734231.
135. Itami, C., F. Kimura, and S. Nakamura, *Brain-derived neurotrophic factor regulates the maturation of layer 4 fast-spiking cells after the second postnatal week in the developing barrel cortex*. J Neurosci, 2007. **27**(9): p. 2241-52.
136. Di Cristo, G., et al., *Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1569-77.
137. Favuzzi, E., et al., *Distinct molecular programs regulate synapse specificity in cortical inhibitory circuits*. Science, 2019. **363**(6425): p. 413-417.
138. Cossart, R., *The maturation of cortical interneuron diversity: how multiple developmental journeys shape the emergence of proper network function*. Curr Opin Neurobiol, 2011. **21**(1): p. 160-8.
139. Rheims, S., et al., *Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro*. J Neurophysiol, 2008. **100**(2): p. 609-19.
140. Rheims, S., et al., *Layer-specific generation and propagation of seizures in slices of developing neocortex: role of excitatory GABAergic synapses*. J Neurophysiol, 2008. **100**(2): p. 620-8.
141. Crepel, V., et al., *A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus*. Neuron, 2007. **54**(1): p. 105-20.

142. Allene, C., et al., *Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12851-63.
143. Ben-Ari, Y., et al., *Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones*. J Physiol, 1989. **416**: p. 303-25.
144. Ito, S., *GABA and glycine in the developing brain*. J Physiol Sci, 2016. **66**(5): p. 375-9.
145. Iannone, A.F. and N.V. De Marco Garcia, *The Emergence of Network Activity Patterns in the Somatosensory Cortex - An Early Window to Autism Spectrum Disorders*. Neuroscience, 2021. **466**: p. 298-309.
146. Ben-Ari, Y., et al., *GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1215-84.
147. Mohajerani, M.H., et al., *Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3 CA1 connections in the hippocampus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13176-81.
148. Bonifazi, P., et al., *GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks*. Science, 2009. **326**(5958): p. 1419-24.
149. Chattopadhyaya, B. and G.D. Cristo, *GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders*. Front Psychiatry, 2012. **3**: p. 51.
150. Uhlhaas, P.J., et al., *Neural synchrony and the development of cortical networks*. Trends Cogn Sci, 2010. **14**(2): p. 72-80.
151. Baddeley, A., *Working memory*. Curr Biol, 2010. **20**(4): p. R136-40.
152. Howard, M.W., et al., *Gamma oscillations correlate with working memory load in humans*. Cereb Cortex, 2003. **13**(12): p. 1369-74.
153. Haenschel, C. and D. Linden, *Exploring intermediate phenotypes with EEG: working memory dysfunction in schizophrenia*. Behav Brain Res, 2011. **216**(2): p. 481-95.
154. Basar-Eroglu, C., et al., *Working memory related gamma oscillations in schizophrenia patients*. Int J Psychophysiol, 2007. **64**(1): p. 39-45.
155. Barr, M.S., et al., *Evidence for excessive frontal evoked gamma oscillatory activity in schizophrenia during working memory*. Schizophr Res, 2010. **121**(1-3): p. 146-52.
156. Bartos, M., I. Vida, and P. Jonas, *Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(1): p. 45-56.
157. Bartos, M., et al., *Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13222-7.
158. Whittington, M.A., R.D. Traub, and J.G. Jefferys, *Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 612-5.
159. Hasenstaub, A., et al., *Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks*. Neuron, 2005. **47**(3): p. 423-35.
160. Cardin, J.A., et al., *Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 663-7.
161. Sohal, V.S., et al., *Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 698-702.
162. Carlen, M., et al., *A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior*. Mol Psychiatry, 2012. **17**(5): p. 537-48.
163. Lewis, D.A., T. Hashimoto, and D.W. Volk, *Cortical inhibitory neurons and schizophrenia*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(4): p. 312-24.
164. Hashimoto, T., et al., *Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia*. J Neurosci, 2003. **23**(15): p. 6315-26.
165. Hashimoto, T., et al., *Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2008. **165**(4): p. 479-89.
166. Fatemi, S.H., et al., *Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices*. Biol Psychiatry, 2002. **52**(8): p. 805-10.

167. Yip, J., J.J. Soghomonian, and G.J. Blatt, *Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications*. *Acta Neuropathol*, 2007. **113**(5): p. 559-68.
168. Gogolla, N., et al., *Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism*. *J Neurodev Disord*, 2009. **1**(2): p. 172-81.
169. Uhlhaas, P.J. and W. Singer, *What do disturbances in neural synchrony tell us about autism?* *Biol Psychiatry*, 2007. **62**(3): p. 190-1.
170. Orekhova, E.V., et al., *Excess of high frequency electroencephalogram oscillations in boys with autism*. *Biol Psychiatry*, 2007. **62**(9): p. 1022-9.
171. van Diessen, E., et al., *Increased power of resting-state gamma oscillations in autism spectrum disorder detected by routine electroencephalography*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2015. **265**(6): p. 537-40.
172. Casanova, M.F., et al., *Effects of Transcranial Magnetic Stimulation Therapy on Evoked and Induced Gamma Oscillations in Children with Autism Spectrum Disorder*. *Brain Sci*, 2020. **10**(7).
173. Reith, R.M., et al., *Loss of Tsc2 in Purkinje cells is associated with autistic-like behavior in a mouse model of tuberous sclerosis complex*. *Neurobiol Dis*, 2013. **51**: p. 93-103.
174. Tang, X., R. Jaenisch, and M. Sur, *The role of GABAergic signalling in neurodevelopmental disorders*. *Nat Rev Neurosci*, 2021. **22**(5): p. 290-307.
175. Wohr, M., et al., *Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities*. *Transl Psychiatry*, 2015. **5**: p. e525.
176. Ito-Ishida, A., et al., *Loss of MeCP2 in Parvalbumin-and Somatostatin-Expressing Neurons in Mice Leads to Distinct Rett Syndrome-like Phenotypes*. *Neuron*, 2015. **88**(4): p. 651-8.
177. Tsai, P.T., et al., *Sensitive Periods for Cerebellar-Mediated Autistic-like Behaviors*. *Cell Rep*, 2018. **25**(2): p. 357-367 e4.
178. Vogt, D., et al., *Mouse Cntnap2 and Human CNTNAP2 ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV+ Cortical Interneurons*. *Cereb Cortex*, 2018. **28**(11): p. 3868-3879.
179. Cao, W., et al., *Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice*. *Neuron*, 2018. **98**(3): p. 670.
180. Dong, F., et al., *Deletion of CTNBN1 in inhibitory circuitry contributes to autism-associated behavioral defects*. *Hum Mol Genet*, 2016. **25**(13): p. 2738-2751.
181. Selimbeyoglu, A., et al., *Modulation of prefrontal cortex excitation/inhibition balance rescues social behavior in CNTNAP2-deficient mice*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(401).
182. Yizhar, O., et al., *Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction*. *Nature*, 2011. **477**(7363): p. 171-8.
183. Southwell, D.G., et al., *Interneuron Transplantation Rescues Social Behavior Deficits without Restoring Wild-Type Physiology in a Mouse Model of Autism with Excessive Synaptic Inhibition*. *J Neurosci*, 2020. **40**(11): p. 2215-2227.
184. Billingslea, E.N., et al., *Parvalbumin cell ablation of NMDA-R1 causes increased resting network excitability with associated social and self-care deficits*. *Neuropsychopharmacology*, 2014. **39**(7): p. 1603-13.
185. Gandal, M.J., et al., *GABAB-mediated rescue of altered excitatory-inhibitory balance, gamma synchrony and behavioral deficits following constitutive NMDAR-hypofunction*. *Transl Psychiatry*, 2012. **2**: p. e142.
186. Gonzalez-Burgos, G. and D.A. Lewis, *NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 2012. **38**(5): p. 950-7.
187. McKernan, E.P., Y. Wu, and N. Russo, *Sensory Overresponsivity as a Predictor of Amplitude Discrimination Performance in Youth with ASD*. *J Autism Dev Disord*, 2020. **50**(9): p. 3140-3148.
188. O'Riordan, M. and F. Passetti, *Discrimination in autism within different sensory modalities*. *J Autism Dev Disord*, 2006. **36**(5): p. 665-75.

189. Smirni, D., et al., *Noli Me Tangere: Social Touch, Tactile Defensiveness, and Communication in Neurodevelopmental Disorders*. Brain Sci, 2019. **9**(12).
190. Zetler, N.K., et al., *Somatosensory Discrimination in People With Autism Spectrum Disorder: A Scoping Review*. Am J Occup Ther, 2019. **73**(5): p. 7305205010p1-7305205010p14.
191. Tavassoli, T., et al., *Sensory over-responsivity: parent report, direct assessment measures, and neural architecture*. Mol Autism, 2019. **10**: p. 4.
192. Haigh, S.M., et al., *Over-Responsiveness and Greater Variability in Roughness Perception in Autism*. Autism Res, 2016. **9**(3): p. 393-402.
193. Schaffler, M.D., L.J. Middleton, and I. Abdus-Saboor, *Mechanisms of Tactile Sensory Phenotypes in Autism: Current Understanding and Future Directions for Research*. Curr Psychiatry Rep, 2019. **21**(12): p. 134.
194. Orefice, L.L., et al., *Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models*. Cell, 2019. **178**(4): p. 867-886 e24.
195. Orefice, L.L., et al., *Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs*. Cell, 2016. **166**(2): p. 299-313.
196. Goel, A., et al., *Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible*. Nat Neurosci, 2018. **21**(10): p. 1404-1411.
197. Sohal, V.S. and J.L.R. Rubenstein, *Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders*. Mol Psychiatry, 2019. **24**(9): p. 1248-1257.
198. Butt, S.J., et al., *The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes*. Neuron, 2008. **59**(5): p. 722-32.
199. Zhao, Y., et al., *Distinct molecular pathways for development of telencephalic interneuron subtypes revealed through analysis of Lhx6 mutants*. J Comp Neurol, 2008. **510**(1): p. 79-99.
200. Pai, E.L., et al., *Mafb and c-Maf Have Prenatal Compensatory and Postnatal Antagonistic Roles in Cortical Interneuron Fate and Function*. Cell Rep, 2019. **26**(5): p. 1157-1173 e5.
201. Vogt, D., et al., *The parvalbumin/somatostatin ratio is increased in Pten mutant mice and by human PTEN ASD alleles*. Cell Rep, 2015. **11**(6): p. 944-956.
202. Wong, F.K., et al., *Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks*. Nature, 2018. **557**(7707): p. 668-673.
203. Du, J., et al., *Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kv3.1b in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus*. J Neurosci, 1996. **16**(2): p. 506-18.
204. Antoine, M.W., et al., *Increased Excitation-Inhibition Ratio Stabilizes Synapse and Circuit Excitability in Four Autism Mouse Models*. Neuron, 2019. **101**(4): p. 648-661 e4.
205. Feliciano, D.M., et al., *A circuitry and biochemical basis for tuberous sclerosis symptoms: from epilepsy to neurocognitive deficits*. Int J Dev Neurosci, 2013. **31**(7): p. 667-78.
206. Haji, N., et al., *Tsc1 haploinsufficiency in Nkx2.1 cells upregulates hippocampal interneuron mTORC1 activity, impairs pyramidal cell synaptic inhibition, and alters contextual fear discrimination and spatial working memory in mice*. Mol Autism, 2020. **11**(1): p. 29.
207. Chen, C., et al., *Synaptotagmin 2 Is the Fast Ca(2+) Sensor at a Central Inhibitory Synapse*. Cell Rep, 2017. **18**(3): p. 723-736.
208. Hartig, W., K. Brauer, and G. Bruckner, *Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons*. Neuroreport, 1992. **3**(10): p. 869-72.
209. Costa-Mattioli, M. and L.M. Monteggia, *mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders*. Nat Neurosci, 2013. **16**(11): p. 1537-43.
210. Hui, K.K. and M. Tanaka, *Autophagy links MTOR and GABA signaling in the brain*. Autophagy, 2019. **15**(10): p. 1848-1849.
211. Di Nardo, A., et al., *Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(14): p. 3865-74.

212. Xu, Q., M. Tam, and S.A. Anderson, *Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon*. J Comp Neurol, 2008. **506**(1): p. 16-29.
213. Liao, X., M. Makris, and X.M. Luo, *Fluorescence-activated Cell Sorting for Purification of Plasmacytoid Dendritic Cells from the Mouse Bone Marrow*. J Vis Exp, 2016(117).
214. Li, S., et al., *The cross-talk of energy sensing and mitochondrial anchoring sustains synaptic efficacy by maintaining presynaptic metabolism*. Nat Metab, 2020. **2**(10): p. 1077-1095.
215. Tang, G., et al., *Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits*. Neuron, 2014. **83**(5): p. 1131-43.
216. Maday, S., et al., *Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation*. Neuron, 2014. **84**(2): p. 292-309.
217. Uittenbogaard, M. and A. Chiaramello, *Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(35): p. 5574-93.
218. Frye, R.E. and D.A. Rossignol, *Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders*. Pediatr Res, 2011. **69**(5 Pt 2): p. 41R-7R.
219. Rose, S., et al., *Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder*. Mol Diagn Ther, 2018. **22**(5): p. 571-593.
220. Ebrahimi-Fakhari, D., et al., *Impaired Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Neuronal Models of Tuberous Sclerosis Complex*. Cell Rep, 2016. **17**(4): p. 1053-1070.
221. Goto, J., et al., *Regulable neural progenitor-specific Tsc1 loss yields giant cells with organellar dysfunction in a model of tuberous sclerosis complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): p. E1070-9.
222. Kann, O., *The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease*. Neurobiol Dis, 2016. **90**: p. 75-85.
223. Kann, O., I.E. Papageorgiou, and A. Draguhn, *Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks*. J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(8): p. 1270-82.
224. Inan, M., et al., *Energy deficit in parvalbumin neurons leads to circuit dysfunction, impaired sensory gating and social disability*. Neurobiol Dis, 2016. **93**: p. 35-46.
225. Sierra, A., et al., *The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia*. Glia, 2016. **64**(11): p. 1801-40.
226. Bilimoria, P.M. and B. Stevens, *Microglia function during brain development: New insights from animal models*. Brain Res, 2015. **1617**: p. 7-17.
227. Katz, L.C. and C.J. Shatz, *Synaptic activity and the construction of cortical circuits*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1133-8.
228. Lichtman, J.W. and H. Colman, *Synapse elimination and indelible memory*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 269-78.
229. Kano, M. and K. Hashimoto, *Synapse elimination in the central nervous system*. Curr Opin Neurobiol, 2009. **19**(2): p. 154-61.
230. Tremblay, M.E., R.L. Lowery, and A.K. Majewska, *Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience*. PLoS Biol, 2010. **8**(11): p. e1000527.
231. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
232. Schafer, D.P., et al., *Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner*. Neuron, 2012. **74**(4): p. 691-705.
233. Cong, Q., et al., *The endogenous neuronal complement inhibitor SRPX2 protects against complement-mediated synapse elimination during development*. Nat Neurosci, 2020. **23**(9): p. 1067-1078.
234. Thion, M.S., et al., *Biphasic Impact of Prenatal Inflammation and Macrophage Depletion on the Wiring of Neocortical Inhibitory Circuits*. Cell Rep, 2019. **28**(5): p. 1119-1126 e4.

235. Favuzzi, E., et al., *GABA-receptive microglia selectively sculpt developing inhibitory circuits*. Cell, 2021. **184**(15): p. 4048-4063 e32.
236. Scott-Hewitt, N., et al., *Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia*. EMBO J, 2020. **39**(16): p. e105380.
237. Filipello, F., et al., *The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity*. Immunity, 2018. **48**(5): p. 979-991 e8.
238. Kim, H.J., et al., *Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(11): p. 1576-1584.
239. Fagiolini, M., et al., *Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2854-9.
240. Fagiolini, M., et al., *Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1681-3.
241. Hensch, T.K., et al., *Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1504-8.
242. LeBlanc, J.J. and M. Fagiolini, *Autism: a "critical period" disorder?* Neural Plast, 2011. **2011**: p. 921680.
243. Hwang, S.K., et al., *Everolimus improves neuropsychiatric symptoms in a patient with tuberous sclerosis carrying a novel TSC2 mutation*. Mol Brain, 2016. **9**(1): p. 56.
244. Kilincaslan, A., et al., *Beneficial Effects of Everolimus on Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in a Group of Patients with Tuberous Sclerosis Complex*. J Child Adolesc Psychopharmacol, 2017. **27**(4): p. 383-388.
245. Krueger, D.A., et al., *Everolimus for treatment of tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders*. Ann Clin Transl Neurol, 2017. **4**(12): p. 877-887.
246. Mizuguchi, M., et al., *Everolimus for epilepsy and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: EXIST-3 substudy in Japan*. Brain Dev, 2019. **41**(1): p. 1-10.
247. Overwater, I.E., et al., *A randomized controlled trial with everolimus for IQ and autism in tuberous sclerosis complex*. Neurology, 2019. **93**(2): p. e200-e209.
248. Berger, J.M., T.T. Rohn, and J.T. Oxford, *Autism as the Early Closure of a Neuroplastic Critical Period Normally Seen in Adolescence*. Biol Syst Open Access, 2013. **1**.
249. Javitt, D.C. and R.A. Sweet, *Auditory dysfunction in schizophrenia: integrating clinical and basic features*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(9): p. 535-50.
250. Robertson, C.E. and S. Baron-Cohen, *Sensory perception in autism*. Nat Rev Neurosci, 2017. **18**(11): p. 671-684.
251. Zoghbi, H.Y. and M.F. Bear, *Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
252. Michaelson, S.D., et al., *SYNGAP1 heterozygosity disrupts sensory processing by reducing touch-related activity within somatosensory cortex circuits*. Nat Neurosci, 2018. **21**(12): p. 1-13.
253. Blakemore, S.J., et al., *Tactile sensitivity in Asperger syndrome*. Brain Cogn, 2006. **61**(1): p. 5-13.
254. Cascio, C.J., *Somatosensory processing in neurodevelopmental disorders*. J Neurodev Disord, 2010. **2**(2): p. 62-9.
255. Tomchek, S.D. and W. Dunn, *Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile*. Am J Occup Ther, 2007. **61**(2): p. 190-200.
256. Wiggins, L.D., et al., *Brief report: sensory abnormalities as distinguishing symptoms of autism spectrum disorders in young children*. J Autism Dev Disord, 2009. **39**(7): p. 1087-91.
257. Mammen, M.A., et al., *Infant Avoidance during a Tactile Task Predicts Autism Spectrum Behaviors in Toddlerhood*. Infant Ment Health J, 2015. **36**(6): p. 575-87.
258. Marco, E.J., et al., *Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings*. Pediatr Res, 2011. **69**(5 Pt 2): p. 48R-54R.

259. Wu, H.P., et al., *Novel, whisker-dependent texture discrimination task for mice*. Behav Brain Res, 2013. **237**: p. 238-42.
260. Martini, F.J., et al., *Spontaneous activity in developing thalamic and cortical sensory networks*. Neuron, 2021. **109**(16): p. 2519-2534.
261. Bopp, R., et al., *An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse*. J Neurosci, 2017. **37**(9): p. 2435-2448.
262. Hua, J.Y. and S.J. Smith, *Neural activity and the dynamics of central nervous system development*. Nat Neurosci, 2004. **7**(4): p. 327-32.
263. Zhang, L.I. and M.M. Poo, *Electrical activity and development of neural circuits*. Nat Neurosci, 2001. **4 Suppl**: p. 1207-14.
264. Bullitt, E., *Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat*. J Comp Neurol, 1990. **296**(4): p. 517-30.
265. Soumiya, H., et al., *Neonatal Whisker Trimming Impairs Fear/Anxiety-Related Emotional Systems of the Amygdala and Social Behaviors in Adult Mice*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0158583.
266. Shao, Y.R., et al., *Plasticity of recurrent I2/3 inhibition and gamma oscillations by whisker experience*. Neuron, 2013. **80**(1): p. 210-22.
267. Sabatini, B.L., T.G. Oertner, and K. Svoboda, *The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines*. Neuron, 2002. **33**(3): p. 439-52.
268. Kerr, R., et al., *Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of C. elegans*. Neuron, 2000. **26**(3): p. 583-94.
269. Chen, T.W., et al., *Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity*. Nature, 2013. **499**(7458): p. 295-300.
270. Roth, B.L., *DREADDs for Neuroscientists*. Neuron, 2016. **89**(4): p. 683-94.