

Université de Montréal

**L'haploinsuffisance de *Syngap1* dans les neurones
GABAergiques induit une hyperactivation de mTOR et des
déficits cognitifs**

Par Théo Badra

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de MSc
Neurosciences

Avril 2018

© Théo Badra, 2018

Résumé

La déficience intellectuelle est un handicap qui affecte 2 à 3% de la population. De nombreuses études ont montré une corrélation importante entre les mutations sur des gènes codant pour des protéines synaptiques et le développement de déficience intellectuelle. Des mutations dans le gène *SYNGAP1*, qui code pour une protéine activatrice GTPase de Ras, sont liées à la déficience intellectuelle chez l'humain.

L'haploinsuffisance de *Syngap1* augmente les niveaux d'activité de la voie Ras-ERK-mTOR, une insertion excessive de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique des neurones excitateurs et affecte la morphologie des épines dendritiques. Dans les modèles de souris, les déficits cognitifs sont dus en partie à la réduction de l'expression de SYNGAP1 dans la circuiterie GABAergique. L'haploinsuffisance de *Syngap1* dans les neurones GABAergiques provenant de l'éminence ganglionnaire médiale réduit le nombre d'innervations périsonotiques formées par les cellules à panier et l'activité synaptique inhibitrice. Les mécanismes moléculaires liant l'haploinsuffisance de *Syngap1* aux déficits GABAergiques et cognitifs restent inconnus. Dans cette étude, nous démontrons que mTOR est hyperactivé dans les cellules à panier exprimant la parvalbumine dans le cortex préfrontal dans des conditions basales et après stimulation neuronale chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+}. De plus, nous montrons que deux modèles de souris, qui ont une hyperactivation de mTOR dans les interneurons exprimant la parvalbumine, ont des déficits de la mémoire de la peur contextuelle. Des traitements avec la lovastatine n'ont pas normalisé la signalisation de mTOR et le déficit de la mémoire contextuelle chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+}. Enfin la perte spécifique de *Syngap1* dans les interneurons PV+ pendant la seconde semaine postnatale ne cause pas de déficits de la peur contextuelle, suggérant que les déficits cognitifs présents chez l'adulte sont dus à des altérations qui se produisent tôt durant le développement neuronal. Nos résultats suggèrent que les mécanismes d'haploinsuffisance de *Syngap1* sont en partie similaires dans les interneurons GABAergiques que dans les neurones glutamatergiques.

Mots-clés : Déficience intellectuelle, *Syngap1*, interneurons GABAergiques, mTOR, comportement, cognition, lovastatine

Abstract

Intellectual disability is characterized by significant impairments of cognitive and adaptative functions reaching a prevalence of 2 to 3 % worldwide. Numerous studies have linked intellectual disability with mutations in genes coding for protein active at the synapses. *De novo* mutations in the *SYNGAP1* gene, coding for a GTPase-activating protein, causes moderate to severe intellectual disability.

Syngap1 haploinsufficiency increases activity level of Ras-ERK-mTOR, causing excessive insertion of AMPA receptor at the postsynaptic membrane of excitatory neurons and affects spine morphology. In mice, cognitive deficits are in part due to alteration of the GABAergic circuitry. *Syngap1* haploinsufficiency in GABAergic neurons originating from the medial ganglionic eminence reduces the number of perisomatic innervation formed by parvalbumin-expressing basket cells and reduces inhibitory synaptic activity. The downstream molecular mechanisms linking *Syngap1* haploinsufficiency to GABAergic deficits are unknown. In this study, we show that mTOR is hyperactivated in parvalbumin-expressing basket cells in the prefrontal cortex under basal conditions and after neuronal stimulation in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{lox/+} mice. Furthermore, we show that two mice models exhibiting mTOR hyperactivation in parvalbumin-expressing interneurons had contextual fear memory deficits. Lovastatin treatment failed to restore regular mTOR signaling and contextual fear memory in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{lox/+} mice. Finally, we show that inducing *Syngap1* haploinsufficiency specifically in parvalbumin-positive interneurons after the second postnatal week does not cause fear memory deficits, thus suggesting that cognitive problems in adult mice may be due to alterations occurring during early brain development. Our results point to mTOR pathway as a signaling mechanism potentially linking *Syngap1* haploinsufficiency and GABAergic deficits. In addition, our data suggest that treatment in the early postnatal period might be more effective to treat molecular and cognitive deficits caused by *Syngap1* mutations.

Keywords: Intellectual disability, *Syngap1*, GABAergic interneurons, mTOR, behavior, cognition, lovastatin

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des figures.....	5
Listes des sigles.....	6
Liste des abréviations.....	7
Remerciements.....	10
Chapitre I: Introduction.....	11
I - La déficience intellectuelle.....	11
I - 1. Définition et diagnostique.....	11
I - 2. Les causes de la déficience intellectuelle.....	12
I - 3. Altérations synaptiques ou altérations durant le développement neuronal ?.....	13
I – 4. Le gène <i>Syngap1</i>	14
II – Le complexe postsynaptique.....	15
II – 1. Fonctionnement de la synapse glutamatergique.....	15
II - 2. Le rôle de <i>Syngap1</i> durant le développement des circuits neuronaux.....	16
II - 3. Le rôle de <i>Syngap1</i> à la synapse glutamatergique.....	18
III - Les interneurons GABAergiques.....	21
III - 1. L'origines des interneurons GABAergiques.....	21
III - 2. La diversité des interneurons GABAergiques.....	22
III - 3. Les fonctions des neurones GABAergiques.....	24
III – 4. Les conséquences d'une réduction de <i>Syngap1</i> dans les neurones GABAergiques.....	25
IV – Les phénotypes comportementaux induit par les mutations de <i>Syngap1</i>	26
IV-1. Le phénotype des souris <i>Syngap1</i> ^{+/-}	26
IV- 2. Le phénotype des souris Tg(Nkx2.1-Cre); <i>Syngap1</i> ^{flox/+}	26
IV – 3. Le phénotype des souris EMX1-Cre; <i>Syngap1</i> ^{flox/+}	27
IV – 4. Le phénotype des souris GAD2-Cre; <i>Syngap1</i> ^{flox/+}	28
Hypothèse et objectifs.....	29

Chapitre II: Haploinsufficiency of <i>Syngap1</i> in GABAergic cells induces mTOR hyperactivation and cognitive deficits.	30
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Material and methods.....	34
Results.....	37
Discussion.....	43
Acknowledgments.....	47
Figures.....	48
Chapitre III: Méthodes et résultats supplémentaires.....	57
Méthodes supplémentaires.....	58
Résultats supplémentaires.....	59
Figures supplémentaires.....	61
Chapitre IV : Discussion.....	64
Conclusion.....	69
Bibliographie.....	70

Liste des figures

Chapitre II

Figure 1. PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice prefrontal cortex display mTOR hyperactivation under basal conditions and after neuronal stimulation.....48

Figure 2. PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice basolateral amygdala display mTOR hyperactivation after neuronal stimulation.....49

Figure 3. Hippocampal PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice display mTOR hyperactivation under basal conditions.....50

Figure 4. MGE-specific *Syngap1* haploinsufficiency caused contextual fear conditioning deficits.....51

Figure 5. MGE-specific TSC1 knockout caused contextual fear conditioning deficits.....52

Figure 6. Lovastatin treatment did not rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice.....53

Figure 7. Lovastatin treatment did not reduce mTOR hyperactivation in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice.....54

Figure 8. PV+ interneuron specific Syngap1 haploinsufficiency did not cause contextual fear conditioning deficits.....55

Supplementary figure 1. Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice do not have memory encoding deficits.....56

Chapitre III

Figure supplémentaire 1. Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} ont un déficit de la mémoire de la peur contextuelle et induite par un son conditionné, une semaine après l'entraînement.....61

Figure supplémentaire 2. Les souris Syngap1^{+/-} ont un déficit de mémoire de la peur contextuelle uniquement lorsque le souvenir de peur induit par le contexte sont en compétition avec le souvenir de peur induit par le son.....62

Figure supplémentaire 3. Dans le cortex préfrontal des souris Syngap1^{+/-} adulte, mTOR n'est pas hyperactivé à l'état basal et après stimulation neuronale.....63

Liste des sigles

WISC IV: Échelle d'intelligence de Wechsler

WPPSI-R: Échelle d'intelligence de Wechsler préscolaire et primaire.

Q.I.: Quotient intellectuel

SFARI: Simon's Foundation Autism Research Initiative

Liste des abréviations

AMPA: α amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazoleprpionic acid

ARC: Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein

ARN: Acide Ribonucléique

ARX: Aristaless Related Homeobox

B-RAF: B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

CaMKII: Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II

CA1: Corne d'Ammon 1

CDK5: Cyclin-dependent kinase 5

EIF4F: eukaryotic initiation factor 4F

ERK: Extracellular Signal Regulated Kinase

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FMR1: Fragility Mental Retardation 1

GABA: Gamma Aminobutyric Acid

GAD1: Glutamate decarboxylase 1

GAD2: Glutamate decarboxylase 2

GAD65: Glutamate decarboxylase 65

GAD67: Glutamate decarboxylase 67

GAP: GTPase Activating protein

GDP: Guanosine Diphosphate

GEF: Guanine Exchange Factor

GTP: Guanosine Triphosphate

LIMK: LIM-domain protein Kinase

LTP: Long term potentiation

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

mEPSCs: miniature Excitatory Synaptic Currents

mIPSCs: miniature Inhibitory Synaptic Currents

MECP2: Mthyl CpG binding protein 2

MTOR: mammalian target of Rapamycin

NF-1: Neurofibromin-1
NMDA: N-Methyl-D-aspartic acid
PAK: p21 Activated Kinase
PH: Pleckstrin Homology
PSD-95: Post Synaptic Density 95
RAC1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF-1: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1
RAP1: Ras proximate-1
RAS: Rat Sarcoma
RHEB: Ras homolog enriched in brain
RIAM: Rap1-interacting adaptor molecule
SHANK3: SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3
SPAR: Spine-associated RapGAP
SYNGAP1: Synaptic Ras GTPase Activating Protein
S6K1/2: p70 ribosomal S6 protein kinase 1 and 2
TIAM1: T-Lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
UBE3A: Ubiquitin protein ligase E3A
UPD : Unique Parkin Domain
VIP: Vasointestinal peptide
4E-BP: eukaryotic initiation factor 4E-Binding protein
5-HT3aR: 5-hydroxytryptamine 3A receptor

À mes proches, mes collègues et Alexandre H. Marcellin.

Remerciements

À mes directeurs de recherches, Docteur Jacques Michaud et Docteur Graziella Di Cristo pour m'avoir accueilli et formé dans leurs laboratoires respectifs. Et à tous les membres des laboratoires du CHU Sainte-Justine.

Chapitre I : Introduction

I. La déficience intellectuelle

I - 1. Définition et diagnostique

La déficience intellectuelle est une condition qui affecte 1 à 3% de la population mondiale^{24,41}. La déficience intellectuelle est diagnostiquée en considérant trois critères: Les fonctions intellectuelles (capacité à raisonner, résoudre des problèmes, apprentissage académique et empirique), la capacité d'adaptation (capacité à vivre en autonomie, communication, capacité d'adaptation à de multiples environnements et situations)³. Les déficits doivent apparaître durant la période de développement cognitif donc avant l'âge de dix-huit ans.

En pratique, les capacités intellectuelles chez l'enfant sont évaluées grâce à une série de tests psychométriques et à l'échelle d'intelligence de Wechsler (WISC IV). Le WISC est utilisé pour les enfant âgés entre 6 et 16 ans. Pour les enfants plus jeunes, entre 2 ans et 11 mois et 6 ans une variante du WISC-IV, l'échelle d'intelligence de Wechsler préscolaire et primaire (WPPSI-R) est utilisée. Le WISC-IV est composé de cinq tests verbaux et cinq tests de performance. Les résultats obtenus aux différents tests sont additionnés afin d'obtenir le quotient intellectuel (QI). Par convention, le test est standardisé pour que la moyenne des scores d'un échantillon de la population est 100. Un individu peut potentiellement être diagnostiqué déficient intellectuel avec différents degrés d'atteinte (léger, modéré, sévère, profond) s'il obtient un résultat inférieur à 75³. Avec un score entre 75 et 55 la déficience est considérée légère, les individus ont des difficultés pour apprendre ou interagir socialement et une assistance personnelle est nécessaire pour certaines tâches quotidiennes. Si le QI est situé entre 55 et 40, la déficience intellectuelle est modérée, les difficultés d'apprentissages et d'interaction sociales sont plus prononcées. Si le score est de 40 à 25 la déficience intellectuelle est sévère, ce qui se traduit par un langage peu développé, et l'individu a du mal à saisir des concepts abstrait comme les nombres et le temps. Enfin, en dessous de 25, la déficience intellectuelle est profonde, l'individu s'exprime par une communication non-verbale et requièrent une assistance permanente.

Nous distinguons deux formes de déficience intellectuelle. La forme syndromique, qui se manifeste, en plus des déficits cognitifs, par la présence de signes morphologiques, métaboliques ou radiologiques. Les exemples de forme syndromique de la déficience intellectuelle les plus connus sont le syndrome de Down¹⁰⁵ et le syndrome de X Fragile⁹⁵. À l'inverse, dans le cas de forme non-syndromique, les incapacités cognitive et adaptative sont les seules manifestations cliniques de la maladie⁸³. Les estimations suggèrent que 30 à 50 % des personnes diagnostiquées présentent une déficience intellectuelle non-syndromique⁴¹.

I - 2. Les causes de la déficience intellectuelle

I - 2.1. Les causes environnementales

Il existe des cas de déficience intellectuelle acquise en raison de facteurs environnementaux survenant avant, pendant ou peu de temps après la naissance. Par exemple, les infections virales ou la consommation d'alcool pendant la grossesse^{82,118}, ainsi que l'hypoxie périnatale¹²⁵ peuvent causer des dommages irréversibles au cerveau qui sous-tendent des déficits cognitifs.

I - 2.2. Les causes génétiques

Les cas de déficience intellectuelle causés par des mutations génétiques sont fréquents, représentant jusqu'à 50% des cas connus²⁴. Certaines formes de déficience intellectuelle proviennent de mutations affectant le nombre de copies de gènes. Le nombre de copie du gène peut augmenter dans le cas de duplication ou diminuer s'il y a une délétion génétique. Le syndrome de Down est due à une duplication d'une partie ou de l'entièreté du chromosome 21¹⁰⁵ tandis que le Syndrome de Phelan-McDermid est causé par des micro-délétions au niveau du chromosome 22¹³⁵. La délétion d'une section du chromosome 15 peut mener à deux syndromes différents selon l'origine du chromosome. Si la délétion hétérozygote est localisée sur le chromosome 15 paternel, l'enfant aura le syndrome de Prader-Willi, tandis que si le chromosome délétère est d'origine maternelle, l'enfant développera le syndrome d'Angelman¹⁴. Le développement de nouvelles techniques permettant le séquençage précis du génome des patients a permis d'établir que même les mutations ponctuelles transmises ou spontanées (*de novo*), qui affecte peu de pair de bases, peuvent causer la déficience

intellectuelle. Le syndrome de X fragile, l'exemple de déficience intellectuelle syndromique le plus fréquent, est causé par une mutation ponctuelle du gène *FMR1* (*Fragility Mental Retardation 1*) situé sur le chromosome X¹¹. Il est intéressant de noter que de nombreux gènes présents sur le chromosome X et liés à la déficience intellectuelle à la suite de mutation ponctuelle¹⁴⁹, tel que *MECP2* (*methyl CpG binding protein 2*)^{131,26} ou *ARX* (*Aristaless Related Homeobox*)¹², affectent la morphologie et plasticité des synapses¹⁰¹. Ce constat n'est pas restreint aux gènes situés sur le chromosome X. Par exemple, le gène *UBE3A* (*Ubiquitin protein ligase E3A*) impliqué dans le syndrome de Angelman, et situé sur le chromosome 15, affecte le développement des synapses et l'activité synaptique en régulant le niveau d'expression d'ARC (*Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein*), une protéine qui induit l'internalisation des récepteurs AMPA (*α amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazoleprpionic acid*) à la membrane postsynaptique⁵⁹. De plus, une morphologie anormale des épines dendritiques est depuis longtemps associé à la déficience intellectuelle¹⁴⁵.

L'épilepsie et les troubles du spectre de l'autisme semblent également provenir de problèmes au niveau des synapses pointant un mécanisme commun pour ces conditions et souligne la nécessité de comprendre le fonctionnement des synapses. Notre gène d'intérêt *SYNGAP1* (*Synaptic Ras GTPase Activating Protein*), a émergé en tant que gène à risque pour la déficience intellectuelle⁶⁴, les troubles du spectre de l'autisme¹⁰ et l'épilepsie^{22,10}.

I - 3. Altérations synaptiques ou altérations durant le développement neuronal ?

L'hypothèse de dysfonctionnement de la synapse pour expliquer la déficience intellectuelle est attrayante puisque la plasticité synaptique est un phénomène corrélé avec l'apprentissage, ainsi des défauts de la synapse expliqueraient de manière directe pourquoi un individu n'est pas apte à apprendre. Cependant, il est pertinent de noter que la plupart des gènes mentionnés jusqu'à présent sont également impliqués dans la prolifération et différenciation des cellules souches neurales⁴⁸. Par exemple, *ARX* régule l'expansion des progéniteurs des cellules corticales³², *FMR1* régule la différenciation des cellules neuronales^{75,156}, *MECP2* maintient l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des neurones¹⁰⁹ et *UBE3A* régule la prolifération des précurseurs neuronaux¹²⁴. Ces gènes ne sont

pas des exceptions, dans la liste de 54 gènes fortement liés avec les maladies neurodéveloppementales fournis par SFARI (*Simon's Foundation Autism Research Initiative*), 70% d'entre eux ont un rôle dans la différenciation et prolifération des cellules souches neurales⁴⁸. Un second argument en faveur d'une hypothèse d'altération durant le développement neuronale est la relation entre les maladies neurodéveloppementales et le cancer²⁸, une maladie caractérisée par une croissance cellulaire anormale. Les auteurs ont suivi 8000 enfant avec des troubles du spectre de l'autisme et 20 cas ont développé un cancer. Ils précisent que ces résultats sont significativement plus élevés que le nombre total de cancers attendus avec un ratio standardisé²⁸. En effet, des mutations de régulateurs ou d'effecteurs des voies moléculaires *mTOR* (*mammalian target of Rapamycin*) et *RAS/MAPK* (*Rat sarcoma / Mitogen-Activated Protein Kinase*) sont impliqués dans le développement de cancer^{51,158} et la déficience intellectuelle^{61,52}. Donc, la déficience intellectuelle n'est pas causée par des dysfonctionnements de la synapse ou des défauts durant le développement mais probablement par une combinaison de ces deux facteurs. Pour notre gène d'intérêt *SYNGAP1*, les déficits répertoriés jusqu'à présent se concentre sur la structure et fonctionnement de la synapse. Néanmoins, l'expression précoce de *SYNGAP1* durant le développement et son activité sur *RAS* et *mTOR* que nous décrivons plus tard (II.3) indique qu'un effet de la perte de *SYNGAP1* sur le développement neuronal ne peut pas être exclu.

I - 4. Le gène *SYNGAP1*

I - 4.1. Domaines et isoformes du gènes *SYNGAP1*

Le gène *SYNGAP1* est situé sur le bras court du chromosome 6 chez l'humain. Le gène *SYNGAP1* encode pour des protéines de 134 à 143 kDa selon l'isoforme⁷⁶. Les isoformes *Syngap1* identifiés chez les souris^{25,110,119} sont produits grâce à la présence de multiples régions promotrices sur le gène et l'épissage alternatif de l'ARNm (*Acide Ribonucléique messenger*). Le point commun entre tous les isoformes est la présence des domaines Ras-GTPase et C2, permettant de potentialiser l'activité GTPase de *RAS* et *RAP*^{25,88,139} et de lier Ca^{2+} et des phospholipides. Des différences sont présentes aux 2 extrémités des protéines. Au terminal-N cytosolique, 2 isoformes (A et B) possède un domaine PH (*Pleckstrin homology*) et un UPD (*Unique Parkin Domain*)^{25,110}, tandis que *Syngap1* C est plus court puisqu'il ne

possède pas de UPD et un domaine PH incomplet. Le domaine PH semble permettre des interactions physiques entre SYNGAP1 et des phospholipides et son recrutement à la partie intracellulaire de la membrane plasmique. Le terminal-C est important pour les interactions entre SYNGAP1 et les autres protéines de la membrane postsynaptique. Le gène *Syngap1* possède deux terminaisons possibles au terminal-C: $\alpha 1$, qui est constitué d'un domaine de liaison PDZ, qui permet de lier PSD95, et $\alpha 2$, qui ne possède pas de domaine de liaison PDZ mais 48 acide aminés supplémentaires dus à un décalage d'une paire de base.

I - 4.2. Conséquences des mutations de SYNGAP1 chez l'humain

La première étude liant des mutations *de novo* dans *SYNGAP1* et la déficience intellectuelle non syndromique a procédé en cherchant des mutations *de novo* spécifiquement dans 197 gènes impliqués dans les fonctions synaptiques chez des patients atteints de déficience intellectuelle non syndromique⁶⁴. 3 patients sur 94 avaient une mutation tronquantes dans *SYNGAP1*⁶⁴. Des mutations faux-sens peuvent également être présentes dans le gène *SYNGAP1*¹⁰. Par la suite, une étude de l'impact fonctionnelle de ces mutations a permis d'identifier que *SYNGAP1* cause la déficience intellectuelle par un mécanisme d'haploinsuffisance¹⁰. L'haploinsuffisance signifie qu'une protéine doit être produite par les deux allèles pour que le phénotype soit normal, et donc, qu'une réduction de l'expression de la protéine de 50 % aboutit à un phénotype anormal. De nombreuses études avec des cohortes de patients différents ont lié *SYNGAP1* avec la déficience intellectuelle non-syndromique^{148,137,123}. Chez l'humain, les mutations *de novo* sévères de *SYNGAP1* amènent à l'émergence d'un phénotype défini de déficience intellectuelle, le MRD5 (OMIM #603384). Le MRD5 est caractérisé par une déficience intellectuelle modérée à sévère avec des crises épileptiques ainsi qu'un délai du développement psychomoteur détectable dans les premières années de la vie^{10,22,63,86,123}.

II. Le complexe postsynaptique

II - 1. Fonctionnement de la synapse glutamatergique

La transmission excitatrice dépend principalement des récepteurs NMDA (*N-Methyl-D-aspartic acid*) et AMPA. Ces deux récepteurs ont des propriétés distinctes : Le récepteur

NMDA a une cinétique d'activation lente car il nécessite d'être lié au glutamate et à un co-agoniste, la glycine. De plus, son canal est bloqué par un ion magnésium. Le récepteur AMPA a une cinétique rapide puisqu'il a besoin d'être lié seulement au glutamate pour s'ouvrir et permettre le flux d'ions potassique et sodique. Le glutamate libéré par le neurone présynaptique se lie aux récepteurs AMPA, l'influx d'ion sodique permet une dépolarisation de la membrane ce qui a pour effet de retirer l'ion magnésium qui bloque le canal du récepteur NMDA. Une fois activé, le récepteur NMDA permet une forte entrée postsynaptique de sodium et calcium. L'augmentation intracellulaire de calcium est essentielle à la transmission synaptique car il entraîne l'activation de seconds messagers et de cascades intracellulaires¹⁹⁵. Une des conséquences de l'entrée de calcium dans le neurone postsynaptique est l'insertion des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique¹⁶¹. L'insertion de récepteur AMPA additionnelle est requise pour l'induction de la LTP (*long term potentiation*), un processus cellulaire corrélé à l'apprentissage et à la mémoire qui renforce les connections au niveau des synapses et facilite la communication entre les neurones⁷².

II - 2. Le rôle de *Syngap1* durant le développement des circuits neuronaux.

Chez la souris, la transcription de *Syngap1* débute dès l'âge embryonnaire 8.5 (E8.5) dans le tube neural et les somites¹⁴². À E10.5, *Syngap1* est exprimé dans le prosencéphale, le mésencéphale et le télécéphale¹⁴². À E14.5, l'ARN de *Syngap1* est détectable dans le cortex, les ganglions de la base et le thalamus¹⁴². À 16.5, l'ARN de *Syngap1* est présent également dans l'hippocampe et l'hypothalamus¹⁴². L'expression de *Syngap1* augmente rapidement entre E16 et P1⁹². Après la naissance, *Syngap1* est exprimé dans le cortex, l'hippocampe, le striatum, l'amygdale et le thalamus avec un pic d'expression au début de la deuxième semaine postnatale (P14), suivis d'un déclin à l'âge adulte^{29,142}. Les souris homozygotes *Syngap1*^{-/-} meurent toutes durant la première semaine postnatale^{90,94,142,173}. Ce résultat souligne un rôle vital de *Syngap1* tôt durant le développement.

Pendant la mise en place des circuits neuronaux, les synapses sont pour la plupart silencieuses. Le compartiment postsynaptique de ces synapses ne possède que des récepteurs NMDA fonctionnels et il n'a pas de récepteur AMPA. Ainsi, la synapse ne transmet pas

d'information à un potentiel membranaire basal. Ce n'est que si la synapse est dépolarisée qu'il y a transmission de l'information. Au cours du développement, les synapses silencieuses deviennent synapses matures grâce à l'acquisition des récepteurs AMPA à la membrane. Chez les souris ce phénomène a lieu durant les deux premières semaines postnatales.

Des expériences *In vitro* de culture des neurones issus de souris *Syngap1*^{+/-}, *Syngap1*^{-/-} et *Syngap1*^{+/+} pendant la période de synaptogenèse, montrent qu'il y a une augmentation du nombre de récepteur AMPA à la membrane et une diminution du nombre de synapses silencieuses plus tôt durant le développement des neurones avec une mutation de *Syngap1*^{90,173}. Par conséquent, les épines des neurones issus des souris *Syngap1*^{-/-} sont plus larges plus tôt durant le développement¹⁷³. Ces observations ont été répétées *in vivo*, chez les souris *Syngap1*^{+/-} âgées de 2 semaines (P14)²⁹. En plus d'avoir une morphologie plus mature les épines dendritiques des souris *Syngap1*^{+/-} âgées de 2 semaines ont une relation entrée/sortie (*Input/Output = I/O*) similaire à celle des souris contrôles adultes²⁹, suggérant que les synapses sont plus matures. Cette augmentation de la transmission synaptique semble due à une augmentation de la réponse des récepteurs AMPA au glutamate²⁹. L'haploinsuffisance de *Syngap1* semble donc accéléré le développement des synapses glutamatergiques¹⁷³ et SYNGAP1 aurait pour fonction de ralentir le développement des synapses. En corrélation avec cette hypothèse, SYNGAP1 inhibe la croissance de l'axone en limitant l'activation de RAS¹⁶⁹. SYNGAP1 accélère également la maturation et stabilisation des épines dendritiques puisqu'en plus d'accélérer la formation des épines dendritiques, l'haploinsuffisance de *Syngap1* induit un élagage prématuré des épines dendritiques¹.

Des décalages de la période de remodelage des épines dendritiques peuvent avoir des conséquences sur la durée des périodes critiques. Une période critique est une fenêtre temporelle durant laquelle les circuits neuronaux qui sous-tendent une certaine modalité sont particulièrement sensibles aux expériences et démontrent une forte plasticité⁶⁸. Des altérations dans la structure et la fonction des épines dendritiques durant ces périodes critiques peut avoir un effet permanent sur les fonctions cognitives et sensorielles. Des expériences électrophysiologiques *in vitro* ont permis de développer une hypothèse très élégante pour comprendre comment *Syngap1* affecterait la durée de la période de plasticité. Les connections

entre le thalamus et le cortex permettent d'observer comment l'expérience sensorielle réorganise les circuits somatosensoriels². Chez des souris contrôles, la LTP au niveau des synapses thalamo-corticales est facile à induire à P5³⁸ mais ne peut pas être induite à P8³⁸. Ce phénomène est expliqué par le ratio AMPA/NMDA. Il semblerait qu'à P5 le ratio AMPA/NMDA est faible, la synapse est plus silencieuse et donc facile à potentialiser. En revanche, à P8, le ratio AMPA/NMDA est plus élevé, et la synapse est moins facile à potentialiser^{38,74}. Chez les souris *Syngap1*^{+/-} la LTP ne peut pas être induite à P5 ou à P8³⁰ car le ratio AMPA/NMDA était déjà élevé à partir de P4³⁰. La LTP est un processus cellulaire corrélé à l'apprentissage et présent lors des périodes critiques⁴⁹. Ainsi, il est possible qu'en diminuant la période durant laquelle la synapse est potentialisée, l'haploinsuffisance de *Syngap1* réduit la durée de la période critique, ce qui altère le développement cognitif et somatosensoriel. Dans la lignée de ces résultats, il a été montré que l'haploinsuffisance de *Syngap1* affecte le développement des cartes somatotopiques du cortex somatosensorielle⁷.

II - 3. Le rôle de SYNGAP1 à la synapse glutamatergique

II - 3.1. SYNGAP1, régulateur de RAS, RAP1 et de la quantité de récepteurs AMPA

Syngap1 est exprimé dans le cerveau de façon prédominante^{25,88} avec un niveau d'expression particulièrement élevé dans le cortex et l'hippocampe⁹⁴. La protéine SYNGAP1 représente 1 à 2 % des protéines de la densité post-synaptique et est colocalisé avec PSD-95 (*Post Synaptic Density 95*), un marqueur postsynaptique glutamatergique, et le récepteur NMDA²⁵. Le principal rôle de SYNGAP1 est de réguler le nombre de récepteur AMPA à la membrane^{90,94,152,173}. Cette régulation est très complexe car elle varie selon trois facteurs : la régulation de RAS et RAP1 (*Ras proximate-1*), les isoformes de SYNGAP1 impliqués et la phosphorylation de SYNGAP1.

Lorsque SYNGAP1 est actif il régule négativement RAS et RAP1^{25,139}. RAS et RAP1 sont des petites protéines G¹⁵⁸. Ces petites protéines sont actives si elles sont liées à la GTP (*Guanosine Triphosphate*) et inactive si elles sont liées à la GDP (*Guanosine Diphosphate*). L'hydrolyse GTP à GDP est accélérée par des protéine GAP (GTPase Activating protein) tel que SYNGAP1, NF-1 (*Neurofibromin-1*) ou p120 RasGAP^{25,180,187}. Pour contrebalancer,

l'échange d'un GDP lié à une protéine G pour un GTP est médié par les protéines GEF (*Guanine Exchange Factor*). L'activité des petites protéines G est régulée avec précision à la synapse car elles ont un rôle important pour les fonctions neuronales, notamment pour la plasticité synaptique¹³⁴. Les petites protéines G convertissent la signalisation extracellulaire en déclenchant des cascades de signalisation intracellulaires¹⁹⁰. Lors d'une LTP par exemple, l'activité importante des récepteurs NMDA active la protéine RAS. RAS permet l'activation de la voie MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular Signal Regulated kinase*) pour encourager l'insertion des récepteurs AMPA¹⁹⁰. RAP1 sous forme active est capable d'augmenter ou de diminuer le niveau d'activité de la voie ERK selon la voie qu'elle active : Si RAP1 se lie à RAF-1 (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1*) le complexe va diminuer l'activation de ERK¹⁸⁹. À l'inverse, si RAP1 recrute b-RAF (*b-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), le complexe va augmenter l'activation de ERK^{60,127}. Enfin, RAP1 peut aussi influencer le nombre de récepteur AMPA à la membrane en activant la voie p38 MAPK pour internaliser les récepteurs AMPA¹⁹⁰. En régulant les protéines G, RAS et RAP1, SYNGAP1 peut augmenter ou diminuer la quantité de récepteurs AMPA à la membrane. De plus, les différents isoformes de SYNGAP1 ont des effets différents sur la force synaptique. Les isoformes B et C avec une terminaison C $\alpha 2$ vont augmenter la force synaptique en encourageant l'insertion de récepteurs AMPA, tandis que les isoformes A ou avec une terminaison C $\alpha 1$ vont diminuer la force synaptique en internalisant les récepteurs AMPA¹¹⁹. Troisièmement, SYNGAP1 peut être phosphorylé par CaMKII (*Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II*) et CDK5 (*Cyclin-dependent kinase 5*)¹⁷⁴. Lorsque Syngap1 est phosphorylé par CaMKII l'activité Rap1 GTPase de Syngap1 est plus augmentée que l'activité Ras GTPase, ce qui favorise donc l'insertion des récepteurs AMPA. À l'inverse, lorsque Syngap1 est phosphorylé par CDK5, c'est l'activité Ras GTPase de SYNGAP1 qui est plus augmentée, ce qui encourage l'internalisation des récepteurs AMPA¹⁷⁴.

Il est difficile de présenter un modèle qui généralise le rôle de SYNGAP1 et qui peut être appliquée dans toutes les situations. Actuellement, le modèle en place provient principalement des observations électrophysiologiques et morphologiques chez les souris *Syngap1*^{+/-} : Après stimulation des récepteurs NMDA et l'entrée de calcium, CaMKII phosphoryle et inhibe SYNGAP1²⁵. La phosphorylation de SYNGAP1 provoque sa dispersion hors du site postsynaptique ce qui permet l'activation des protéines RAS et RAP1^{5,33}. Une

conséquence de l'activation de RAS est l'insertion de récepteur AMPA à la membrane⁵. Par ailleurs, chez les souris *Syngap1*^{+/-}, La voie de signalisation ERK/MAPK, régulé par RAS, est suractivé⁹⁴ et l'insertion des récepteurs AMPA est augmentée à l'état basal et après stimulation neuronale^{90,94,97,152,173}. Chez ces souris, nous remarquons également que l'induction de la LTP dans la région CA1 (*Corne d'Ammon 1*) de l'hippocampe est fortement réduite^{90,94} probablement à cause de l'excès de récepteur AMPA à la membrane à l'état basal.

II - 3.2. Influence de SYNGAP1 sur la morphologie des épines dendritiques

SYNGAP1 régule également la morphologie des épines dendritiques pendant les événements de plasticité synaptique²¹, possiblement par l'intermédiaire de RAS et RAP1. Lorsque RAP1 est dans sa forme active, elle peut activer LIMK (*LIM-domain protein Kinase*) qui phosphoryle la cofiline pour réorganiser les filaments d'actine^{114,184}. RAP1 influence également le lien entre les filaments d'actine qui constituent le cytosquelette synaptique et la matrice extracellulaire, en recrutant RIAM (*Rap1-interacting adaptor molecule*) et Talin¹⁰⁰ à la membrane postsynaptique. Le complexe Rap1-RIAM-Talin induit l'activation des intégrines^{18,112}, des récepteurs transmembranaires qui facilitent l'adhésion entre la cellule et la matrice extracellulaire⁵⁴. L'activation des intégrines permet le remodelage de l'épine dendritique¹⁰⁷. RAS participe également à la réorganisation du cytosquelette d'actine en recrutant TIAM 1 (*T-Lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1*) et RAC1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)¹⁶⁸. Le complexe RAS-TIAM-RAC1 active PAK (*p21 Activated Kinase*) qui enclenche le remodelage du cytosquelette d'actine⁶⁵ SYGAP1 régule la dynamique des filaments d'actines en augmentant la phosphorylation de la cofiline²¹. Les souris *Syngap1*^{+/-} ont un excès de large épines dendritiques²¹. Étonnamment, l'élargissement des épines dendritiques n'est pas forcément dû à une activité augmentée de RAP1, qui encourage la phosphorylation de la cofiline¹¹⁴ car l'inhibition de SPAR (*Spine-associated RapGAP*), une GAP qui régule uniquement RAP, induit le phénotype inverse, autrement dit des épines dendritiques plus minces¹³⁴. L'élargissement des épines serait attribué davantage à un niveau élevé de Ras-GTP qui augmenterait l'activité de RAC et PAK1²¹.

II - 3.3. SYNGAP1 régule la synthèse protéique.

SYNGAP1 régule la quantité de récepteur AMPA à la membrane et la force synaptique en limitant la synthèse protéique dépendante de mTOR¹⁷⁵. mTOR est considéré comme un régulateur de l'homéostasie de la cellule en régulant directement la synthèse protéique. mTOR peut augmenter ou diminuer le taux de traduction de l'ARN par l'intermédiaire de deux groupes de substrats de mTOR: S6K1/2 (*p70 ribosomal S6 protein kinase 1 and 2*) et 4E-BP (*eukaryotic initiation factor 4E-Binding protein*)^{50,113}. Lorsque S6K1/2 sont phosphorylés ils phosphorylent à leurs tours la protéine ribosomale S6 afin d'augmenter le taux de traduction de l'ARN⁵⁰. À un état basal d'activité et tant que mTOR est inactif, 4E-BP est liée à eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*). eIF4E est un membre du complexe eIF4F (*eukaryotic initiation factor 4F*), qui initie la traduction de l'ARN. Sans eIF4E la traduction ne peut pas être initiée. La phosphorylation de 4E-BP par mTOR induit le détachement de eIF4E. eIF4E est recruté par le complexe eIF4F et la traduction est initiée. mTOR régule la synthèse de protéines essentielles pour la plasticité synaptique tel que CaMKII et des sous-unités des récepteurs NMDA et AMPA^{37,154}. Des études in vitro et chez les souris ont permis de développer un modèle où SYNGAP1, en diminuant l'activité de ERK, réduit l'activité de Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), un activateur de mTOR, ce qui diminue l'activité de mTOR, limitant ainsi la synthèse protéique et l'insertion de récepteur AMPA à la membrane postsynaptique¹⁷⁵. Dans la lignée de ces résultats, dans le préfrontal cortex des jeunes souris (P4) *Syngap1*^{+/-} le taux d'expression de pS6, un marqueur d'activité de mTOR, est augmenté ce qui suggère une hyperactivité de mTOR¹.

Au final, SYNGAP1 semble ralentir la croissance des synapses glutamatergiques et réguler la quantité de récepteur AMPA à la membrane postsynaptique afin d'éviter un excès d'excitabilité. Il est donc pertinent de savoir comment SYNGAP1 affecte la circuiterie inhibitrice.

III. Les interneurones GABAergiques

III - 1. L'origine des interneurones GABAergiques

GABA (*Gamma Aminobutyric Acid*) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Les interneurones GABAergiques représente 20 % de la population totale de cellules du cortex cérébral et sont capable de synthétiser GABA grâce aux enzymes

GAD65 et GAD67 (*Glutamate decarboxylase 65 et 67*), codées respectivement par *GAD2* et *GAD1*. Les interneurons GABAergiques peuvent être classifiés en de nombreuses sous-familles en raison de leur hétérogénéité car les interneurons GABAergiques possèdent différents origines, morphologies, marqueurs, cibles et propriétés électrophysiologiques. Chez la souris, les progéniteurs des cellules GABAergiques commencent à proliférer au jour embryonnaire 12.5 (E12.5) et proviennent du sous-pallium. Les interneurons GABAergiques proviennent de quatre régions : Les éminences ganglionnaires caudale, médiale et latérale ainsi que l'aire préoptique.

III - 1.1. L'aire préoptique

L'aire préoptique produit 5 à 10 % des interneurons qui migreront vers les aires corticales⁵³. Ce sont des interneurons qui exprime le peptide NPY⁵³.

III - 1.2. L'éminence ganglionnaire caudale

L'éminence ganglionnaire caudale produit les interneurons locaux du striatum et des neurones qui vont migrer vers le cortex, l'hippocampe, l'amygdale et d'autres noyaux du système limbique¹⁴⁴. Les sous-types d'interneurons provenant de cette éminence sont les VIP (vasointestinal peptide) interneurons, aussi appelés neurones bipolaires, les cellules neurogliaformes et des interneurons corticaux exprimant 5-HT_{3a}R (*5-hydroxytryptamine 3A receptor*)⁸⁵.

III - 1.3. L'éminence ganglionnaire latérale

L'éminence ganglionnaire latérale produit les cellules granulaires, des interneurons qui projeteront vers le striatum ou qui migreront vers le bulbe olfactif^{85,99}.

III - 1.4. L'éminence ganglionnaire médiale

L'éminence ganglionnaire médiale produit 60% des interneurons GABAergiques¹⁷¹. Ces interneurons peuvent être locaux et projeter vers le globus pallidus, l'amygdale, le septum ou ils peuvent migrer pour former les populations d'interneurons du cortex, striatum ou de l'hippocampe¹⁸³. Les sous-types d'interneurons provenant de cette éminence sont les

interneurones exprimant la parvalbumine, tel que les cellules chandeliers ou les cellules à panier ou les interneurones exprimant la somatostatine, tel que les cellules Martinotti⁸⁵.

III - 2. La diversité des interneurones GABAergiques

Ensemble, les interneurones exprimant la parvalbumine, la somatostatine ou le récepteur 5-HT3a représentent la quasi-totalité des neurones GABAergiques corticaux¹⁷¹.

III - 2.1. Les interneurones exprimant la parvalbumine

Les interneurones exprimant la parvalbumine sont les interneurones les plus communs. Ils sont caractérisés par leur capacité à générer des trains de potentiels d'actions à haute fréquence¹¹⁷. Le premier sous-type d'interneurones exprimant la parvalbumine, les cellules à panier, innervent les cellules excitatrices et d'autres interneurones exprimant la parvalbumine au niveau du soma et des dendrites proximale^{77,177}. Les cellules à panier sont également connectées entre elles par des jonctions gap⁵⁵. Ces connections électriques leurs permet de coordonner leurs patrons d'activité⁵⁵. Le second sous-type d'interneurones exprimant la parvalbumine, les cellules chandeliers, produisent également des trains de potentiels d'actions à haute fréquence mais moins rapidement que les cellules à paniers. La différence majeure entre ces deux sous-types est que les cellules chandeliers ciblent les axones des cellules excitatrices¹⁶⁰. Cette position stratégique permet d'exercer un fort contrôle sur l'initiation des potentiels d'actions¹¹⁷.

III - 2.2. Les interneurones exprimant la somatostatine

Les interneurones exprimant la somatostatine sont également classifiés en deux sous-catégories : les cellules Martinotti et les cellules Non-Martinotti. Les deux sous-types ciblent les dendrites pour y exercer une inhibition locale⁸⁴. Les cellules de Martinotti font des connections avec les interneurones exprimant la parvalbumine ou VIP⁷⁷ et sont électriquement connectés entre elles⁶⁹. La principale différence entre les deux sous-types est que les cellules Martinotti ont une forte résistance tandis que les cellules Non-Martinotti ont une faible résistance, donc les cellules de Martinotti ont besoin de courant plus fort pour être dépolarisées.

III - 2.3. Les interneurones exprimant le récepteur 5-HT3a

Les neurones 5HT3a peuvent être classifiés en deux groupes : Les interneurones qui expriment VIP et ceux qui n'expriment pas VIP. Les interneurones VIP sont majoritairement des cellules bipolaires¹⁹. Ces interneurones ciblent les somas et dendrites des interneurones exprimant la somatostatine ou la parvalbumine, créant ainsi des circuits de désinhibition^{77,140}. Les neurones non-VIP sont en majorités des cellules neurogliaformes. Ces interneurones ont une forte probabilité de former des connections sur les dendrites de leurs cellules voisines qu'elles soient excitatrices ou inhibitrices⁸⁴. Les cellules neurogliaformes induit des réponses synaptiques lentes des récepteurs GABAa et GABAb¹⁶⁴.

III - 3. Les fonctions des neurones GABAergiques

Les interneurones GABAergiques permettent une activité neuronale saine en contrebalançant l'excitation. Il existe différents microcircuits qui permettent au interneurones GABAergiques de moduler l'excitation : l'inhibition *feedforward*, l'inhibition *feedback latérale* ou *feedback récurrent* et la désinhibition.

III - 3.1. L'inhibition *feedforward*

L'inhibition *feedforward* est souvent représentée par un circuit disynaptique ou une afférence excitatrice contacte à la fois un neurone principale excitateur et un interneurone qui est lui aussi connecté à la cellule excitatrice ciblée par l'afférence. L'inhibition *feedforward* abaisse le niveau d'excitation de la cellule cible. Grâce à l'activité inhibitrice, si l'excitation produite par l'afférence n'est pas suffisamment soutenue, la cellule cible ne génère pas de potentiels d'action. Ainsi, les interneurones ont un contrôle temporel de l'excitation.

III - 3.2. L'inhibition *feedback* récurrente ou latérale

L'inhibition *feedback* récurrente, le circuit est fermé, composé d'une cellule excitatrice connectée à un interneurone dont les efférences contactent la même cellule excitatrice. Cette inhibition récurrente contrôle l'équilibre excitateur-inhibiteur de la population locale de neurones excitateurs et produit un patron d'activité différent de l'inhibition *feedforward*¹⁷¹. Si

le neurone inhibiteur excité fait des connections avec d'autres neurones excitateurs que celui qui l'a excité nous parlons d'inhibition *feedback* latérale. Ce processus permet de mettre en avant l'activité de certaines populations de cellules excitatrices par rapport à d'autres et confère aux interneurons la capacité de contrôler l'excitation à travers l'espace.

III - 3.3. La désinhibition

Les connections d'interneurones inhibiteurs sur un second groupe d'interneurones inhibiteurs leur permet de diminuer l'inhibition produit par le second groupe d'interneurones inhibiteurs. Le but de cette désinhibition est d'augmenter l'activité des cellules excitatrices cibles du second groupe d'interneurone. Ainsi, la désinhibition ajoute une nouvelle strate de régulation par les interneurons GABAergiques sur les neurones excitateurs et permet à la fois un contrôle spatial et temporel de l'excitation.

III - 3.4. La génération d'oscillation

Grâce à ces microcircuits et au couplage électrique entre interneurons, les neurones GABAergiques orchestrent les populations de neurones excitateurs dans l'espace et le temps¹⁵. La synchronisation des neurones pyramidaux permet l'émergence d'oscillations électriques associées aux fonctions cérébrales du comportement et de la cognition¹⁵. Les oscillations corticales sont classifiées selon leurs fréquences : delta (0.5 – 4 Hz), thêta (4 – 8 Hz), alpha (8 – 12 Hz), beta (12 - 30 Hz) et gamma (>30Hz)¹⁵. L'activation synchronisée des neurones PV+ est suffisante pour générer les oscillations gamma^{15,20}. Les oscillations gamma sont impliqués dans les processus d'attention et de mémoire de travail⁷¹. Les déficits d'attention et cognitifs en schizophrénie semblent provenir de dysfonctionnement des interneurons PV+ et des oscillations gamma^{23,116,120}. Cet exemple souligne la pertinence de comprendre l'implication des interneurons GABAergiques dans les troubles cognitifs.

III - 4. Les conséquences d'une réduction de *Syngap1* dans les neurones GABAergiques

Syngap1 est également exprimé dans les neurones GABAergiques^{127,188}. Et la perte de *Syngap1* dans les interneurons GABAergiques affectent leurs fonctionnalités.

Les interneurons exprimant la parvalbumine des souris *Syngap1*^{+/-} adulte ont une réduction de l'amplitude et de la fréquence de décharges des mEPSCs¹³³. De plus, ils forment moins de boutons périsonomatiques autour des cellules excitatrices⁹. Les souris *Syngap1*^{+/-} ont une diminution de l'amplitude des mIPSCs (miniature Inhibitory Synaptic Currents) dans le cortex préfrontal, cependant leurs fréquences ne sont pas diminuées¹³³. Ni la fréquence, ni l'amplitude des mIPSCs n'est diminué dans les couches 2 et 3 cortex somatosensoriel et la région CA1 de l'hippocampe⁹. Les neurones exprimant la somatostatine chez les souris *Syngap1*^{+/-} adulte ne présentait pas de déficit particulier excepter une durée des potentiels d'actions qui durent plus longtemps¹³³.

Afin d'observer l'effet d'une haploinsuffisance de *Syngap1* dans les neurones GABAergiques, nous avons généré une lignée de souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+}, qui ont une perte de *Syngap1* spécifiquement dans les neurones GABAergiques exprimant la somatostatine ou la parvalbumine. Comme ce qui a été trouvé chez les souris *Syngap1*^{+/-}, chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} adulte, les interneurons exprimant la parvalbumine forment moins de boutons autour des somas des cellules excitatrices. Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} ont des altérations de la signalisation GABAergique plus prononcées puisque, dans les couches 2-3 du cortex somatosensoriel et la région CA1 de l'hippocampe la fréquence des mIPSCs est diminuée⁹. Et l'activité synaptique inhibitrice sur les cellules pyramidales, dans le cortex somatosensoriel, est diminuée. Enfin, les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} ont des oscillations gamma moins puissantes que les souris contrôles⁹.

IV. Les phénotypes comportementaux induit par les mutations de *Syngap1*

IV - 1. Le phénotype des souris *Syngap1*^{+/-}

Chez les souris *Syngap1*^{+/-}, l'apprentissage pour la tâche du labyrinthe aquatique de Morris est aussi rapide que souris contrôle⁹⁴, mais lorsque la plateforme est enlevée pour tester la mémoire spatiale des souris, un déficit de la mémoire des souris *Syngap1*^{+/-} a été détecté. Ces résultats sont à nuancer car les expérimentateurs ont mesuré le temps passé sur la position hypothétique de la plate-forme et non le temps passé dans quadrant de la piscine qui contenait la plate-forme, un indicateur beaucoup plus fort d'un déficit de mémoire spatiale et utilisé

dans la plupart des études^{73,122}. La tâche d'apprentissage du labyrinthe aquatique de Morris a été répétée par un autre groupe de recherche¹²⁸ et montrait un faible déficit de la mémoire spatiale seulement pendant les premières 15 secondes du test¹²⁸. Lors du test du labyrinthe élevé en forme de plus, utilisé pour mesurer l'anxiété, les souris *Syngap1*^{+/-} passaient plus de temps dans le bras ouvert, ce qui est interprété comme un niveau d'anxiété plus faible^{9,128}. L'activité locomotrice des souris *Syngap1*^{+/-} fut évalué grâce au test de terrain ouvert (open field) et révéla une hyperactivité locomotrice de souris *Syngap1*^{+/-}^{9,62,128}. La mémoire référentielle et la mémoire de travail furent testées dans le labyrinthe à multiples bras. La performance des souris *Syngap1*^{+/-} ne s'améliorait pas au fil des essais à l'inverse des souris contrôles et les erreurs à répétitions des souris *Syngap1*^{+/-} indiquent un déficit des mémoires spatiale^{62,128} et référentielle¹²⁸. Des déficits de la mémoire de travail étaient également mise en avant avec le test d'alternation spontanée dans le labyrinthe T^{9,128}. Les souris *Syngap1*^{+/-} montrait également des signes d'activités stéréotypées⁶². Les souris *Syngap1*^{+/-} avaient également des déficits sociaux^{9,62}. L'évaluation du comportement social est réalisée en deux temps. Premièrement, nous évaluons si la souris préfère passer son temps avec une souris inconnu ou un objet. Deuxièmement, nous évaluons si la souris préfère passer son temps à proximité d'une souris inconnu ou d'une souris dont elle est familière. Le test de conditionnements de la peur induit par le contexte ou par un son conditionné ont révélé que la mémoire contextuelle à long-terme est intact alors que les souris *Syngap1*^{+/-} avaient des déficits de la mémoire induite par le son⁶². Cependant, la méthode du test de la peur induite par le son laisse à désirer car le son fut présenté pendant 3 min consécutives. Pour la plupart des tests de peur induite par un son conditionné, la présentation des sons est répétée plusieurs fois avec des périodes de repos intercalées entre les phase présentation du son⁷³. Enfin, les souris *Syngap1*^{+/-} ont été soumises à un test de conditionnement de la peur contextuelle léger (2 choc électrique à 0.4 mA). 30 jours après, les souris *Syngap1*^{+/-} avait un déficit de la mémoire contextuelle par rapport aux souris contrôles¹³³.

IV - 2. Le phénotype des souris *Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1*^{flox/+}

Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} ont une haploinsuffisance de *Syngap1* dans les neurones originaires de l'éminence ganglionnaire médiale, les neurones GABAergiques exprimant la parvalbumine ou la somatostatine⁹. Nkx2.1 est exprimé à partir de E10.5¹⁸³ chez les souris, ce qui implique une perte prénatale du gène *Syngap1*. Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} ont un phénotype différent que celui des souris *Syngap1*^{+/-}. Par exemple, l'activité locomotrice des souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} était normale et elles ne présentaient pas un niveau d'anxiété plus faible que les souris contrôles⁹. En revanche, les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} avaient des déficits sociaux et de la mémoire de travail⁹ similaires aux souris *Syngap1*^{+/-}.

IV - 3. Le phénotype des souris EMX1-Cre; *Syngap1*^{fllox/+}

Les souris EMX1-Cre; *Syngap1*^{fllox/+}, ont une perte de *Syngap1* dans les neurones qui proviennent de la lignée EMX1, ce qui concerne les neurones glutamatergiques du néocortex et de l'hippocampe⁵⁸. EMX1 est exprimé à partir de E9.5 chez les souris⁵⁸. Ces souris présentent un phénotype très similaire à celui des souris *Syngap1*^{+/-}. Par exemple, les souris EMX1-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} étaient hyperactives, avaient un niveau d'anxiété plus faible et un déficit de la mémoire de travail lors du test d'alternation spontanée dans le labyrinthe T¹³³ ainsi que des déficits de la mémoire contextuelle long-terme¹³³.

IV - 4. Le phénotype des souris GAD2-Cre; *Syngap1*^{fllox/+}

Des souris avec une haploinsuffisance de *Syngap1* dans tous les sous-types de neurones GABAergiques à partir de E12.5¹⁶⁶ furent générées : Les souris Gad2-Cre; *Syngap1*^{fllox/+}. Étonnamment, ces souris ne présentaient pas de déficits de la mémoire de travail et de la mémoire contextuelle et avaient des niveaux d'anxiété et d'activité réguliers¹³³.

Hypothèse et objectifs

La déficience intellectuelle est un handicap fréquent chez l'enfant et est caractérisée par des déficits cognitifs. Les mutations *de novo* sont reconnus comme étant une cause d'une large fraction des cas de déficience intellectuelle. Notamment, des mutations *de novo* sur le gène *Syngap1* ont été reporté dans de nombreuses études génétiques incluant des patients atteints de déficience intellectuelle non-syndromique. Les mutations de *Syngap1* causent la déficience intellectuelle par un mécanisme d'haploinsuffisance.

De nombreux groupes ont été étudié l'effet de l'haploinsuffisance de *Syngap1* chez les souris. Ainsi, nous avons appris que *Syngap1* code pour une protéine activatrice de GTPase situé au niveau de la synapse glutamatergique. SYNGAP1 régule la maturation et la structure des synapses glutamatergiques, ainsi que la plasticité synaptique. L'haploinsuffisance de *Syngap1* chez les souris cause des déficits cognitifs. Notre laboratoire a récemment montré que l'haploinsuffisance de *Syngap1* affectait également la circuiterie GABAergique. L'haploinsuffisance de *Syngap1* dans les neurones GABAergiques provenant de l'éminence ganglionnaire médiale réduit le nombre d'innervations périsonmatiques formées par les cellules à panier et l'activité synaptique inhibitrice. De plus, l'haploinsuffisance de *Syngap1* restreinte aux neurones GABAergiques provenant de l'éminence ganglionnaire médiale était suffisante pour induire des déficits cognitifs.

Les mécanismes moléculaires liant l'haploinsuffisance de *Syngap1* aux déficits GABAergiques et cognitifs restent inconnus. Dans les neurones glutamatergiques, SYNGAP1 régule négativement l'activité de mTOR. Donc, notre hypothèse était que dans les neurones GABAergiques, l'haploinsuffisance de *Syngap1* cause l'hyperactivation de mTOR, induisant des déficits cognitifs.

Les objectifs de mes travaux de maitrise étaient : 1. Examiner si l'haploinsuffisance de *Syngap1* cause l'hyperactivation de mTOR. 2. Caractériser le phénotype des souris lors du conditionnement de la peur contextuelle et 3. Déterminer si des traitements qui inhibent RAS, peuvent réduire l'hyperactivation de mTOR et corriger les déficits cognitifs.

Chapitre II:

Haploinsufficiency of *Syngap1* in GABAergic cells induces mTOR hyperactivation and cognitive deficits.

Théo Badra^{1,2}, Bidisha Chattopadhyaya^{1,2}, Justine Fortin-Houde¹, Graziella Di Cristo^{1,2} and Jacques L. Michaud^{2,3}

¹Department of Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

²CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada

³Department of Pediatrics, Université de Montréal, QC, Canada

Abstract

Mutations of the *SYNGAP1* gene, which codes for a Ras GTPase-activating protein, are linked to intellectual disability in human. Cognitive deficits in mice models are in part due to SYNGAP1 reduction in GABAergic circuitry. *Syngap1* haploinsufficiency in GABAergic cells derived from the medial ganglionic eminence (Tg(Nkx2.1-Cre; *Syngap1*^{flox/+} mice) reduces the number of perisomatic innervations formed by parvalbumin-positive basket cells, impairs GABAergic connectivity and reduces inhibitory synaptic activity. The molecular mechanisms linking *Syngap1* alterations to GABAergic and cognitive deficits remain unknown. Here, we demonstrate that mTOR is hyperactivated in parvalbumin-positive neurons in the prefrontal cortex and the basolateral amygdala, under basal conditions and after fear training, in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. Furthermore, we show that 2 different mouse models exhibiting mTOR hyperactivation in parvalbumin-positive neurons have contextual fear memory deficits. Further, treatment with the RAS inhibitor Lovastatin failed to rescue mTOR signaling hyperactivation and contextual fear memory deficits in young adult Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. Finally, we show that inducing *Syngap1* haploinsufficiency specifically in parvalbumin-positive interneurons after the second postnatal week does not cause fear memory deficits, thus suggesting that cognitive problems in adult mice may be due to alterations occurring during early brain development. Our results point to mTOR pathway as a signaling mechanism potentially linking *Syngap1* haploinsufficiency and GABAergic deficits. In addition, our data suggest that treatment in the early postnatal period might be more effective to treat molecular and cognitive deficits caused by *Syngap1* mutations.

Introduction

Intellectual disability (ID) is an handicap defined by cognitive impairments and lack of adaptive functions, reaching a prevalence of 1 to 3% worldwide²⁴. While mutations leading to ID are heterogenous⁴⁷, ranging from mutations of a few pair bases as in *de novo* mutations^{64,163} or chromosomal abnormalities. A common observation is that several genes linked with ID code for proteins located at the synapse⁶³ and implicated in synapse functions^{34,40,44,115,167}.

de novo mutations in the *Syngap1* gene, coding for a GTPase-activating protein, cause moderate to severe ID by inducing *Syngap1* haploinsufficiency^{10,63,64}. SYNGAP1 plays an essential role at the synapse. In fact, mouse models bearing *Syngap1* mutations show several synaptic molecular, electrophysiological alterations and behavioral deficits. For instance, in excitatory neurons, monoallelic mutations in *Syngap1* induce ERK/MAPK hyperactivation under basal conditions and after NMDA receptor activation^{94,175}. mTOR pathway is also hyperactivated leading to excessive protein synthesis⁹⁰ and excessive AMPA receptor insertion at the postsynaptic membrane^{152,175}. Impaired LTP induction is also observed in *Syngap1*^{+/-} mice^{90,94} probably due to abnormal AMPA receptor trafficking. Behaviorally, *Syngap1*^{+/-} mice show spatial learning and memory deficits⁹⁴ as well as several behavioral alterations like hyperactivity, reduced anxiety, social and cognitive deficits^{62,128}.

While most studies aimed at understanding the effects of mutations causing ID have focused principally on glutamatergic synapses⁶³, both glutamatergic and GABAergic neurons functions are affected in ID^{8,39,42}. Thanks to their ability to generate temporal synchrony and oscillations among networks of pyramidal neurons^{16,141}, GABAergic neurons are important for complex cognitive functions such as memory^{36,141,181}, learning⁶⁸, and attention⁸⁷. For instance, fear learning and memory in mice rely on the precise timing of inhibition and disinhibition of specific microcircuits to form memory assemblies^{36,70,103,136,181}.

We have previously showed that *Syngap1* plays a role in the establishment of GABAergic connectivity⁹. *Syngap1* reduction specifically in GABAergic cells derived from the medial ganglionic eminence (in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice) caused cognitive deficits *in vivo*⁹. The molecular mechanisms linking *Syngap1* alterations to GABAergic and cognitive deficits remain unknown. A recent study suggests that *Syngap1* may be a negative modulator

of mTOR function¹⁷⁵. Since mTOR signaling regulates GABAergic neuron genesis, growth and synaptic transmission^{80,179}, we hypothesize that *Syngap1* haploinsufficiency causes mTOR hyperactivation in GABAergic neurons.

An important question to be answered is if it is possible to normalize molecular and behavioral deficiencies caused by ID-mutations by treating the adult brain. Few studies, using lovastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase able to reduce RAS activation^{91,121}, have been able to reduce activation of the ERK pathway^{132, 104}, rescue LTP and cognitive deficits^{111, 104}, and prevent epileptogenesis¹³² in adult mouse models of Fragile X syndrome, Neurofibromatosis and Noonan Syndrome. Since *Syngap1* haploinsufficiency causes RAS hyperactivation, we asked whether lovastatin treatment could rescue cognitive phenotype in adult Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice.

Here, we demonstrate that mTOR is hyperactivated in parvalbumin-positive (PV+) GABAergic neurons in the prefrontal cortex under basal conditions and after fear conditioning learning in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. Furthermore, we show that 2 mouse models exhibiting mTOR hyperactivation in PV+ neurons (Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} and Tg(Nkx2.1-Cre); *Tsc1*^{flox/flox} mice) had contextual fear memory deficits. Conversely, Tg(PV-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, where the onset of *Syngap1* haploinsufficiency is postnatal, showed no deficits in contextual fear memory. Finally, lovastatin treatment failed to restore regular mTOR signaling and contextual fear memory in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, suggesting that early treatments are most likely needed.

Material and methods

Mice. All procedures described here had been approved by the Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) of the Research Center of Sainte-Justine Hospital in accordance with the principles published in the Canadian Council on Animal Care protocol. *Syngap1*^{fllox/fllox} mice were a gift from Drs. Irene Knuesel (Roche Innovation Center Basel, Switzerland) and Mary Muhia (Center for molecular neurogenetics Hamburg, Germany) and were used in a previous study⁹. They were maintained as a heterozygous line onto a C57BL/6 background. Mice with *loxP* sites flanking exon 17 and 18 of *Tsc1* gene (*Tsc1*^{fllox/fllox}) (Jackson Laboratories #005680) were bred with wild type mice of Sv129 background to generate *Tsc1*^{fllox/+} mice. *Syngap1*^{fllox/fllox} mice, *TSC1*^{fllox/+} and *TSC1*^{fllox/fllox} mice were crossed with a mouse line bearing a transgene encoding the enzyme Cre recombinase under the control of the *Nkx2.1* promoter (Jackson Laboratory #008661). This promoter drives the expression of the Cre protein in GABAergic interneurons derived from the MGE starting at embryonic day 10.5¹⁸³. *Syngap1*^{fllox/fllox} mice were also crossed with mice expressing Cre under the parvalbumin promoter (Pv-Cre). This promoter drives the expression of the Cre protein in GABAergic interneurons expressing parvalbumin, starting from postnatal day 12-14 (P12-P14)¹⁶⁶. The resulting animals were referred to as Tg(*Nkx2.1*-Cre); *Syngap1*^{fllox/+}, Tg(*Nkx2.1*-Cre)^{+/-}; *TSC1*^{fllox/+}, Tg(*Nkx2.1*-Cre)^{+/-}; *TSC1*^{fllox/fllox} and PV-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} mice. All animals were kept under a light-dark cycle (12 h light-12 h dark) in a humidity and temperature controlled room. Food and water were available *ad libitum*. For all experiments, the observer was blind to the mouse genotype.

Immunohistochemistry, confocal imaging and pS6 cytoplasmic intensity analysis. Mice (2 to 3 months old) were anesthetized with intra-peritoneal ketamine injection (0.06 mL) and perfused with saline solution and PFA 4% in PB 0.1M, pH 7.2. Brains were post-fixed for 24 h in PFA/PB 4% and cryoprotected for 48 h in 30% sucrose in PBS. Brains were frozen in OCT (Leica Biosystems; 3801480) and 40 µm coronal sections were cut with a cryostat (Leica CM3050). Sections with the desired regions (prelimbic cortex, CA1, basolateral amygdala) were incubated in a blocking solution (10% NGS (Life Technologies, #50062Z) and 1% Triton) for 1 h 30 min at room temperature, followed by a primary antibody solution (5%

NGS, 0.1% Triton in PBS) containing the following primary antibodies: rabbit anti-phospho-S6 (1:1000, Cell Signaling #5364) and mouse anti-PV (1:1000, Swant #235) for 2 h at room temperature and 24 h at 4 °C. Then, sections were incubated in secondary antibody solution (5% NGS, 0.1% Triton in PBS). Secondary antibodies were the following: goat anti-rabbit Alexa 488 (1:400, Life Technologies #A11008) and goat anti-mouse Alexa 555 (1:1000, Cell Signaling #4409S). After washing in PBS, slices were mounted in Vectashield mounting medium (Vector). Confocal images were taken using a 63X glycerol objective (Leica NA 1.3) with SP8 or SPE Leica confocal microscope. Scans for each channel were acquired for every stack separately then merged. For each animal, 3 coronal sections were imaged for each region (prelimbic cortex, CA1, basolateral amygdala) for a total of about 30 PV+ neurons per animal per region. Stacks were acquired with 1 μ m steps, exported as TIFF files and analyzed with ImageJ software. For each section, first pS6 mean fluorescence intensity levels were measured in the cytoplasm of PV+ neurons and surrounding PV- neurons. For each PV+ neuron, pS6 fluorescence intensity of 4 PV- neurons was measured on the same focal plan. To normalize the pS6 expression data, mean pS6 fluorescence intensity in PV+ neurons and PV- neurons were calculated for each animal, and then, divided by the mean pS6 intensity levels in PV- neurons of control mice (*Syngap1*^{flox/+}). For experiments involving measurement of pS6 fluorescence intensity level after fear conditioning, mice were perfused 20 min after the end of the training for contextual fear conditioning (described below in contextual fear conditioning section), corresponding to the peak of pS6 expression^{138,153}.

Drug Treatment. Lovastatin solution was prepared by incorporating lovastatin (Sigma-Aldrich, L0790000) in Kolliphor[®] HS 15 (Sigma-Aldrich, #42966). Lovastatin-Kolliphor[®] HS 15 mixture was triturated and sodium phosphate buffer (0.01M, pH 7.4) was added gradually to help dissolve the mixture. Kolliphor should account for 30% of the final volume. Volumes were determined in accordance with Scheller et al. 2014. Vehicle solution was 30% Kolliphor[®] HS 15 dissolve in sodium phosphate buffer (0.01M, pH 7.4). Sub-cutaneous injection of 0.1 mL of lovastatin solution (20 mg/kg/day of lovastatin) was administered daily for 6 days. For experiments concerning pS6 fluorescence intensity level, mice were perfused

on the last day 6 hours after the injection. For behavioral experiments, mice were treated for 6 days, starting 3 days prior to contextual fear conditioning protocol (see below).

Behavioral studies. Mice used for behavioral studies were 2 to 3 months old. Room lights were kept low during behavioral experiments. Both sexes were used for all experiments except contextual fear conditioning after lovastatin treatment for which only male mice were used.

Contextual fear conditioning. Habituation. On the first day, mice were placed in the conditioning chamber, allowed to explore for 3 min without shocks before being returned to their homecage. *Training.* Mice were placed in the conditioning chamber. After 2 min, mice received a foot shock (US1, 2 s, 0.5 mA). US2 was received at 3 min 20 and US3 was received at 4 min 30. Then mice remained in the chamber for 60 s before being returned to their homecage. *Testing.* Memory was tested 1 h, 24 h, or 7 days after training. Mice were placed in the training context and freezing time was recorded for 5 min. Freezing behavior during testing testifies of a learned association between shocks and context. Freezing score was manually generated by an observer blind to the mice genotype and treatment

Hot Plate. Mice were habituated to the hot plate by placing each mouse on the plate for 30 s. The surface of the plate was cleaned with 70% ethanol between each mouse. The plate was heated up to 52 °C for testing. Mice were then placed on the hot plate. Latency to show a nociceptive response, either to licking or lifting one of the hind paws or jumping was recorded. The mouse was immediately removed once this response was observed. If there was no response after 30 s, the test was terminated. Each mouse was submitted to the test 3 times, with at least 1 h between trials.

Statistical analysis. Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Differences between 2 groups were assessed with the Unpaired student's t-test with Welch's correction. One-Way ANOVA Tukey's multiple comparisons test was used to compare the differences between multiple groups. Two-Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test was used to compare differences between cell type and genotype for pS6 intensity level experiments and the effect of lovastatin treatment on contextual fear conditioning and pS6 intensity level. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.

Results

MGE-specific *Syngap1* haploinsufficiency induced mTOR hyperactivation in PV+ neurons in the prefrontal cortex and basolateral amygdala but not CA1.

SYNGAP1 appears to act as a negative regulator of mTOR in excitatory neurons^{1,175}. We wondered whether the same signaling mechanism also takes place in inhibitory neurons. To estimate mTOR activity, we analyzed phosphorylated S6 (pS6) levels, a downstream target of mTOR pathway¹¹³. We quantified pS6 levels in PV+ GABAergic neurons and PV- neurons in the CA1 region of the hippocampus, the basolateral amygdala (BLA) and prefrontal cortex during basal conditions, and 20' after fear conditioning training to enhance mTOR activity^{138,153,162}. mTOR signaling and downstream target S6K are activated within minutes¹⁵³ after fear conditioning¹³⁸ to regulate mRNA translation and protein synthesis at the synapse essential for memory formation^{66,165}. We focus our analysis on prefrontal cortex, BLA and CA1 region of the hippocampus because they are involved in fear conditioning training. In the prefrontal cortex, we found no differences in pS6 levels between PV+ neurons and PV- neurons in control littermates, while we found that, in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, pS6 levels were significantly higher in PV+ cells than PV- neurons at basal conditions (Fig 1A, C; 1.41 ± 0.09 for PV+ cells versus 1.01 ± 0.06 for PV- cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+}; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test $P = 0.002$). In addition, PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} had higher pS6 levels than PV+ neurons of their control littermates (Fig1A, C; 1.41 ± 0.09 for PV+ cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} versus 1.09 ± 0.10 for PV+ cells in *Syngap1*^{flox/+}; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test $P = 0.017$). Interestingly, the difference of pS6 levels between PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} and PV- neurons in the same mice as well as PV+ neurons of control littermates appeared more pronounced in the prefrontal cortex after fear conditioning training (Fig 1B, D; 1.77 ± 0.21 for PV+ cells versus 1.04 ± 0.11 for PV- neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice versus 1.05 ± 0.05 for PV+ cells in *Syngap1*^{flox/+} mice; Two Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test $P = 0.001$ and $P = 0.002$, respectively).

In the BLA, while there was no significant difference at basal conditions (Fig 2A, C), after fear conditioning, pS6 levels in PV- neurons were similar in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+}

and their control littermates (Fig 2B, D; 0.99 ± 0.16 for PV- Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} versus 0.98 ± 0.13 for PV- *Syngap1*^{flox/+}; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test $P = 0.94$). However, PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} had higher pS6 levels than PV+ neurons of their control littermates (Fig 2B, D; 1.36 ± 0.24 for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} versus 0.72 ± 0.15 for *Syngap1*^{flox/+}; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test $P = 0.03$).

In the CA1 region at basal conditions, pS6 level was higher in PV+ neurons than PV- neurons for both Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} and their control littermates (Fig 3A, C; 1.47 ± 0.08 for PV+ cells vs 1.09 ± 0.02 for PV- cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} and 1.29 ± 0.14 for PV+ cells vs 1 ± 0.07 for PV- cells in *Syngap1*^{flox/+}; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test $P = 0.03$ and $P = 0.04$). Conversely, after fear conditioning training, pS6 levels were similar in both PV+ and PV- neurons (Fig.3D; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test $P = 0.97$ and $P = 0.98$).

These results suggest that SYNGAP1 constrains mTOR activity in PV+ neurons, especially after synchronous neuronal stimulation in the amygdala and the prefrontal cortex.

MGE-specific *Syngap1* haploinsufficiency caused contextual fear conditioning deficits.

We have previously reported that Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice showed normal levels of locomotion and anxiety but deficits in social novelty preference as well as spatial working memory⁹. mTOR signaling hyperactivity can cause social novelty preference deficits⁵⁶. In addition, enhancing mTOR activity can also cause cognitive alterations such as contextual fear conditioning deficits¹¹⁵. Since MGE-derived GABAergic neurons are important for fear learning and expression^{36,181} and contextual fear memory consolidation^{43,182}, we wondered whether contextual fear memory was impaired in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice.

First, we observed that the overall freezing during training was lower for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice than for control littermates (Fig 4.A), which could indicate memory encoding deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. To investigate the ability of Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} to form memories through sensory stimuli such as foot shock, we evaluated responses to pain stimuli with the hot plate paradigm. Response latency for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice was slightly shorter than for their control littermates (Supp Fig 1A; 8.075 ± 0.671 for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice versus 10.64 ± 0.779 for

Syngap1^{flox/+} mice; Unpaired t-test with Welch's correction $P = 0.04$) suggesting that Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice might be hypersensitive to pain which should not prevent memory encoding through sensory stimuli. Furthermore, when the training protocol was composed of five foot shocks instead of three, Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice displayed equal amount freezing during testing the next day compared to their control littermates (Supp Fig 1B; $62.7\% \pm 8.43\%$ for 5US in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice versus $73.1\% \pm 3.80\%$ for 3US in *Syngap1*^{flox/+} mice versus $77.67\% \pm 1.63\%$ for 5US in *Syngap1*^{flox/+} mice; Holm-Sidak's multiple comparisons test $P = 0.29$ and $P = 0.20$). Moreover, Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} showed normal short-term memory (STM, 1 h) similar to their control littermates (Fig 4B; $75.81\% \pm 7.78\%$ for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice versus $76.27\% \pm 6.91\%$ for *Syngap1*^{flox/+} mice; Unpaired t-test $P = 0.98$) indicating that Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice do not have memory encoding deficits. By contrast, long-term memory (LTM, 24 h, 7 d) of Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice was greatly impaired since Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice froze less during testing 24 hours after training (Fig 4C; $27.89\% \pm 4.37\%$ for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice versus $77.99\% \pm 4.83\%$ for *Syngap1*^{flox/+} mice; Unpaired t-test $P = 0.0001$), as well as 7 days after training (Fig 4D; $23.85\% \pm 5.21\%$ for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice versus $67.93\% \pm 6.73\%$ for *Syngap1*^{flox/+} mice; Unpaired t-test $P = 0.0001$). All together, these data suggest that *Syngap1* haploinsufficiency in MGE-derived neurons cause contextual fear memory deficits.

MGE-specific TSC1 knockout caused contextual fear conditioning deficits.

Next, we ask whether the correlation between mTOR hyperactivation in MGE-derived PV+ neurons and fear memory deficits could be observed with a different mouse model with partial or complete knockout of TSC1 in MGE-derived cells. Tsc1 is a negative regulator of the mTOR pathway. Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox} mice display gene dose-dependent mTOR hyperactivation in PV+ neurons, which is distinctly more pronounced in Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox} mice (Choudhury et al, in preparation).

Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox} mice were submitted to the same contextual fear conditioning protocol as Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. We observed no difference in training-induced freezing between groups (Fig 5A). Interestingly, while Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} show normal contextual fear memory 24 h after training,

Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flx/flx} mice froze significantly less (Fig 5B; 65.41% ± 5.28% for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flx/flx} mice versus 73.22% ± 4.11% for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flx/+} mice versus 38.71% ± 6.47% for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flx/flx} mice; One Way ANOVA Tukey's multiple comparisons test; P = 0.008 and P = 0.001). Similar results were obtained 7 days after training (Fig 5C; 68.79% ± 1.92% for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flx/flx} mice versus 66.69% ± 11.4% for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flx/+} mice versus 30.82% ± 8.88% for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flx/flx} mice; One Way ANOVA Tukey's multiple comparisons test; P = 0.0002 and P = 0.0001) indicating that Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flx/flx} have contextual fear memory deficits. These data suggest that mTOR hyperactivation in MGE-derived interneurons is sufficient to cause context fear memory deficits.

Lovastatin treatment did not rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flx/+} mice.

Our results show that Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flx/+} mice exhibited hyperactivation of mTOR pathway in PV⁺ neurons. *Syngap1* reduction in excitatory neurons leads to hyperactivation not only of mTOR pathway¹⁷⁵ but also of ERK-MAPK and PI3K pathways^{21,94,97}. A common upstream effector of these pathways is RAS. In fact, lack of *Syngap1* regulation increases the ratio of active RAS-GTP over inactive RAS-GDP^{88,130}. Lovastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase used for the treatment of hypercholesterolemia, reduces RAS activation^{91,121}. We reasoned that targeting RAS activity may act on multiple pathways that could potentially be affected by *Syngap1* haploinsufficiency in GABAergic neurons. Previous studies used lovastatin in animal model of Neurofibromatosis 1, Costello Syndrome and Fragile X syndrome^{111,132,155} to correct cognitive deficits caused by RAS hyperactivity. Therefore, we tested whether lovastatin treatment would rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flx/+} mice. We injected lovastatin (20 mg/kg) subcutaneously for 6 days, starting 3 days prior to contextual fear conditioning protocol. Contrary to what we observed in untreated mice (Fig 4), there was no significant difference of training-induced freezing between groups (Fig 6A). However, Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flx/+} mice treated with lovastatin showed freezing levels comparable to those treated with the vehicle and froze less than control mice treated with lovastatin or vehicle (Fig 6B; 48.12% ± 8.68% for Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flx/+}- Veh mice, 53.20% ± 8.36% for Tg(Nkx2.1-Cre);

Syngap1^{fllox/+} - Lova mice; 80.08% ± 5.16% for *Syngap1*^{fllox/+} - Veh mice; 80.08% ± 3.92% for *Syngap1*^{fllox/+} - Lova; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test P = 0.84, P = 0.01 and P = 0.01), indicating that lovastatin treatment in adult mutant mice was unable to rescue contextual fear memory deficits.

Lovastatin treatment did not reduce mTOR hyperactivation in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice.

Since lovastatin failed to rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice (Fig 6), we next asked whether this failure was due to the lovastatin treatment inability to reduce mTOR hyperactivation or if acute reduction of mTOR hyperactivation was not sufficient to rescue contextual fear memory deficits. Mice were perfused 6 hours after the last injection on the sixth day. We monitored mTOR activity through pS6 immunoreactivity in the prefrontal cortex, since we observed that pS6 levels were significantly higher in this region already under basal conditions (Fig 1A, C). Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} treated with vehicle or lovastatin still showed significantly higher pS6 levels in PV+ neurons than in PV- neurons (Fig 7B; 2.77 ± 0.24 for PV+ cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} - Veh mice, 1.30 ± 0.11 for PV- cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} - Veh mice, 2.38 ± 0.39 for PV+ cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} - Lova mice, 1.16 ± 0.13 for PV- cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} - Lova mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test P = 0.0002 and P = 0.0001). Furthermore, while PV- neurons had similar pS6 levels between groups, PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice treated with lovastatin showed higher pS6 levels than PV+ neurons in their control littermates treated with either vehicle or lovastatin (Fig 7B; 2.38 ± 0.39 for PV+ cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} - Lova mice, 1.22 ± 0.14 for PV+ cells in *Syngap1*^{fllox/+} - Veh mice, 1.52 ± 0.10 for PV+ cells in *Syngap1*^{fllox/+} - Lova mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test P = 0.0006 and P = 0.0122). Finally, there was no significant difference in pS6 levels between PV+ cells from Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice treated with either vehicle or lovastatin (Fig 7B; 2.77 ± 0.24 for PV+ cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} - Veh mice versus 2.38 ± 0.39 for PV+ cells in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test P = 0.3). All together, these data suggest

that lovastatin treatment had no effect on mTOR hyperactivation in the prefrontal cortex of Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice at basal conditions.

PV+ neuron- specific *Syngap1* haploinsufficiency did not cause contextual fear conditioning deficits.

Our data showed that lovastatin treatment in adult mice was unable to rescue either mTOR hyperactivation in PV+ neurons or fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice. One possibility is that *Syngap1* haploinsufficiency affects the early steps of GABAergic circuit establishment, permanently changing their developmental trajectory, thereby contributing to cognitive problems in adult mice. In Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+} mice, *Syngap1* gene recombination occurs embryonically¹⁸³ in all GABAergic neurons generated in the MGE, including PV+ cells and somatostatin-expressing (SST+) interneurons¹⁸³. We thus wondered whether loss of *Syngap1* specifically in postnatal PV+ neurons¹⁶⁶ was sufficient to induce contextual fear conditioning deficits. To address this point, we generated Pv-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} mice, where cortical Cre expression starts only after the second postnatal week¹⁶⁶. We observed no difference in training-induced freezing between Pv-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} mice and their control littermates (Fig 8A; Two-Way ANOVA Holm Sidak's multiple comparisons test, P = 0.96). Pv-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} mice showed no contextual fear memory deficits 24 h (Fig 8B; 83.09% ± 4.63% for *Syngap1*^{fllox/+} mice versus 83.72% ± 2.12% for Pv-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} mice; Unpaired t-test with Welch's correction; P = 0.904) and 7 days after training (Fig 8C; 78.80% ± 3.49% for *Syngap1*^{fllox/+} mice versus 75.59% ± 3.06% for PV-Cre; *Syngap1*^{fllox/+} mice; Unpaired t-test; P = 0.524). These results suggest that contextual fear conditioning deficits are caused by the early onset of *Syngap1* haploinsufficiency or/and *Syngap1* haploinsufficiency in both PV+ and SST+ neurons.

Discussion

Here, we showed that *Syngap1* negatively regulated mTOR activity in GABAergic PV+ neurons and loss of *Syngap1* in MGE-derived GABAergic cells caused contextual fear memory deficits. A second mouse model exhibiting mTOR hyperactivation in PV+ neurons (Tg(Nkx2.1-Cre); *Tsc1*^{flox/flox}) also had contextual fear memory deficits. Furthermore, lovastatin treatment did not restore normal mTOR activity level in PV+ neurons and did not rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, suggesting that alternative drugs or time of treatment might be more effective.

Our results show that haploinsufficiency of *Syngap1* induces mTOR hyperactivation, not only in glutamatergic neurons^{1,175} but also in GABAergic PV+ neurons. This result suggests that similar alteration in intracellular signaling might take place due to *Syngap1* mutations in glutamatergic and GABAergic neurons. In glutamatergic neurons, it has been shown that *Syngap1* knockdown leads to ERK-MAPK pathway hyperactivation and increased AMPA receptor insertion^{1,94,97,152,175}. Whether in GABAergic neurons *Syngap1* mutations have the same effects on AMPA receptor-mediated inputs remain to be determined. However, it is likely that not all the cellular responses modulated by *Syngap1* will be the same in glutamatergic and GABAergic neurons. For example, in glutamatergic neurons, following NMDA receptor activation, CaMKII phosphorylates SYNGAP1 inhibiting its RasGTPase activity²⁵. Moreover, CaMKII phosphorylation of SYNGAP1 leads to dispersion of Syngap1 from the postsynaptic site⁵ which triggers AMPA receptor insertion. On the other hand, CaMKII is not expressed in GABAergic neurons⁷⁸. Recently, it has been shown that in PV+ GABAergic interneurons, CaMKI, not CaMKII, mediates nuclear signaling³¹, making CaMKI a candidate protein able to potentially replace CaMKII activity on Syngap1 in GABAergic neurons. CDK5 may also be an attractive candidate since CDK5 phosphorylates Syngap1¹⁷⁴ and is expressed in developing GABAergic neurons¹⁴⁶. Further research is needed to determine which protein regulates Syngap1 function in GABAergic neurons.

mTOR hyperactivation has been linked to hippocampal-dependent learning deficits^{6,45} and the conditional deletion of *Tsc1* in MGE-derived neurons leads to mTOR hyperactivation and

cognitive deficits (Choudhury et al, in preparation). Here, we showed that 2 mouse models exhibiting mTOR hyperactivation in PV+ neurons (Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} and in Tg(Nkx2.1-Cre); *Tsc1*^{flox/flox}) had contextual fear memory deficits (Fig 4, 5). GABAergic neurons are part of microcircuits in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus implicated in fear learning and memory^{36,81,90,181}. mTOR activity is a marker of excitation in neurons. Therefore, the higher mTOR signaling we observed in PV+ neurons after fear conditioning in the prelimbic cortex and the BLA (Fig1, 2) suggest that PV+ neurons are more excited after fear learning in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, which may contribute to impaired fear memories. In fact, inhibition of prefrontal cortex PV+ neurons is necessary for fear memory to be learned properly³⁶. Inhibition of prefrontal cortex PV+ neurons leads to activation of prefrontal excitatory neurons projecting to the BLA leading to fear learning and expression³⁶. If PV+ neurons in the prefrontal cortex are not inhibited freezing behavior is reduced³⁶. Reduction of local GABAergic neurons activity in the BLA is also important for fear acquisition and expression because it enhances output activity of fear inducing projection neurons⁴⁶. These processes could be impaired in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. For example, during training, after the foot shocks, prefrontal cortex PV+ neurons might not be inhibited properly which would prevent the expression of fear and could explain the lower freezing induced by foot shocks during training in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. Similarly, during contextual fear testing, local inhibition in the BLA could be high preventing output activity of fear inducing projection neurons.

Contextual fear memory deficits might also originate from the incapacity to encode the context. In the minutes and hours following fear learning, excitatory cells with higher intrinsic excitability are selected through a competitive process to take part in a memory assemble associated with the context¹⁸⁵. Connections between these excitatory cells are strengthened and stabilized to form a physical trace of contextual memory^{70,79}. Thus, network activity leading to synchronization of subpopulation of excitatory neurons help the formation of memory assembles and encoding of the context^{79,129}. Gamma rhythms, thought to depend on synchronous activity of PV+ neurons¹⁵, synchronize populations of excitatory neurons¹⁷⁶. In the CA1 region of the hippocampus, gamma oscillations increase network coherence and encourage contextual fear memory consolidation¹²⁹. We have previously shown that

hippocampal gamma oscillations are impaired in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice⁹. Weaker gamma oscillations could be due to the lower number of PV+ neurons in the hippocampus (data not shown), reduced density of PV+ neurons synapses⁹ or their inability to synchronize their activity. Either way, weaker gamma oscillations in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice might prevent the synchronization of subpopulations of excitatory neurons and impairing the formation of memory ensemble encoding causing contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice.

In Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, both parvalbumin and somatostatin (SST+) neurons lack a copy of *Syngap1*. Therefore, SST+ neurons might also not function properly in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. Since SST+ neurons take part in GABAergic microcircuits regulating fear memory in the amygdala, the prefrontal cortex and the hippocampus¹⁷⁰, deficits in their function might also contribute to the cognitive alterations present in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. However, whether *Syngap1* haploinsufficiency affects SST+ neurons and whether this has an impact on fear memory formation remains to be determined.

Our data show that lovastatin treatment was unable to rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice. Several studies have already used lovastatin treatment with concentration and duration consistent with ours^{104,111,132}. Previous studies in mice models of NF1, Fragile X Syndrome and Noonan Syndrome reported that lovastatin treatment could normalize ERK signaling and rescue Morris Water Maze learning deficits or epileptogenesis^{104,111,132}. On the other hand, consistent with our results, in a study using a Costello syndrome mouse model lovastatin treatment failed to rescue both ERK signaling and Morris Water Maze learning deficits¹⁵⁵. Conversely, treatment with MEK inhibitors rescued ERK signaling but not cognitive deficits¹⁵⁵. It is possible that in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, mTOR hyperactivation might be reduced using a different drug which target mTOR more directly like rapamycin¹⁰⁹. In another study in *En2*^{-/-} mice, lovastatin restored MAPK-ERK activity but did not rescue Morris Water Maze learning deficits¹⁴³. Interestingly, *En2*^{-/-} mice present a loss of forebrain GABAergic neurons^{157,172}, which contribute to Morris Water Maze learning deficits^{4,106}, explaining why restoring normal level of MAPK-ERK signaling was not sufficient to rescue cognitive deficits. A similar mechanism could also be present in

Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice, since preliminary data from our lab show a diminution of PV+ neurons in the hippocampus (data not shown). Furthermore, SYNGAP1 regulates neuronal apoptosis⁹² and if *Syngap1* haploinsufficiency causes mTOR hyperactivation in GABAergic neuron progenitors, it could disrupt self-renewal, proliferation and cell cycle progression which would lead to reduced number of GABAergic interneurons⁸⁰. If that is the case, treatment with lovastatin or rapamycin should take place earlier during neurodevelopment to prevent cell loss. Supporting this hypothesis, we found that Pv-Cre; *Syngap1*^{flox/+} mice, which have a reduction of *Syngap1* in PV+ neurons after the second postnatal week, do not have contextual fear memory deficit. Comparing these results with the Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} mice fear memory deficits, it is possible that *Syngap1* haploinsufficiency restricted to PV+ neurons is not sufficient to induce malfunction of fear circuitry. This is however unlikely since removal of neuroligin-3 only in PV+ neurons is sufficient to impair both their function and fear memory extinction¹⁴¹, proving that PV+ neurons play an essential role in fear circuitry. It is likely that reduction of *Syngap1* in Pv-Cre; *Syngap1*^{flox/+} mice might happen too late during development to affect GABAergic circuit establishment. Supporting this hypothesis, in excitatory neurons, loss of *Syngap1* impairs AMPA/NMDA ratio as early as P4³⁰ and mTOR signaling is already enhanced in the prefrontal cortical excitatory neurons at P4¹. *Syngap1* is expressed as early as E8.5¹⁴², and could participate in embryonic development⁹⁶. Finally, in Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; *TSCI*^{flox/flox} mice contextual fear conditioning deficits correlated with enhanced mTOR activity. Whether mTOR activity is enhanced in PV+ neurons in Pv-Cre; *Syngap1*^{flox/+} mice still needs to be determined.

Choosing not only the right drug but also the correct timeline to treat neurodevelopmental diseases is essential. Treatment during adulthood seems less and less likely to be able to rescue cognitive deficits completely²⁹. *Syngap1*^{-/-} mice die shortly after birth^{88,94,173} pointing to a vital role of *Syngap1* early in development. Furthermore, mutations of *Syngap1* lead to abnormal dendritic spine maturation and affects the duration critical period of synaptic plasticity, thought to be important for the development of intellectual ability^{1,30}. In view of these results, treatment should take place prenatally, or during the first postnatal week in rodents.

Acknowledgements

This work was supported by CIHR (G.DC) and EraNet (J.M). T.B. was supported by FRQNT and the Faculty of Graduate Studies of Université de Montréal. We thank Christina Nassif and James Waldron for technical support, and Marisol Perez, Édith Pelletier, Sonja L'Esperance, Denise Carrier and all members of the animal facility of CHU Ste.Justine Research Center.

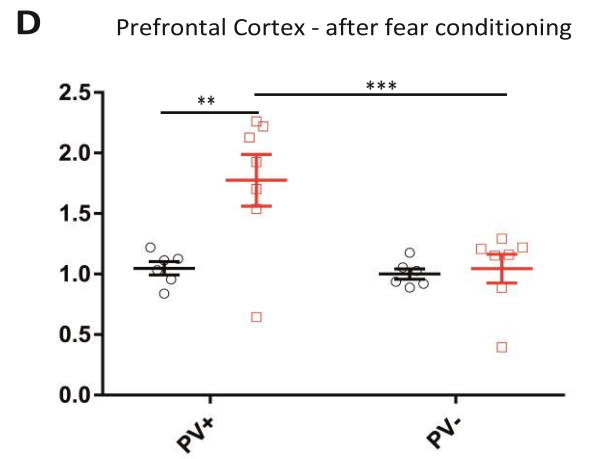
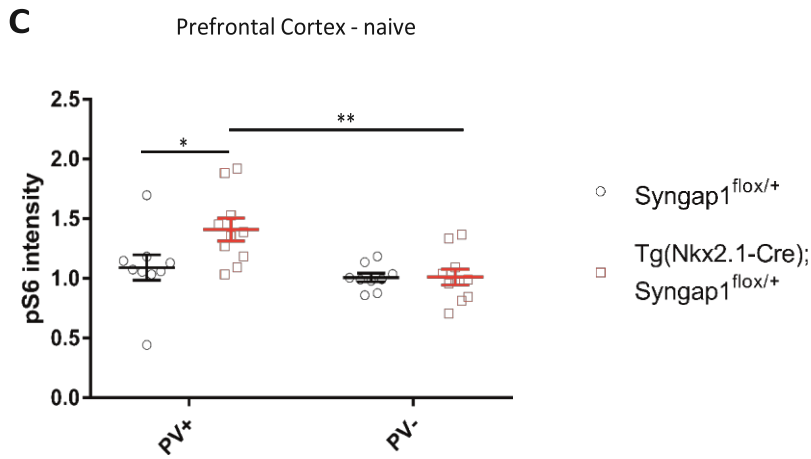
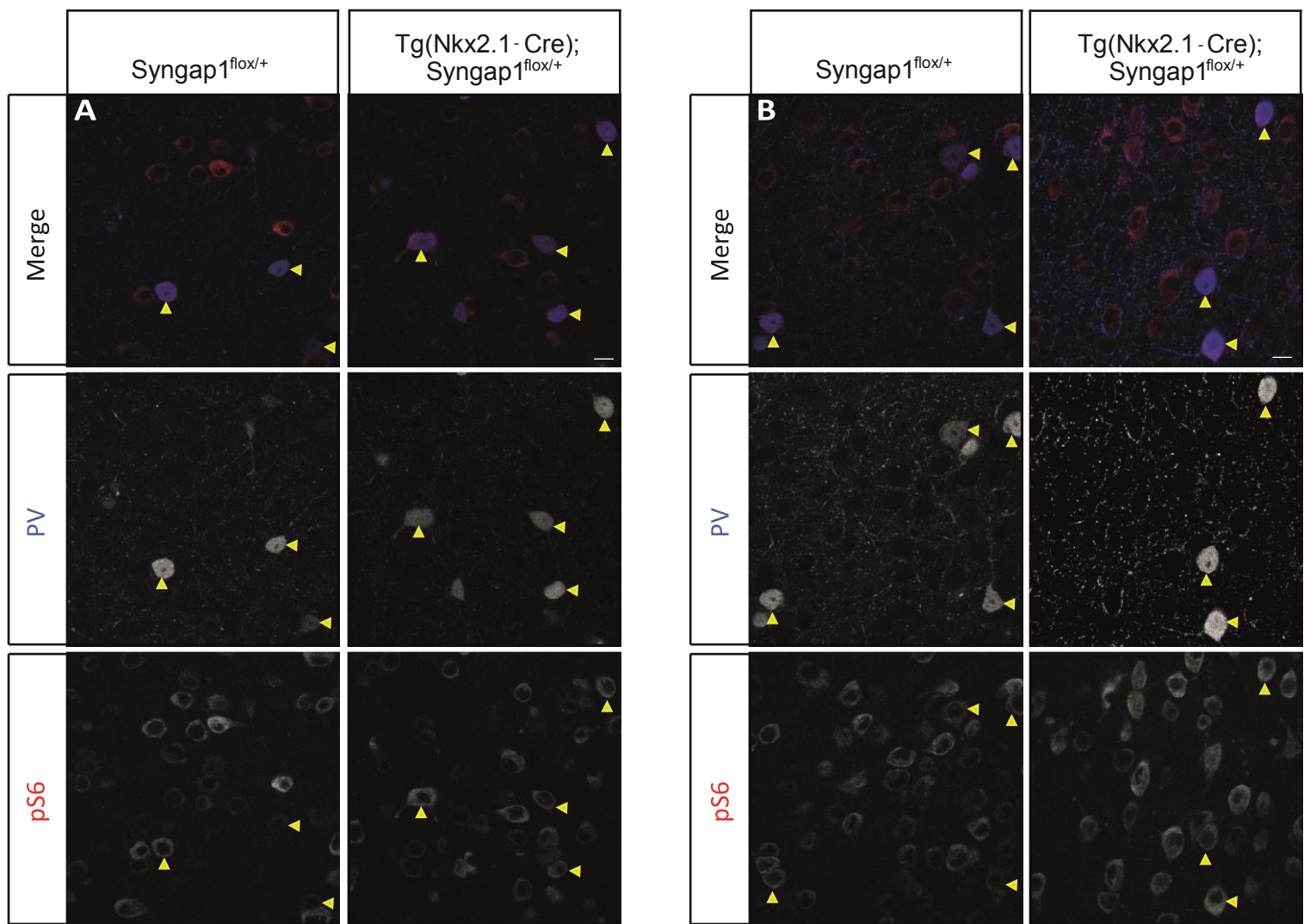
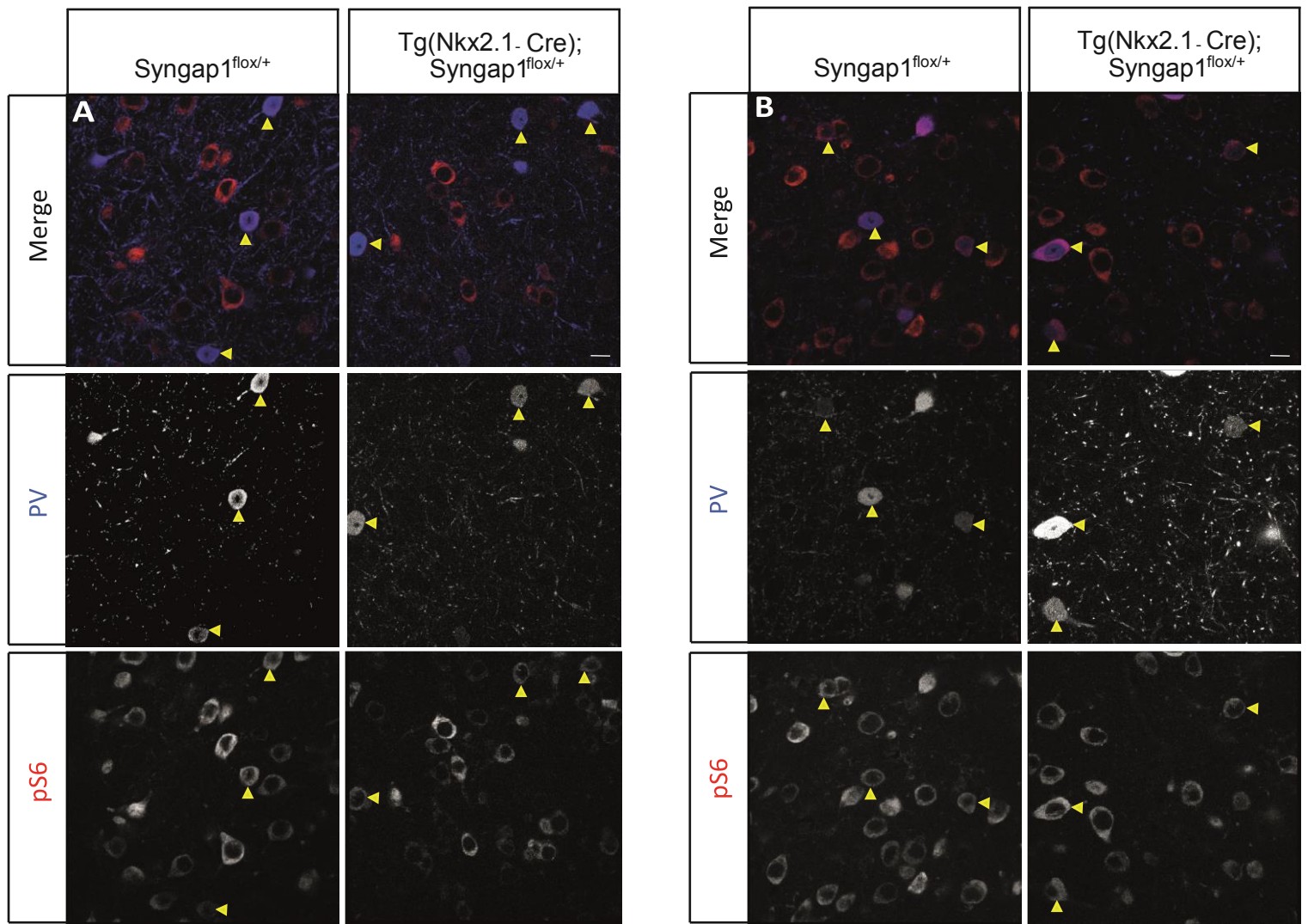
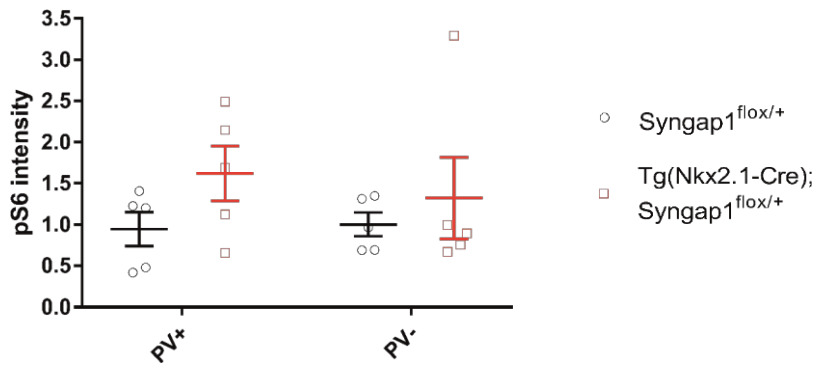


Figure 1. PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice prefrontal cortex display mTOR hyperactivation under basal conditions and after neuronal stimulation. (A, B) Confocal images of prelimbic cortex of adult mice show PV+ neurons (blue) and pS6 expression (red) under basal conditions (A) and 20 min after fear conditioning (B). (C) under basal conditions, pS6 fluorescence intensity level is higher in PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice than neighboring PV- neurons and PV+ neurons of control littermates (n = 9 for Syngap1^{flox/+} mice; n = 10 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice ; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test, **P = 0.002 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}, *P = 0.017 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV+ Syngap1^{flox/+}). (D) 20 min after fear conditioning, pS6 fluorescence intensity level is higher in PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice than neighboring PV- neurons and PV+ neurons of control littermates (n = 6 for Syngap1^{flox/+} mice; n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice ; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test, ***P = 0.001 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}, **P = 0.002 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV+ Syngap1^{flox/+}). Graph bar represent mean ± s.e.m, circles represent values for each mouse. Scale bar, 10 μm.



C Basolateral Amygdala - naive



D Basolateral Amygdala - after fear conditioning

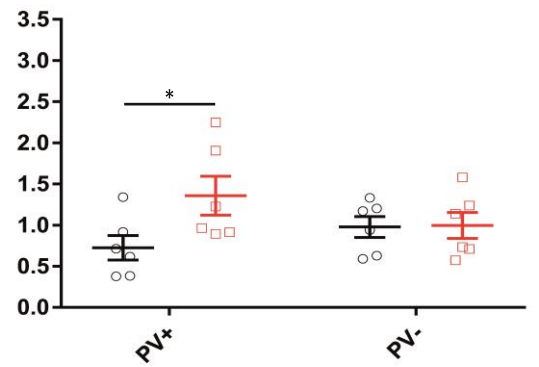


Figure 2. PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice basolateral amygdala display mTOR hyperactivation after neuronal stimulation. (A, B) Confocal images of basolateral amygdala of adult mice show PV+ neurons (blue) and pS6 expression (red) under basal conditions (A) and 20 min after fear conditioning (B). (C) under basal conditions, pS6 fluorescence intensity level is not significantly different in PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice than neighboring PV- neurons and PV+ neurons of control littermates (n = 5 for Syngap1^{flox/+} mice; n = 5 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test, P = 0.7 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}, P = 0.94 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV+ Syngap1^{flox/+}). (D) 20 min after fear conditioning, pS6 fluorescence intensity level is higher in PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice than in PV+ neurons of control littermates (n = 6 for Syngap1^{flox/+} mice; n = 6 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test, *P = 0.034 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV+ Syngap1^{flox/+}). Graph bar represent mean ± s.e.m, circles represent values for each mouse. Scale bar, 10 μm.

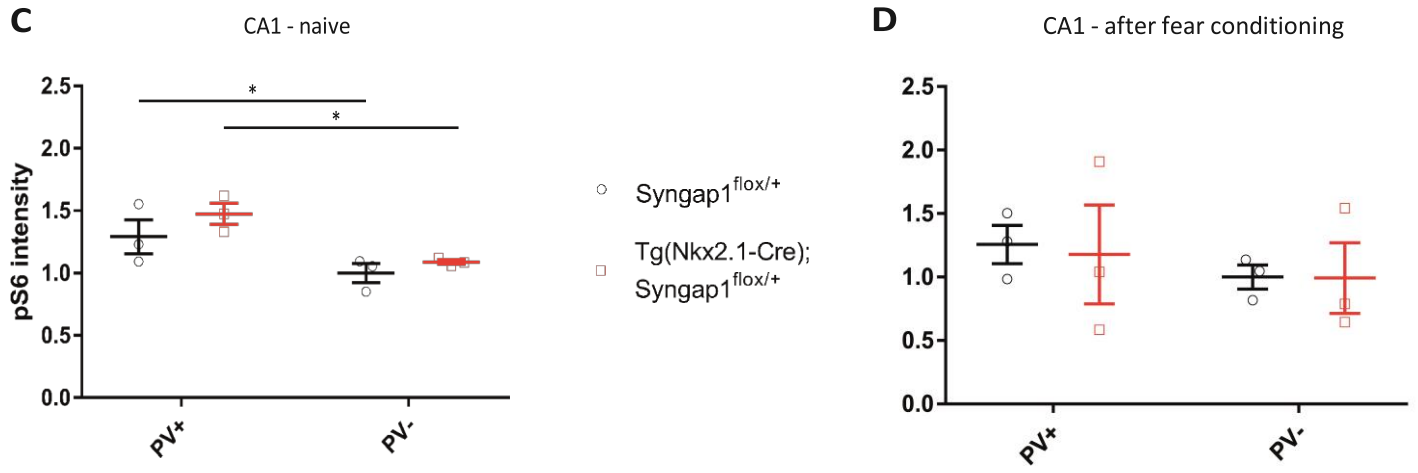
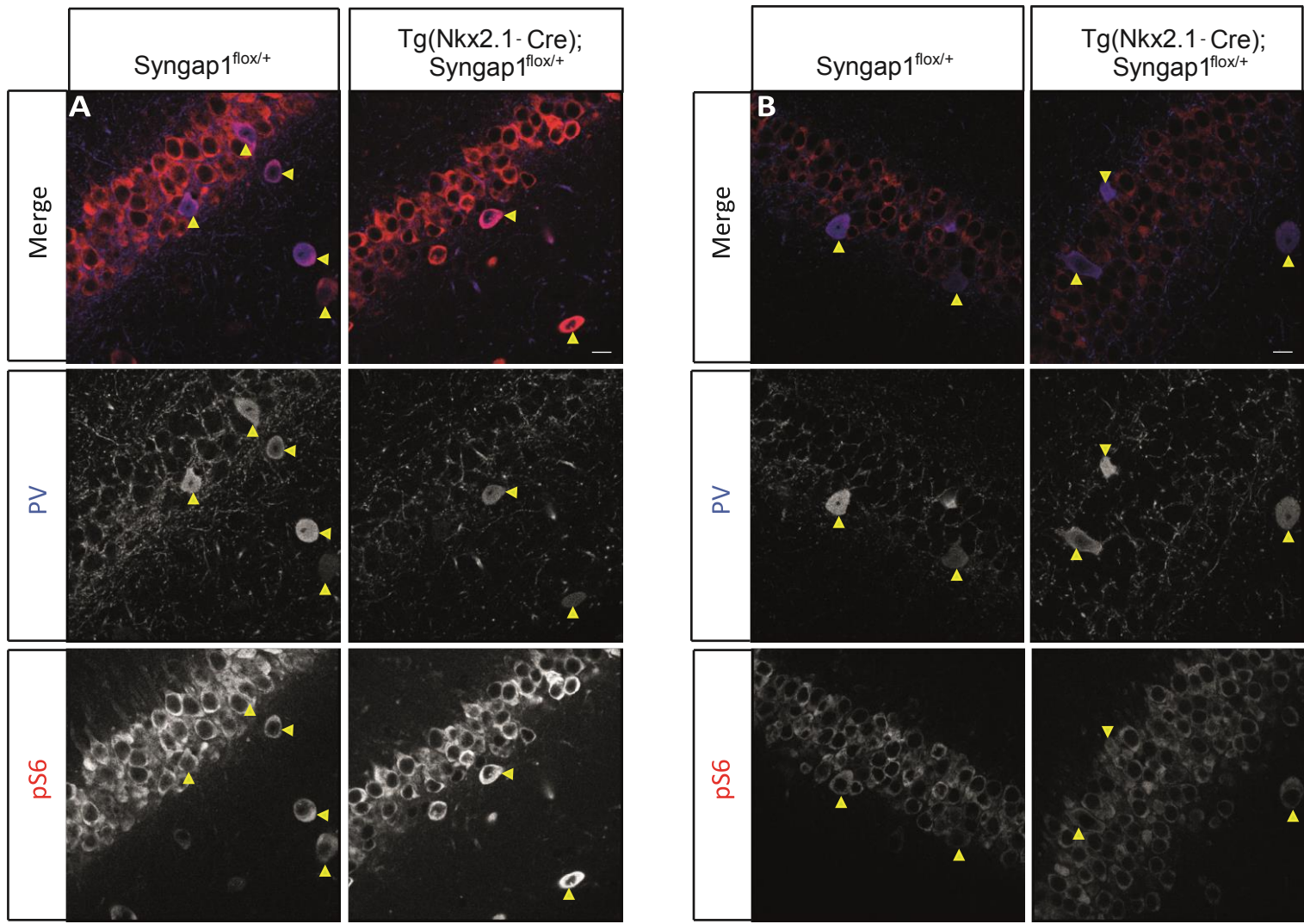


Figure 3. Hippocampal PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice display mTOR hyperactivation under basal conditions. (A, B) Confocal images of CA1 of adult mice show PV+ neurons (blue) and pS6 expression (red) under basal conditions (A) and 20 min after fear conditioning (B). (C) under basal conditions, pS6 fluorescence intensity level is higher in PV+ neurons than neighboring PV- neurons in both Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice and Syngap1^{flox/+} mice (n = 3 for Syngap1^{flox/+} mice; n = 3 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test, *P = 0.03 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}, *P = 0.04 for PV+ Syngap1^{flox/+} versus PV- Syngap1^{flox/+}). (D) 20 min after fear conditioning, pS6 fluorescence intensity level is not significantly different in PV+ neurons in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice than neighboring PV- neurons and PV+ neurons of control littermates (n = 3 for Syngap1^{flox/+} mice; n = 3 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test, P = 0.90 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}, P = 0.94 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} versus PV+ Syngap1^{flox/+}). Graph bar represent mean ± s.e.m, circles represent values for each mouse. Scale bar, 10 μ m.

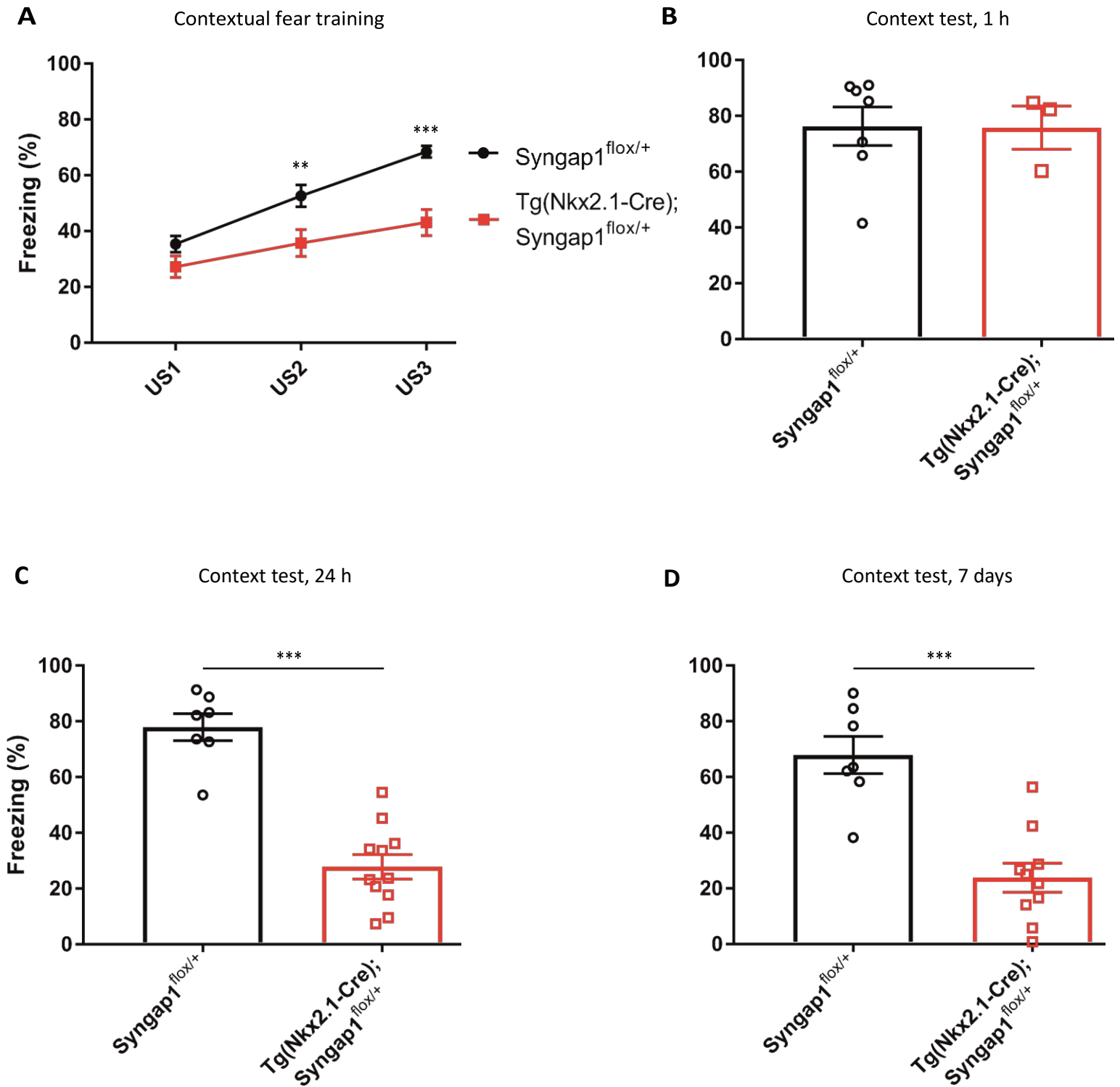


Figure 4. MGE-specific Syngap1 haploinsufficiency caused contextual fear conditioning deficits. (A) Adult mice were placed in a context, where they received three unsignaled foot shocks freezing after second and third foot shock was lower for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice than Syngap1^{flox/+} (n = 7 for Syngap1^{flox/+} and n = 11 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Two Way ANOVA Holm Sidak's multiple comparisons test; **P = 0.001 ***P = 0.0001) (B) Adult mice were placed in the same context 1 h after training for 5 min to test short-term memory, there was no difference in the amount of time spent frozen between Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice and Syngap1^{flox/+} mice (n = 7 for Syngap1^{flox/+} and n = 3 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Unpaired t-test; P = 0.98). (C) Adult mice were placed in the same context 24 h after training for 5 min to test long-term memory (n = 7 for Syngap1^{flox/+} and n = 11 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Unpaired t-test; ***P = 0.0001). (D) Adult mice were placed in the same context 7 days after training for 5 min (n = 7 for Syngap1^{flox/+} and n = 11 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Unpaired t-test; ***P = 0.0001). Graph bar represent mean ± s.e.m, points represent values for each mouse.

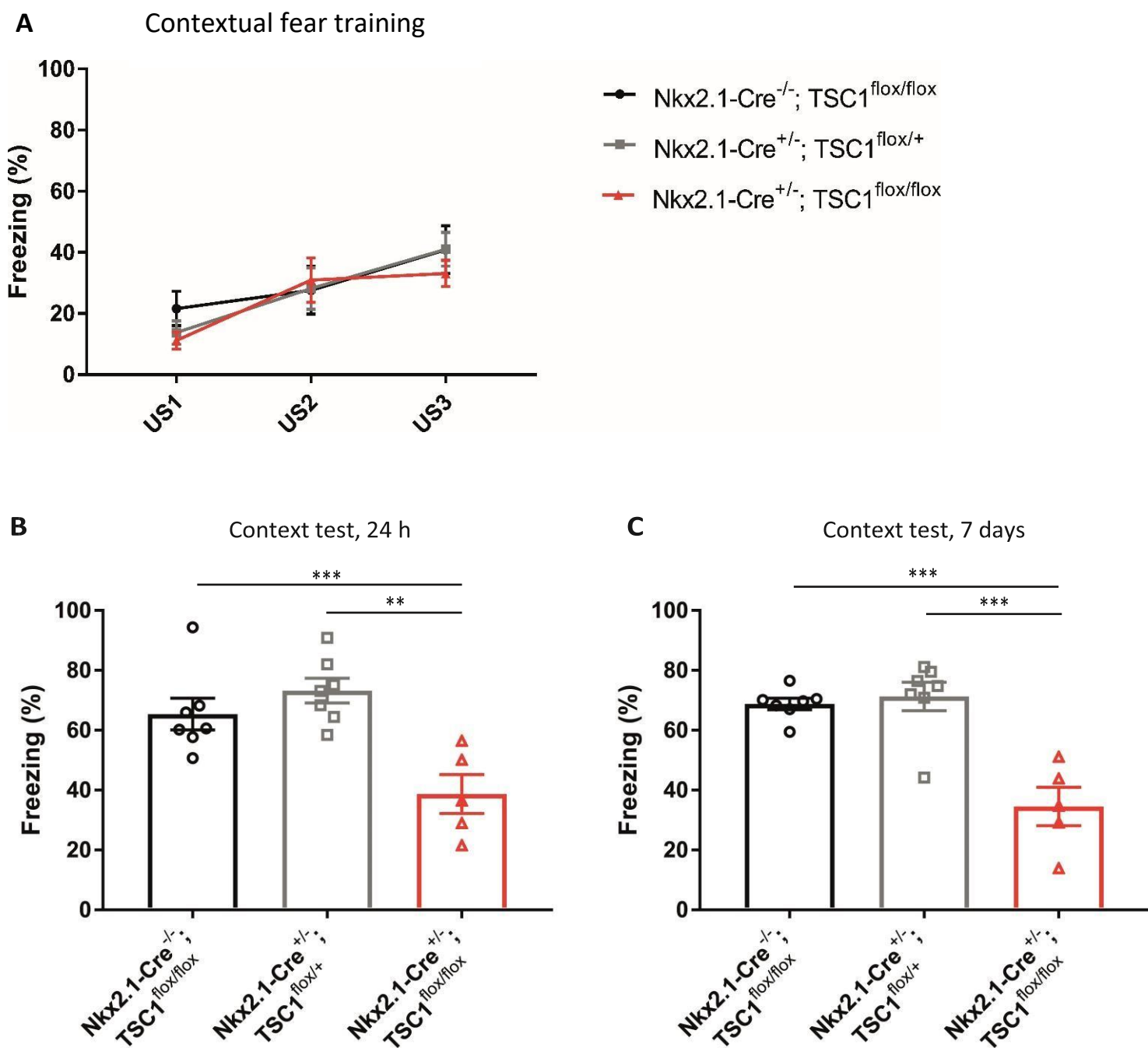


Figure 5. MGE-specific TSC1 knockout caused contextual fear conditioning deficits. (A) Adult mice were placed in a context, where they received three unsignaled foot shocks, freezind-induced by freezing was similar between each groups (n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flox/flox}, n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and n = 5 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}; One Way ANOVA HolmSidak's multiple comparisons test) (B) Adult mice were placed in the same context 24 h after training for 5 min to test long-term memory (n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flox/flox}, n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and n = 5 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}; One Way ANOVA Tukey's multiple comparisons test; **P = 0.008 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}; ***P = 0.001 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flox/flox} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}). (C) Adult mice were placed in the same context 7 days after training for 5 min (n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flox/flox}, n = 7 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and n = 5 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}; One Way ANOVA Tukey's multiple comparisons test; ***P = 0.0002 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/+} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}; ***P = 0.0001 for Tg(Nkx2.1-Cre)^{-/-}; TSC1^{flox/flox} and Tg(Nkx2.1-Cre)^{+/-}; TSC1^{flox/flox}). Graph bar represent mean ± s.e.m, points represent values for each mouse.

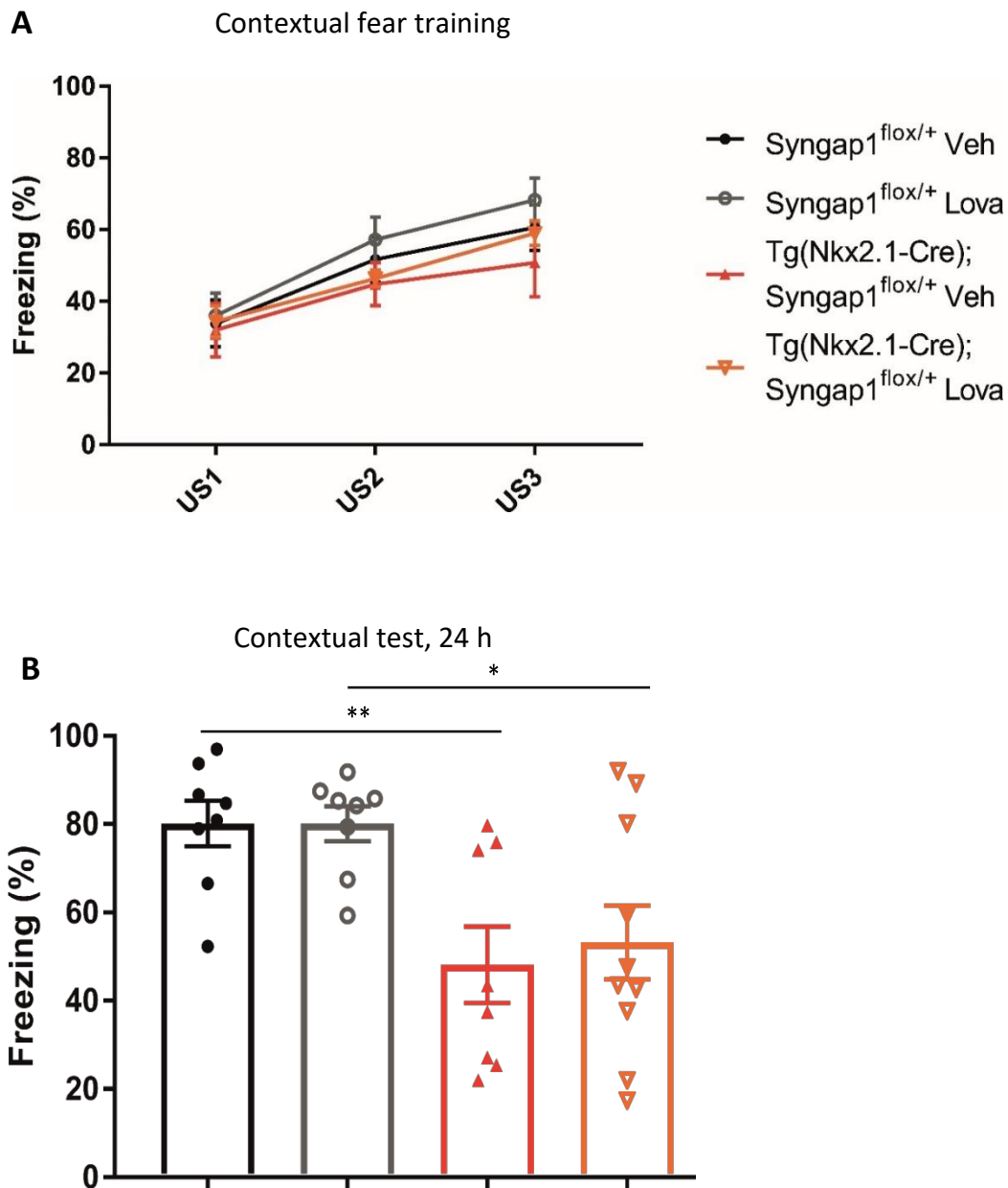


Figure 6. Lovastatin treatment did not rescue contextual fear memory deficits in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice. (A) lovastatin treatment consisted in daily sub-cutaneous injection of 20 mg/kg of lovastatin. On the fifth day of treatment mice were placed in a context, where they received three unsignaled foot shocks there was no difference in freezing between groups during training (n = 8 for Syngap1^{flox/+} - Veh, n = 8 Syngap1^{flox/+} - Lovastatin, n = 8 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - Veh and n = 10 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - Lovastatin; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test). (B) On the sixth treatment day, mice were placed in the same context than for training for 5 min to test long-term memory. Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice treated with lovastatin froze less than Syngap1^{flox/+} mice treated with lovastatin (n = 8 for Syngap1^{flox/+} - Veh, n = 8 Syngap1^{flox/+} - Lovastatin and n = 10 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - Lovastatin; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; *P = 0.01). Graph bar represent mean ± s.e.m, points represent values for each mouse.

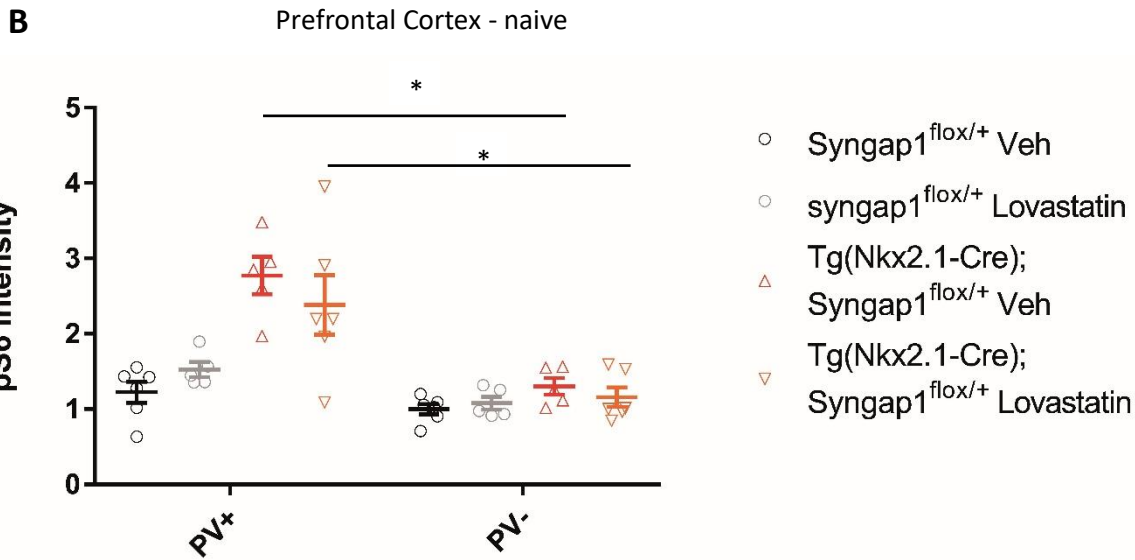
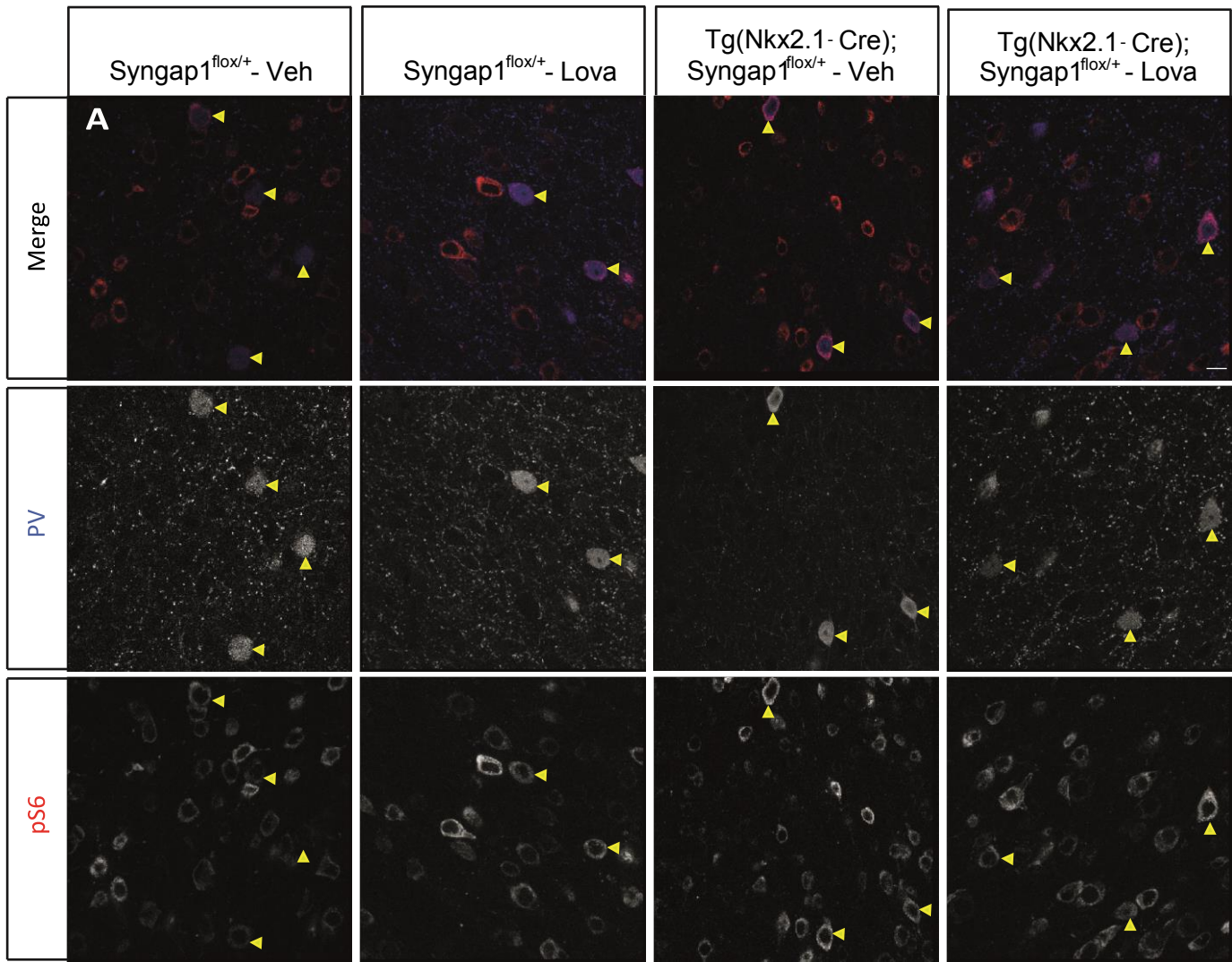


Figure 7. Lovastatin treatment did not reduce mTOR hyperactivation in Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ mice. (A) Confocal images of prefrontal cortex of adult mice submitted to lovastatin or vehicle injection (20 mg/kg) for 6 days, show PV+ neurons (blue) and pS6 expression (red). (B) Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ treated with vehicle or lovastatin showed significantly higher pS6 levels in PV+ neurons than in PV- neurons, while their respective control had no difference in pS6 level between cell groups (n = 6 for $Syngap1^{flox/+}$ - Veh, n = 5 $Syngap1^{flox/+}$ - Lovastatin, n = 5 for Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ - Veh and n = 6 for Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ - Lovastatin; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test; ***P = 0.0002 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ - Veh versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ - Veh and ***P = 0.0001 for PV+ Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ - Lovastatin versus PV- Tg(Nkx2.1-Cre); $Syngap1^{flox/+}$ - Lovastatin). Graph bar represent mean \pm s.e.m, points represent values for each mouse.

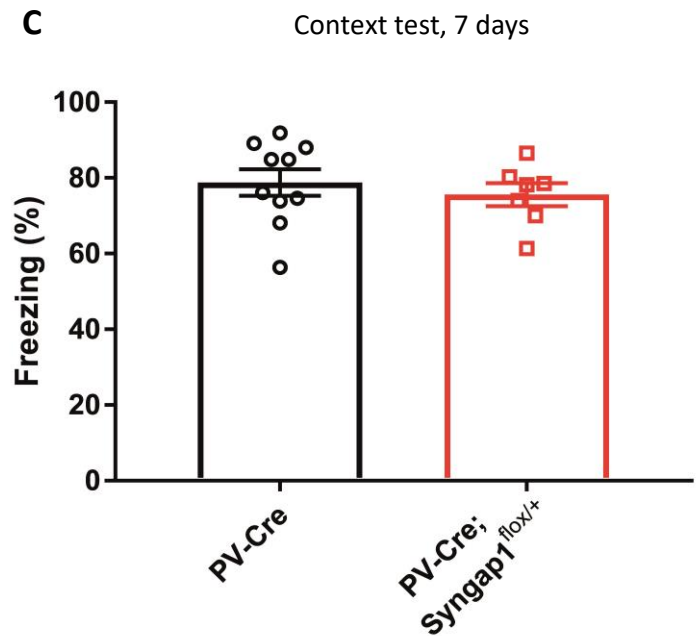
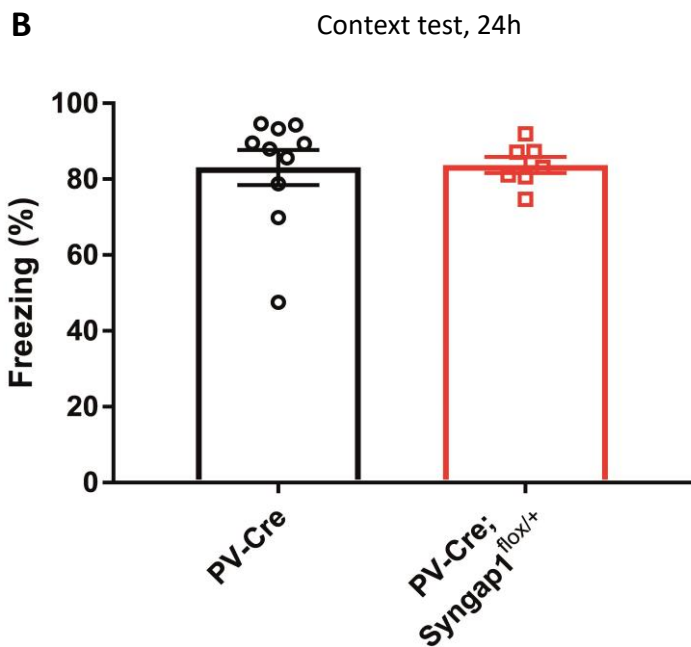
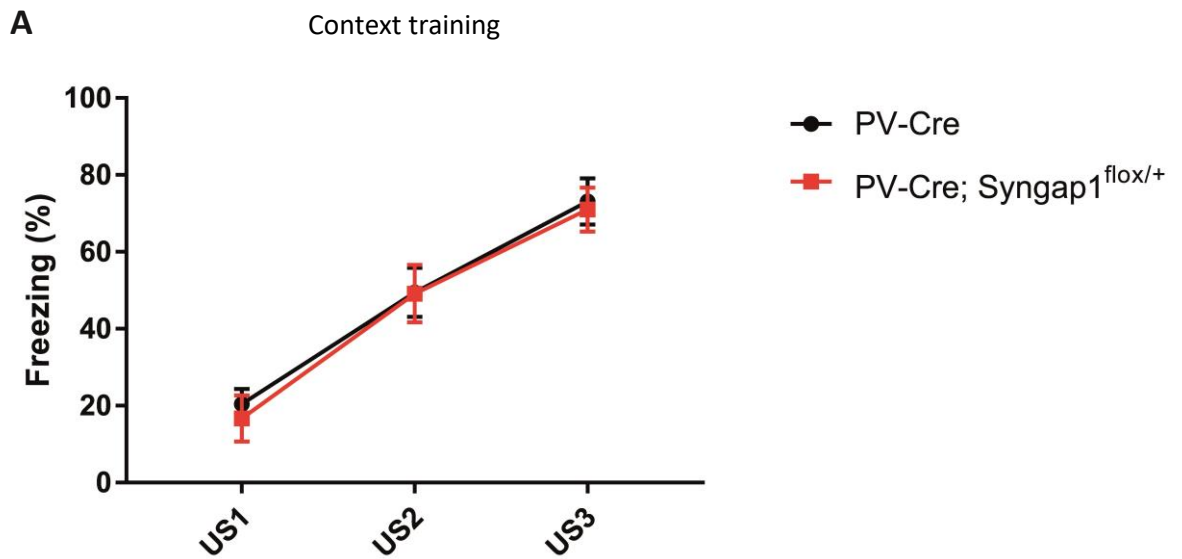
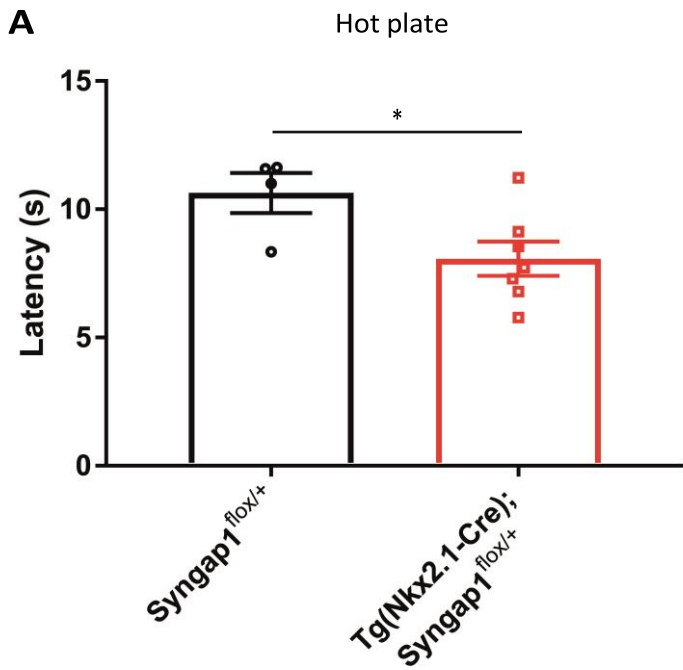
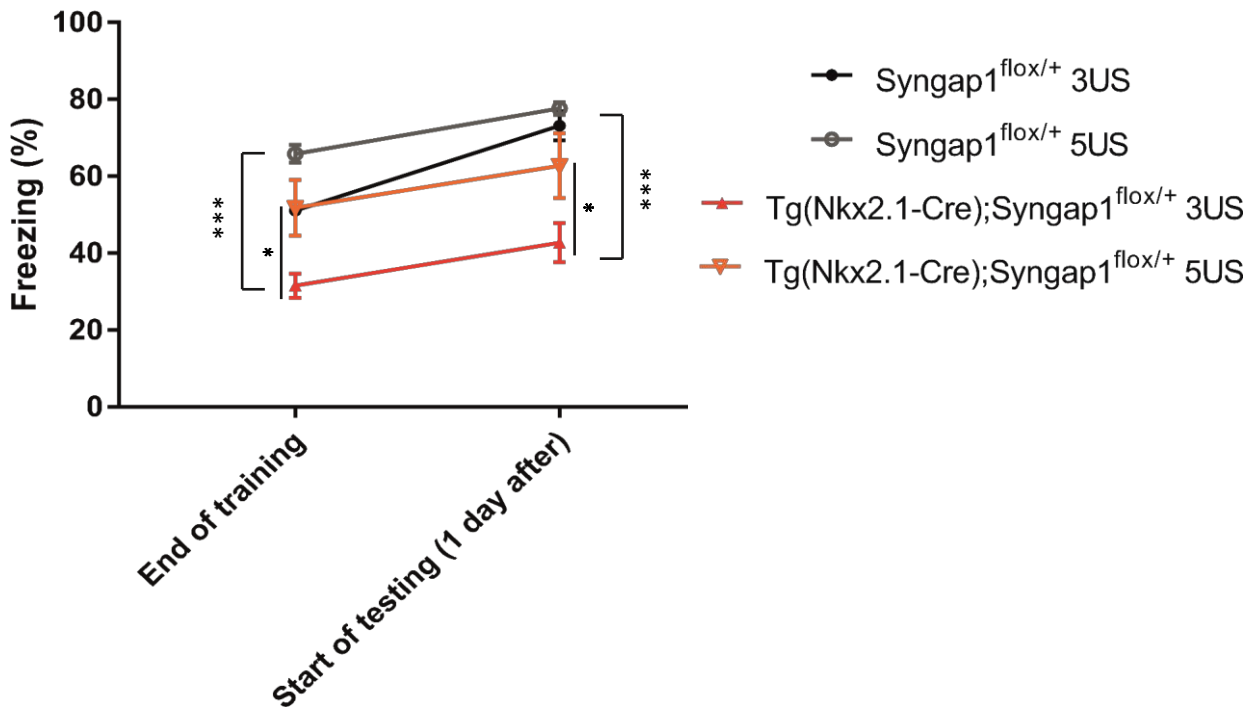


Figure 8. PV+ interneuron specific Syngap1 haploinsufficiency did not cause contextual fear conditioning deficits. (A) Adult mice were placed in a context, where they received three unsignaled foot shocks, freezing induced by freezing was similar between PV-Cre and PV-Cre; Syngap1^{flox/+} mice (n = 10 for PV-Cre, n = 7 for PV-Cre; Syngap1^{flox/+}; Two-Way ANOVA Holm Sidak's multiple comparisons test). (B) Adult mice were placed in the same context 24 h after training for 5 min to test long-term memory. There was no difference in the amount of freezing of PV-Cre and PV-Cre; Syngap1^{flox/+} mice (n = 10 for PV-Cre, n = 7 for PV-Cre; Syngap1^{flox/+}; Unpaired t-test with Welch's correction; P = 0.904). (C) The test was repeated 7 days after training. Again, there was no difference in the amount of freezing of PV-Cre and PV-Cre; Syngap1^{flox/+} mice (n = 10 for PV-Cre, n = 7 for PV-Cre; Syngap1^{flox/+}; Unpaired t-test; P = 0.524). Graph bars represent mean ± s.e.m, points represent values for each mouse.



B Shocks number effect on memory encoding



Supplementary figure 1. in Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice do not have memory encoding deficits. (A) Hot plate latency to show nociceptive response of Syngap1^{flox/+} (n = 4) and Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} (n = 7) mice indicate that Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice are hypersensitive to pain (Unpaired t-test with Welch's correction; *P = 0.04). (B) Number of foot shock received during training affect amount of freezing during testing 24 h after training. Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} mice submitted to 5 shock training froze the same amount of time as Syngap1^{flox/+} mice (n = 16 for Syngap1^{flox/+} - 3US, n = 8 for Syngap1^{flox/+} - 5US, n = 20 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - 3US and n = 6 for Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - 5US; Holm-Sidak's multiple comparisons test; P = 0.29 for Syngap1^{flox/+} - 3US versus Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - 5US, P = 0.20 for Syngap1^{flox/+} - 5US versus Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} - 5US). Graph bar represent mean \pm s.e.m, points represent values for each mouse

Chapitre III : Méthodes et résultats supplémentaires

Méthodes supplémentaires

Souris. Toutes les procédures décrites ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) du Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine. Les souris *Syngap1^{+/-}* ont été gentiment offerte par Dr Seth Grant (Université d'Édimbourg, Écosse) et ont été utilisées par notre laboratoire précédemment⁹. Les souris ont été maintenu en tant que lignée hétérozygote avec un arrière-plan C57BL/6.

Conditionnement de la peur induite par un son ou un contexte. Les souris utilisées pour les expériences comportementales étaient âgées de 2 à 3 mois. La luminosité de la pièce était basse durant les expériences. Des souris des 2 sexes ont été utilisées. 2 contextes différents ont été employés : Le contexte A, composé d'une odeur d'éthanol 70%, de murs de couleur blanche et d'une grille métallique en tant que sol. Le contexte B sentait l'acide acétique 1%, avaient des murs blancs-noirs et une plaque en PVC en tant que sol. *Habituation.* Le premier jour, les souris furent placées dans un contexte A, et elles ont explorées le contexte pendant 3 minutes. *Conditionnement du son et contexte.* La période d'entraînement avait lieu le second jour, dans le contexte A. Le conditionnement consistait en 3 pairages, d'un stimulus à conditionner (SC), un son (bruit blanc, 80 dB, 10s), avec des stimulus non conditionnés (SI), des chocs électriques au pied (0.5 mA, 2s). Les deux stimulus finissaient en même temps à chaque pairage. *Test.* Un jour ou une semaine après l'entraînement les souvenir de peur induits par le son ou le contexte ont été testés. Le premier à être tester était le souvenir de peur induit par le son. Pour cela, les souris furent placées dans un nouveau contexte, le contexte B, et furent exposées aux SC trois fois, avec 60 à 80s d'intervalle entre les SC. 60 s après le troisième SC les souris ont été replacées dans leur cage. Le taux d'immobilisation a été mesuré 60 s après chaque présentation du son. Le test de la peur induite par le contexte a eu lieu 2 h après le test de la peur induite par le son. Pour ce test, les souris ont été placées dans le contexte A pendant 5 minutes. Le taux d'immobilisation a été mesuré durant les 5 minutes du test.

Résultats supplémentaires

Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} ont un déficit de la mémoire de la peur contextuelle et induite par un son conditionné, une semaine après l'entraînement.

Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} ont été soumises au protocole de conditionnement de la peur induite par un contexte ou un son conditionnée. Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} présentent un bas taux d'immobilisation durant l'entraînement (Figure supplémentaire 1A; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test, P = 0.029 pour SI-SC1 et SI-SC3 et P = 0.011 pour SI-SC2). 1 jour après l'entraînement, dans un premier temps, le souvenir de peur induit par un son conditionné fut évalué. Les taux d'immobilisations des souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} durant la présentation du son n'étaient pas différents des taux d'immobilisation des souris contrôles *Syngap1*^{flox/+} (Figure supplémentaire 1B; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test, P = 0.55 pour SC1, P = 0.19 pour SC2, P = 0.10 pour SC3). 2 h après, le souvenir de peur induit par le contexte fut testé. Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} présentaient un taux d'immobilisation moins élevé que les souris *Syngap1*^{flox/+} (Figure supplémentaire 1C; Unpaired t test, P = 0.0043). Une semaine après l'entraînement les deux tests furent répétés. Cette fois, les taux d'immobilisation étaient significativement moins élevés pour les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} que les souris contrôles lors de la présentation des sons (Figure supplémentaire 2D; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test, P = 0.16 pour SC1, P = 0.0002 pour SC2 et SC3) et lorsque les souris furent placées dans le contexte (Figure Supplémentaire 2E; Unpaired t test, P = 0.0004). Ces résultats suggèrent que la mémoire dépendante de l'hippocampe est plus faible chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} que la mémoire sensorielle et qu'il y a possiblement une compétition entre les deux souvenirs.

Les souris *Syngap1*^{+/-} ont un déficit de mémoire de la peur contextuelle uniquement lorsque le souvenir de peur induit par le contexte sont en compétition avec le souvenir de peur induit par le son.

Afin d'étudier les différences et similitudes des profils comportementaux des souris *Syngap1*^{+/-} et Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+}, les souris *Syngap1*^{+/-} ont été soumises au même protocole de conditionnement de la peur contextuelle. Les souris *Syngap1*^{+/-} présentaient un bas taux d'immobilisation durant l'entraînement (Figure supplémentaire 2A; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; P < 0.0001 pour SI1, SI2 et SI3) qui est probablement attribuable à leur hyperactivité locomotrice (62, 9). Le bas taux d'immobilisation durant l'entraînement ne devrait pas être interprété comme un déficit d'encodage de la mémoire puisque les souris *Syngap1*^{+/-} présentait une capacité de mémoire long-terme 24 h (Figure supplémentaire 2B; 67.89% ± 6.14% pour *Syngap1*^{+/-} contre 69.29% ± 4.75% pour *Syngap1*^{+/+}; Unpaired t-test P = 0.086) et 7 jours après l'entraînement (Figure supplémentaire 2C; 49.41% ± 9.47% pour *Syngap1*^{+/-} contre 61.9% ± 4.02% pour *Syngap1*^{+/+}; Unpaired t-test P = 0.17) similaire aux souris contrôles *Syngap1*^{+/+}. Ces résultats suggèrent une mémoire contextuelle normale des souris *Syngap1*^{+/-}. Les souris *Syngap1*^{+/-} ont également été soumis au protocole de conditionnement de la peur induite par un contexte ou un son conditionné. Malgré le bas taux d'immobilisation des souris *Syngap1*^{+/-} durant l'entraînement (Figure supplémentaire 2D; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; CS-US1 P = 0.036; CS-US2 and CS-US3 P < 0.0001), le jour suivant, lorsque les souris *Syngap1*^{+/-} sont soumises au son conditionné, dans un nouveau contexte, elles présentent le même taux d'immobilisation que les souris *Syngap1*^{+/+} (Figure Supplémentaire 2E; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; CS1 P = 0.89, CS2 P = 0.36, CS3 P = 0.99). 2 h après le test de peur induite par le son, les souris *Syngap1*^{+/-} sont placées dans le contexte d'entraînement. Il n'y pas de différence du taux d'immobilisation durant le test de peur induite par le contexte 1 jour après l'entraînement entre les souris *Syngap1*^{+/+} et *Syngap1*^{+/-} (Figure supplémentaire 2F; 41.36 % ± 4.38 pour *Syngap1*^{+/+} contre 29.92 % ± 8.21 pour *Syngap1*^{+/-}; Unpaired t-test P = 0.21). En revanche, lorsque ces tests sont effectuées une semaine après l'entraînement, bien qu'il n'y a pas de différence entre les taux d'immobilisation des souris *Syngap1*^{+/+} et *Syngap1*^{+/-} lors du test de la peur induite par le son conditionné (Figure supplémentaire 2G; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; P = 0.951 pour CS1, CS2 et CS3) nous constatons un taux d'immobilisation plus faible pour les souris *Syngap1*^{+/-} que les souris contrôles *Syngap1*^{+/+} lors du test de la peur induite par le contexte (Figure supplémentaire 2H; 38.39 % ± 4.44 pour *Syngap1*^{+/+} contre

18.72 % \pm 3.15 pour *Syngap1*^{+/-}; Unpaired t-test P = 0.0056). Ces résultats suggèrent que la compétition entre les 2 souvenirs de peurs empêche le second souvenir (souvenir de peur contextuelle) d'être complètement réactivés chez les souris *Syngap1*^{+/-}.

mTOR n'est pas hyperactivé dans le cortex préfrontale, chez les souris *Syngap1*^{+/-} adulte à l'état basal et après stimulation neuronale.

Pour estimer le niveau d'activité de mTOR dans les neurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (PV+), une immunohistochimie fluorescente de pS6, un marqueur de mTOR, et PV pour marquer les neurones exprimant la parvalbumine, fut réalisée chez les souris *Syngap1*^{+/-} dans le cortex préfrontal dans des conditions basales et 30 min après conditionnement de la peur. À l'état d'activité basale, il n'y a pas de différence d'intensité de pS6 entre les neurones PV+ et NeuN+ des souris *Syngap1*^{+/-} et *Syngap1*^{+/+} (Figure supplémentaire 3C; 1.22 \pm 0.09 PV+ *Syngap1*^{+/+} contre 1 \pm 0.08 NeuN+ *Syngap1*^{+/+} contre 1.18 \pm 0.15 PV+ *Syngap1*^{+/-} contre 1.02 \pm 0.18 NeuN+ *Syngap1*^{+/-}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; P = 0.97 pour PV+ *Syngap1*^{+/+} contre PV+ *Syngap1*^{+/-} et NeuN+ *Syngap1*^{+/+} contre NeuN+ *Syngap1*^{+/-}, P = 0.48 pour PV+ *Syngap1*^{+/+} contre NeuN+ *Syngap1*^{+/+} et PV+ *Syngap1*^{+/-} contre NeuN+ *Syngap1*^{+/-}). Après stimulation neuronale, il n'y a pas de différence d'intensité de pS6 entre les neurones PV+ et NeuN+ des souris *Syngap1*^{+/-} et *Syngap1*^{+/+} (Figure supplémentaire 3D; 1.09 \pm 0.28 PV+ *Syngap1*^{+/+} contre 1 \pm 0.15 NeuN+ *Syngap1*^{+/+} contre 0.88 \pm 0.21 PV+ *Syngap1*^{+/-} contre 0.82 \pm 0.11 NeuN+ *Syngap1*^{+/-}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; P = 0.74 pour PV+ *Syngap1*^{+/+} contre PV+ *Syngap1*^{+/-} et NeuN+ *Syngap1*^{+/+} contre NeuN+ *Syngap1*^{+/-}, P = 0.94 pour PV+ *Syngap1*^{+/+} contre NeuN+ *Syngap1*^{+/+} et PV+ *Syngap1*^{+/-} contre NeuN+ *Syngap1*^{+/-}).

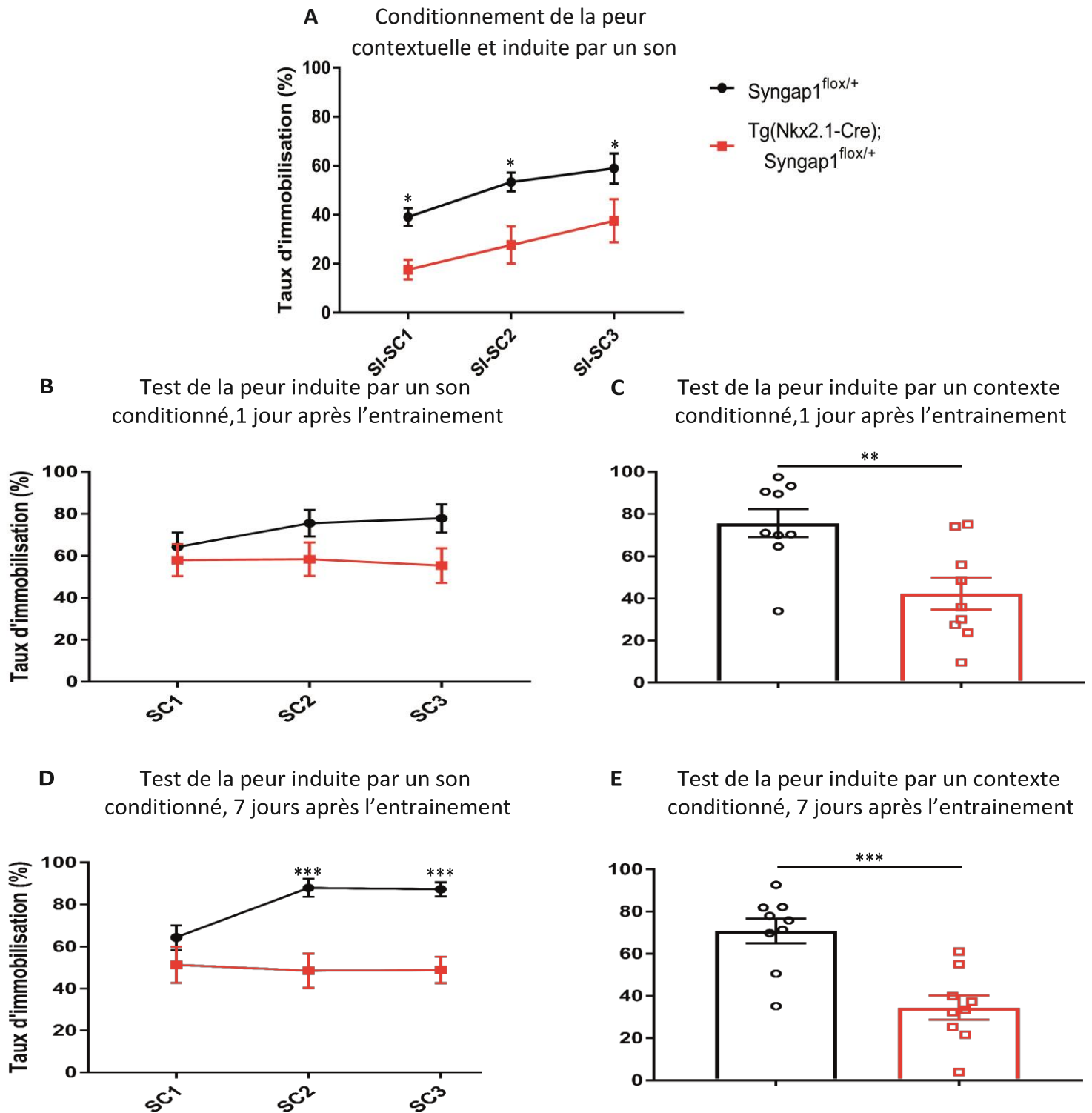


Figure supplémentaire 1. Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} ont un déficit de la mémoire de la peur contextuelle et induite par un son conditionné, une semaine après l'entraînement. (A) Les souris furent placées dans un contexte A, où elles ont subi trois pairages de choc électrique (Stimuli inconditionnés = SI) avec un son (Stimuli conditionnés = SC). Les souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} présentent un taux d'immobilisation plus faible durant l'entraînement que les souris Syngap1^{flox/+} (n = 9 pour Syngap1^{flox/+}, n = 9 pour Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; *P = 0.029 pour SI-SC1 et SI-SC3 et *P = 0.011 pour SI-SC2). (B) Un jour après l'entraînement, les souris furent placées dans un contexte B et le son conditionné (SC) fut présenté trois fois. Les taux d'immobilisations des souris Syngap1^{flox/+} et des souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} n'étaient pas différents lors de la présentation des sons (n = 9 pour Syngap1^{flox/+}, n = 9 pour Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test, P = 0.55 pour SC1, P = 0.19 pour SC2, P = 0.10 pour SC3). (C) Lorsque les souris furent placées dans le contexte A, les souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} avaient un taux d'immobilisation plus faible que les souris Syngap1^{flox/+} (n = 9 pour Syngap1^{flox/+}, n = 9 pour Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Unpaired t test, ***P = 0.0043). (D) Une semaine après l'entraînement, les souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} avaient des taux d'immobilisations plus faibles que les souris Syngap1^{flox/+} lors des présentations du second et troisième son (n = 9 pour Syngap1^{flox/+}, n = 9 pour Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test, P = 0.16 pour SC1, ***P = 0.0002 pour SC2 et SC3). (E) Une semaine après l'entraînement, lorsque les souris furent placées à nouveau dans le contexte A, les souris Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+} avaient un taux d'immobilisation plus faible que les souris Syngap1^{flox/+} (n = 9 pour Syngap1^{flox/+}, n = 9 pour Tg(Nkx2.1-Cre); Syngap1^{flox/+}; Unpaired t test; ***P = 0.0004). Les barres sur le graphique représentent la moyenne ± l'erreur type standard, les cercles représentent les valeurs pour chaque souris analysée.

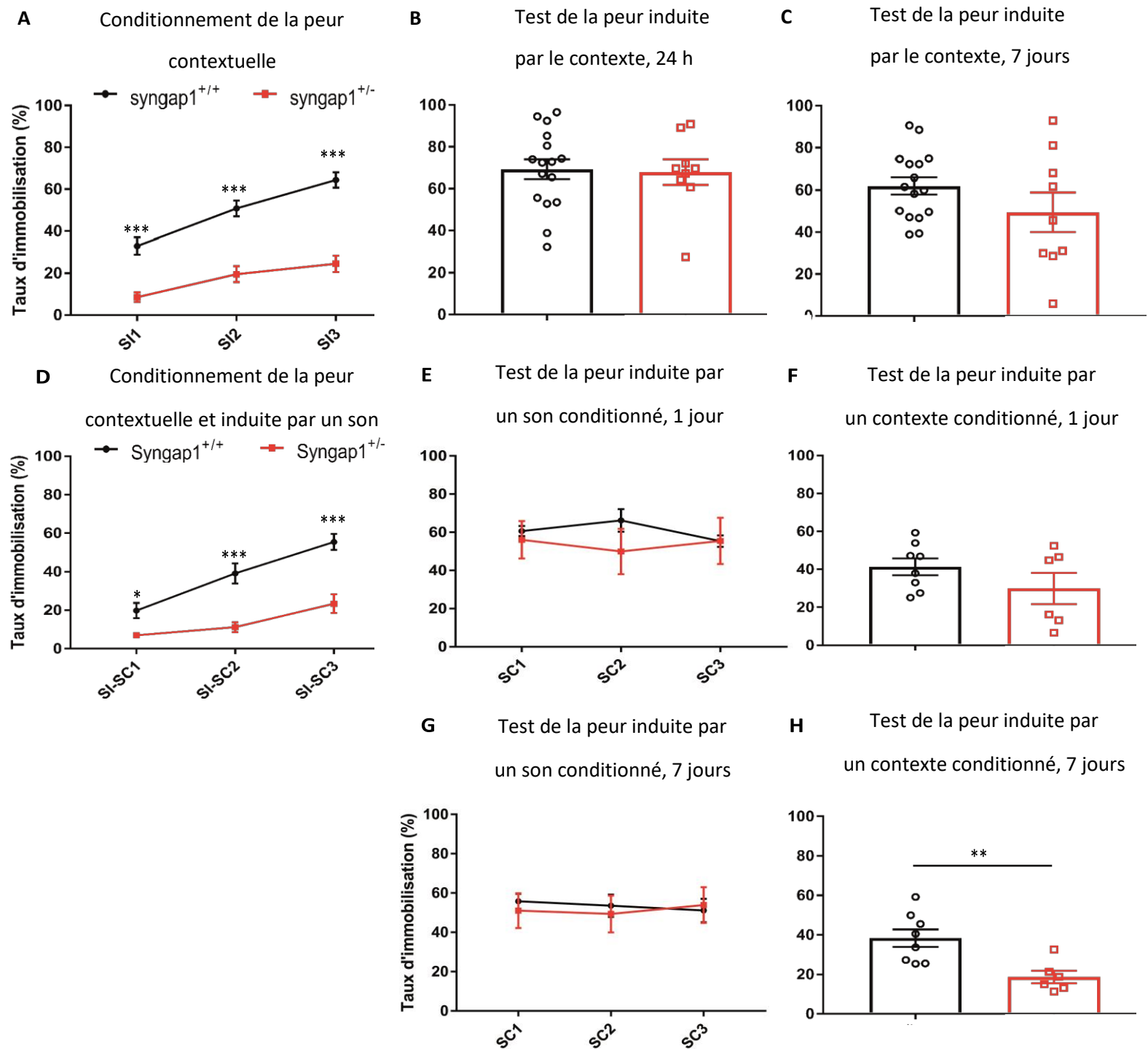
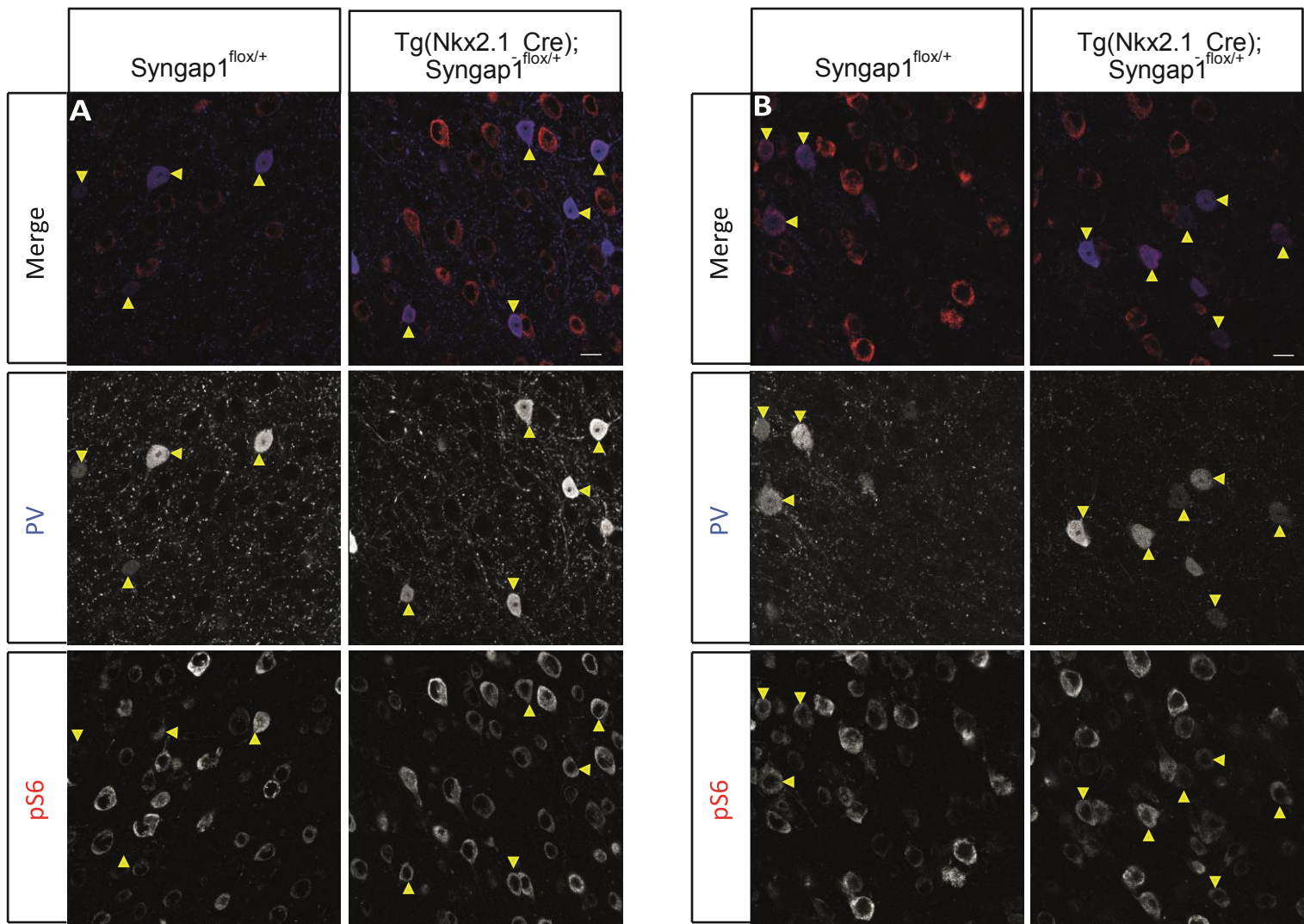
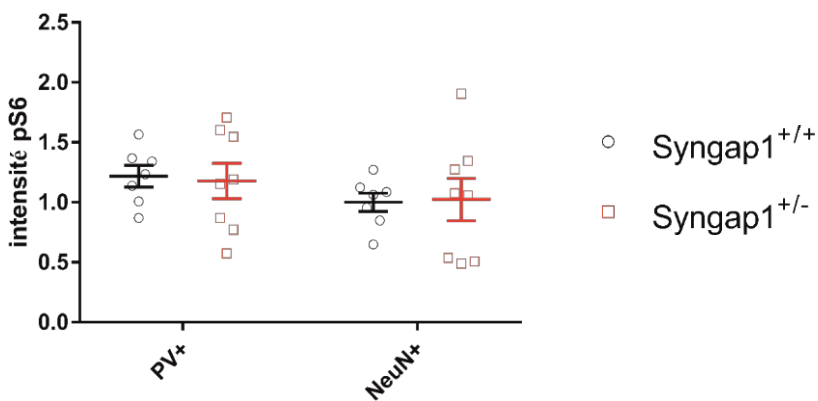


Figure supplémentaire 2. Les souris *Syngap1*^{+/-} ont un déficit de mémoire de la peur contextuelle uniquement lorsque le souvenir de peur induit par le contexte sont en compétition avec le souvenir de peur induit par le son. (A) Les souris adultes furent placées dans un contexte où elles ont été soumises à trois chocs électriques (SI). Les taux d'immobilisation des souris *Syngap1*^{+/-} étaient plus faibles que celui des souris *Syngap1*^{+/+} durant l'entraînement (n = 16 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 9 pour *Syngap1*^{+/-}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; ***P < 0.0001 pour SI1, SI2 et SI3). (B) Un jour après l'entraînement, les souris furent placées dans le même contexte pendant 5 min pour tester la mémoire contextuelle long-terme. Les souris *Syngap1*^{+/-} avaient un taux d'immobilisation similaires aux souris *Syngap1*^{+/+} (n = 16 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 9 pour *Syngap1*^{+/-}; Unpaired t-test P = 0.086). (C) Une semaine après l'entraînement, il n'y a pas de différence entre les taux d'immobilisations des souris *Syngap1*^{+/-} et *Syngap1*^{+/+} (n = 16 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 9 pour *Syngap1*^{+/-}; Unpaired t test P = 0.17). (D) Les souris furent placées dans un contexte A, où elles ont subi trois pairages de choc électrique (stimuli inconditionné = SI) avec un son (Stimuli conditionné = SC). Les souris *Syngap1*^{+/-} présentent un taux d'immobilisation plus faible durant l'entraînement que les souris *Syngap1*^{+/+} (n = 8 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 6 pour *Syngap1*^{+/-}; ; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; SI-SC1 *P = 0.036; SI-SC2 and SI-SC3 ***P < 0.0001). (E) Un jour après l'entraînement, lors des présentations du son, les taux d'immobilisations des souris *Syngap1*^{+/-} ne diffèrent pas de ceux des souris *Syngap1*^{+/+} (n = 8 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 6 pour *Syngap1*^{+/-}; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; CS1 P = 0.89, CS2 P = 0.36, CS3 P = 0.99). (F) Un jour après l'entraînement, lorsque les souris furent placées dans le contexte A, il n'y avait pas de différence entre le taux d'immobilisation des souris *Syngap1*^{+/-} et des souris *Syngap1*^{+/+} (n = 8 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 6 pour *Syngap1*^{+/-}; Unpaired t-test P = 0.21). (G) Une semaine après l'entraînement, lors des présentations du son, le taux d'immobilisation des souris *Syngap1*^{+/-} était similaire au taux d'immobilisation des souris *Syngap1*^{+/+} (n = 8 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 6 pour *Syngap1*^{+/-}; ; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; P = 0.951 pour CS1, CS2 et CS3). (H) Une semaine après l'entraînement, le test de la peur induite par le contexte indique un taux d'immobilisation plus faibles pour les souris *Syngap1*^{+/-} que les souris *Syngap1*^{+/+} (n = 8 pour *Syngap1*^{+/+} et n = 6 pour *Syngap1*^{+/-}; Unpaired t-test **P = 0.0056).



C Cortex préfrontal - naive



D Cortex préfrontal - Après le conditionnement de la peur

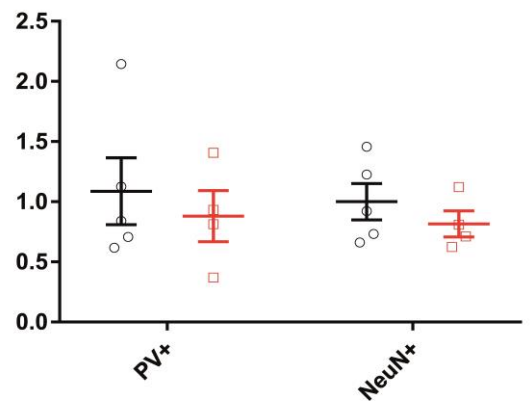


Figure supplémentaire 3. Dans le cortex préfrontal des souris $Syngap1^{+/-}$ adulte, mTOR n'est pas hyperactivé à l'état basal et après stimulation neuronale. (A, B) Image confocale du cortex prélimbique de souris adulte montre des neurones PV+ (bleu) et l'expression de pS6 (rouge) à un niveau d'activité neuronale basale (A) et 20 min après le conditionnement de la peur (B). (C) À un niveau basal d'activité, l'intensité de fluorescence de pS6 ne diffère pas selon le type de cellule et le génotype ($n = 7$ pour $Syngap1^{+/+}$; $n = 8$ pour $Syngap1^{+/-}$; Two Way ANOVA post hoc sidak's multiple comparisons test; $P = 0.97$ pour PV+ $Syngap1^{+/+}$ contre PV+ $Syngap1^{+/-}$ et PV- $Syngap1^{+/+}$ contre PV- $Syngap1^{+/-}$, $P = 0.48$ pour PV+ $Syngap1^{+/+}$ contre PV- $Syngap1^{+/+}$ et PV+ $Syngap1^{+/-}$ contre PV- $Syngap1^{+/-}$). (D) 20 min après le conditionnement de la peur, l'intensité de fluorescence de pS6 est similaire entre les neurones PV+ et PV- des deux génotypes ($n = 5$ pour $Syngap1^{+/+}$; $n = 4$ pour $Syngap1^{+/-}$; Two-Way ANOVA post hoc Sidak's multiple comparisons test; $P = 0.74$ pour PV+ $Syngap1^{+/+}$ contre PV+ $Syngap1^{+/-}$ et PV- $Syngap1^{+/+}$ contre PV- $Syngap1^{+/-}$, $P = 0.94$ pour PV+ $Syngap1^{+/+}$ contre PV- $Syngap1^{+/+}$ et PV+ $Syngap1^{+/-}$ contre PV- $Syngap1^{+/-}$). Les barres sur le graphique représentent la moyenne \pm l'erreur type standard, les cercles représentent les valeurs pour chaque souris analysée. Échelle, 10 μm .

Chapitre IV : Discussion

Une limitation de notre étude est le manque de diversification dans les méthodes utilisées afin de monitorer le niveau d'activité de mTOR. Nous nous sommes basés sur des études précédentes qui monitorent le niveau d'activité de mTOR par immunofluorescence avec des anticorps contre pS6, un marqueur d'activité de mTOR¹⁵³. Néanmoins l'immunofluorescence est une méthode semi-quantitative et le degré de sensibilité inférieur de cette méthode peut engendrer des variabilités dans les résultats obtenus. De fait, nos résultats obtenus avec les immunofluorescences chez les souris *Syngap1*^{+/-} sont en contradiction avec la littérature¹. Aceti et al ont observé une augmentation de l'intensité de fluorescence de pS6 dans les neurones principaux du cortex préfrontal chez des jeunes souris (P4). Une différence importante est que nos immunofluorescences étaient réalisées sur des tissus de souris adultes. Aussi, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence dans le cytoplasme des neurones, pas seulement au niveau des synapses où *Syngap1* agit sur mTOR. Une approche alternative serait d'isoler les protéines du synaptosomes, et réaliser un SDS-PAGE et Western blot. Cette approche donnerait des mesures plus précises de l'activité de mTOR dans l'espace. Pour ce qui est de quantifier séparément le niveau d'activité de mTOR dans les interneurones exprimant la parvalbumine et les cellules pyramidales, il serait possible d'isoler les types cellulaires par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) et comparer les niveaux d'expression protéique par western blot.

Nous avons employé différentes méthodes de traitement avec lovastatine sans réussir à corriger les déficits cognitifs cependant, la qualité de l'administration des traitements peut être améliorée. Nous avons d'abord essayé de traiter les souris avec des administrations orales de lovastatine afin de limiter le stress des injections ou du gavage. Nous procédions en mixant la lovastatine dans des morceaux durs de beurre de cacahuète. Les souris mangeaient les produits sans difficulté mais nous ne savions pas quelle quantité de lovastatine se rendait jusqu'aux neurones. La lovastatine est liposoluble mais par voie orale, nous ne savions pas quelle quantité de lovastatine était absorbée dans l'intestin ou métabolisé par le foie. Une étude pharmacocinétique pourrait être envisager afin de déterminer si l'administration de la lovastatine par voie orale est pertinent pour traiter une hyperactivation de Ras dans les neurones. Par la suite, nous avons opté pour un traitement par injection sous-cutanée. La

lovastatine étant liposoluble nous avons utilisé une pate (Kolliphor HS15) afin de la dissoudre dans une solution aqueuse. La solution obtenue était visqueuse mais pouvait être injecté au niveau du cou des souris. Néanmoins, il était difficile de déterminer si la solution visqueuse traversait dans les vaisseaux sanguins, arrivait jusqu'au cerveau et pénétrait dans les neurones. Les injections intra-veineuses au niveau de la queue des souris n'ont pas été testé mais pourrait être une alternative à ces deux traitements : Bien que plus stressant que les injections sous-cutanées, l'avantage des injections intra-veineuses est que la solution sera directement présente dans le sang. Enfin, un marqueur de l'effet de statine devrait être utilisé afin de s'assurer de la présence de lovastatine dans les neurones.

En général, les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+} présentent des déficits plus amples que les souris *Syngap1*^{+/-} que ce soit pour les test de la peur contextuelle et induite par le son ou le niveau d'hyperactivation de mTOR dans les neurones PV+. Ce phénomène est probablement dû aux déséquilibres entre l'excitation et l'inhibition qui complique la transmission précise et l'encodage des informations^{151,186}. Nous avons observé que les souris *Syngap1*^{+/-} ont un déficit de mémoire de la peur contextuelle seulement lorsque le souvenir est en compétition avec le souvenir de peur induite par le son (Figure supplémentaire 2). Ces résultats sont en contradiction avec les résultats précédents rapportés par Guo et al qui ont montré un déficit de la mémoire induite par le son mais pas de déficit de la mémoire de la peur contextuelle⁶². En examinant les protocoles expérimentaux employés par les deux groupes nous constatons que les tests pour lesquels les souris *Syngap1*^{+/-} sont déficientes sont les tests présentés en dernier (test de la peur induite par le contexte pour notre groupe, test de la peur induite par le son pour Guo et al.), 2 ou 4 heures après le premier test de la journée (test de la peur induite par le son pour notre groupe, test de la peur induite par le contexte pour Guo et al). Ces résultats suggèrent que ce n'est pas la modalité du stimulus qui engendre le déficit mais l'ordre de présentation des stimulus, donc l'ordre réactivation des ensemble neuronaux qui codent ces stimulus. Des stimulus présentés proche dans le temps sont encodés par les mêmes ensemble neuronaux¹⁷. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe une compétition entre les ensembles neuronaux qui encodent le contexte et le son car ceux-ci sont composés des mêmes neurones puisqu'ils furent encodés proche dans le temps. Lorsque le premier ensemble neuronal est activé par le premier test il reste actif pendant au moins 6 heures¹⁴⁷, donc lorsque le second test est réalisé 2 à 4 heures après le premier, le second

ensemble neuronal ne peut pas être activé au complet, causant les déficits de la mémoire observés. Il est important de noter que les protocoles des tests expérimentaux de notre groupe et Guo et al diffèrent : L'intervalle de temps entre les deux tests pour notre groupe étaient de 2 heures tandis qu'il était de 4 heures pour Guo et al. Aussi, lors du test de la peur induite par le son nous avons présenté le son trois fois pendant 30 secondes avec des périodes d'une minute de repos entre chaque présentation tandis que Guo et al ont présenté le son pendant 3 minutes consécutives. Pour confirmer l'hypothèse de compétition entre les ensembles neuronaux nous devons procéder en deux étapes : Tout d'abord, il faut répéter l'expérience au complet, c'est-à-dire réaliser les tests de peur induite par le contexte et induite par le son dans les deux ordres possibles en conservant le même protocole de présentation des sons pour chaque ordre. Enfin, ils seraient intéressants de voir dans quelle région du cerveau la compétition entre les ensembles neuronaux peut avoir lieu. Nous identifions trois régions candidates : l'amygdale latérale¹⁴⁷, qui reçoit des informations sensorielles auditives et somatosensorielle, est un lieu d'association entre les stimulus et le choc. Le cortex préfrontal, important pour les conditionnements du contexte et du son^{27,150}. Et l'hippocampe, même si son rôle pour le conditionnement de la peur induit par un son est limité.

Nos résultats suggèrent que mTOR est également hyperactivé dans les neurones GABAergiques des souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+}. Quel est l'impact d'une hyperactivation de mTOR dans les cellules GABAergiques ? Une étude précédente a montré que la régulation de SYNGAP1 sur mTOR dans les neurones glutamatergiques permet de limiter la synthèse des récepteurs AMPA et ainsi, limiter la force synaptique¹⁷⁵. L'haploinsuffisance de *Syngap1* induit une augmentation du ratio AMPA/NMDA¹⁵². Il serait intéressant de voir si l'hyperactivation de mTOR augmente le ratio AMPA/NMDA au niveau des synapse glutamatergique sur les neurones GABAergiques qui ont une haploinsuffisance de *Syngap1*. La force synaptique peut également varier selon la phosphorylation de SYNGAP1 et les isoformes impliqués. Nous avons déjà mentionné dans la discussion de l'article qu'il serait intéressant de déterminer quelle molécule phosphoryle SYNGAP1 dans les neurones GABAergiques puisque CaMKII n'est pas exprimé dans les neurones GABAergiques. Selon le site de phosphorylation SYNGAP1 augmente son activité Ras GTPase ou Rap1 GTPase¹⁷⁴ ce qui peut avoir des effets antagonistes sur la force synaptique. Enfin, les isoformes peuvent avoir des effets opposer sur la force synaptique¹¹⁹. Il

serait donc intéressant de déterminer quel est l'isoforme le plus commun dans les cellules GABAergiques.

Jusqu'à présent le rôle de *Syngap1* a principalement été étudié au niveau de la synapse et pour son rôle dans les phénomènes de plasticité synaptique. Cependant, certains résultats suggèrent que l'haploinsuffisance de *Syngap1* peut avoir un effet à des stades antérieurs du développement, lors de la prolifération, la différenciation et la migration des neurones. Chez le poisson zèbre, bloquer l'expression de *Syngap1* durant l'embryogénèse cause des déficits morphologiques du cerveau et augmente la mort cellulaire⁹⁶. Les souris *Syngap1*^{-/-} meurent durant la première semaine postnatale ce qui indique que *Syngap1* a un rôle vital durant le développement. Une étude a montré une relation entre le taux d'expression de *Syngap1* et la survie des souris. Lorsque le niveau d'expression de *Syngap1* est réduit à 20 à 25% du groupe contrôles les souris mourraient 2 à 3 semaines après la naissance⁹². Si l'expression de *Syngap1* était à 40% ou plus du taux d'expression du groupe contrôle la souris survivait. Cette étude a également rapporté un nombre important de neurones de l'hippocampe en apoptose, suggérant ainsi que *Syngap1* a une fonction de la régulation de l'apoptose⁹². La présence d'apoptose chez les souris *Syngap1*^{+/-} peut être causée par une dérégulation de RAS puisque la signalisation de RAS a été associée à la survie et à la mort cellulaire^{67,98}. SYNGAP1 régule également mTOR, un effecteur connu de l'autophagie et de la croissance cellulaire^{89,176}, impliquant encore plus SYNGAP1 dans le contrôle de ces processus. De plus, une hyperactivation de mTOR au stage embryonnaire induit l'apoptose des progéniteurs neuronaux⁸², un phénotype similaire à ce qui a été observé chez les souris *Syngap1*^{+/-}⁹². SYNGAP1 régule RAP1, une protéine importante pour l'adhésion cellulaire et la dynamique du cytosquelette d'actine. Dans les cas de cancer, il a été montré que l'activité de RAP1 est associée à la migration des cellules cancéreuses⁵⁷. Il est possible que l'haploinsuffisance de *Syngap1* affecte également la migration des neurones en diminuant la régulation de RAP1. Tout comme SYNGAP1, SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) inhibe l'activité de RAP1 à la synapse. En concordance avec l'hypothèse d'un rôle de SYNGAP1 dans la migration neuronale, des mutations de *SHANK3*, un gène lié à l'autisme et la déficience intellectuelle^{35,102} augmentent l'activité de RAP1 et facilite la migration cellulaire¹¹². Enfin, nos résultats préliminaires suggèrent qu'il y a moins de neurones GABAergiques dans l'hippocampe chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{fllox/+}. Si ces résultats se confirment, la

prochaine étape sera de déterminer si cette réduction est dû à un excès de mort cellulaire durant le développement ou un problème de migration des interneurons GABAergiques.

Conclusion

Dans cette étude, nous démontrons que mTOR est hyperactivé dans les cellules à panier exprimant la parvalbumine dans le cortex préfrontal dans des conditions basales et dans le cortex préfrontal et l'amygdale basolatérale après conditionnement de la peur chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+}. De plus, nous montrons que deux modèles de souris, qui ont une hyperactivation de mTOR dans les interneurons exprimant la parvalbumine, ont des déficits de la mémoire de la peur contextuelle. Des traitements avec la lovastatine n'ont pas normalisé la signalisation de mTOR et le déficit de la mémoire contextuelle chez les souris Tg(Nkx2.1-Cre); *Syngap1*^{flox/+}. Enfin la perte spécifique de *Syngap1* dans les interneurons PV+ pendant la seconde semaine postnatale ne cause pas de déficits de la peur contextuelle, suggérant que les déficits cognitifs présents chez l'adulte sont dus à des altérations qui se produisent tôt durant le développement neuronal.

L'haploinsuffisance de *Syngap1* cause la déficience intellectuelle chez les humains. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont permis de révéler la fonction synaptique de SYNGAP1 et les mécanismes et voies moléculaires qui sont affectés par l'haploinsuffisance de *Syngap1* dans les neurones glutamatergiques et GABAergiques. Contrairement à d'autres modèles de déficience intellectuelle chez les souris tel que Noonan Syndrome, Syndrome X Fragile et Neurofibromatose, les traitements chez les souris adulte avec des mutations de *Syngap1* ne semblent pas améliorer les capacités cognitives des souris. En vue de ces résultats et du rôle de régulateur de *Syngap1* sur RAS et mTOR, les efforts de recherches devraient se concentrer sur la fonction et le rôle de SYNGAP1 durant le développement neuronal et la mise en place de la circuiterie neuronale.

Bibliographie

1. Aceti, M., Creson, T. K., Vaissiere, T., Rojas, C., Huang, W.-C., Wang, Y.-X., Rumbaugh, G. (2015). Syngap1 haploinsufficiency damages a postnatal critical period of pyramidal cell structural maturation linked to cortical circuit assembly. *Biological Psychiatry*, 77(9), 805–815.
2. Agmon, A., & Connors, B. W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, 41(2–3), 365–379.
3. American Psychiatric Publishing. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th edition).
4. Andrews-Zwilling, Y., Gillespie, A. K., Kravitz, A. V., Nelson, A. B., Devidze, N., Lo, I., Huang, Y. (2012). Hilar GABAergic interneuron activity controls spatial learning and memory retrieval. *PloS One*, 7(7), e40555.
5. Araki, Y., Zeng, M., Zhang, M., & Huganir, R. L. (2015). Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP. *Neuron*, 85(1), 173–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.023>
6. Banko, J. L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C. T., Sonenberg, N., & Klann, E. (2005). The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(42), 9581–9590. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2423-05.2005>
7. Barnett, M. W., Watson, R. F., Vitalis, T., Porter, K., Komiyama, N. H., Stoney, P. N., Kind, P. C. (2006). Synaptic Ras GTPase activating protein regulates pattern formation in the trigeminal system of mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(5), 1355–1365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3164-05.2006>
8. Bateup, H. S., Johnson, C. A., Deneffrio, C. L., Saulnier, J. L., Kornacker, K., & Sabatini, B. L. (2013). Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of tuberous sclerosis. *Neuron*, 78(3), 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.017>

9. Berryer, M. H., Chattopadhyaya, B., Xing, P., Riebe, I., Bosoi, C., Sanon, N., ... Di Cristo, G. (2016). Decrease of SYNGAP1 in GABAergic cells impairs inhibitory synapse connectivity, synaptic inhibition and cognitive function. *Nature Communications*, 7, 13340. <https://doi.org/10.1038/ncomms13340>
10. Berryer, M. H., Hamdan, F. F., Klitten, L. L., Møller, R. S., Carmant, L., Schwartzentruber, J., ... Di Cristo, G. (2013). Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism, and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency. *Human Mutation*, 34(2), 385–394. <https://doi.org/10.1002/humu.22248>
11. Bhakar, A. L., Dölen, G., & Bear, M. F. (2012). The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annual Review of Neuroscience*, 35, 417–443. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153138>
12. Bienvenu, T., Poirier, K., Friocourt, G., Bahi, N., Beaumont, D., Fauchereau, F., ... Chelly, J. (2002). ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Human Molecular Genetics*, 11(8), 981–991.
13. Biever, A., Valjent, E., & Puighermanal, E. (2015). Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8, 75. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00075>
14. Buiting, K., Saitoh, S., Gross, S., Dittrich, B., Schwartz, S., Nicholls, R. D., & Horsthemke, B. (1995). Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature Genetics*, 9(4), 395–400. <https://doi.org/10.1038/ng0495-395>
15. Buzsáki, G., & Wang, X.-J. (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 203–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>
16. Buzsáki, G., & Watson, B. O. (2012). Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(4), 345–367.
17. Cai, D. J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., ... Silva, A. J. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*, 534(7605), 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature17955>

18. Calderwood, D. A. (2004). Talin controls integrin activation. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt3), 434–437. <https://doi.org/10.1042/BST0320434>
19. Caputi, A., Rozov, A., Blatow, M., & Monyer, H. (2009). Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 19(6), 1345–1359. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn175>
20. Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., ... Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, 459(7247), 663–667. <https://doi.org/10.1038/nature08002>
21. Carlisle, H. J., Manzerra, P., Marcora, E., & Kennedy, M. B. (2008). SynGAP regulates steady-state and activity-dependent phosphorylation of cofilin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(50), 13673–13683. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4695-08.2008>
22. Carvill, G. L., Heavin, S. B., Yendle, S. C., McMahon, J. M., O’Roak, B. J., Cook, J., ... Mefford, H. C. (2013). Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature Genetics*, 45(7), 825–830. <https://doi.org/10.1038/ng.2646>
23. Chattopadhyaya, B., & Cristo, G. D. (2012). GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Psychiatry*, 3, 51. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00051>
24. Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Chérif, B., & Bienvenu, T. (2006). Genetics and pathophysiology of mental retardation. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 14(6), 701–713. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201595>
25. Chen, H. J., Rojas-Soto, M., Oguni, A., & Kennedy, M. B. (1998). A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron*, 20(5), 895–904.
26. Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., ... Greenberg, M. E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5646), 885–889. <https://doi.org/10.1126/science.1086446>
27. Chen, Y.-H., Lan, Y.-J., Zhang, S.-R., Li, W.-P., Luo, Z.-Y., Lin, S., ... Gao, T.-M.

- (2017). ErbB4 signaling in the prelimbic cortex regulates fear expression. *Translational Psychiatry*, 7(7), e1168. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.139>
28. Chiang, H.-L., Liu, C.-J., Hu, Y.-W., Chen, S.-C., Hu, L.-Y., Shen, C.-C., ... Gau, S. S.-F. (2015). Risk of cancer in children, adolescents, and young adults with autistic disorder. *The Journal of Pediatrics*, 166(2), 418-423.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.10.029>
29. Clement, J. P., Aceti, M., Creson, T. K., Ozkan, E. D., Shi, Y., Reish, N. J., ... Rumbaugh, G. (2012). Pathogenic SYNGAP1 mutations impair cognitive development by disrupting maturation of dendritic spine synapses. *Cell*, 151(4), 709–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.045>
30. Clement, J. P., Ozkan, E. D., Aceti, M., Miller, C. A., & Rumbaugh, G. (2013). SYNGAP1 links the maturation rate of excitatory synapses to the duration of critical-period synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(25), 10447–10452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0765-13.2013>
31. Cohen, S. M., Ma, H., Kuchibhotla, K. V., Watson, B. O., Buzsáki, G., Froemke, R. C., & Tsien, R. W. (2016). Excitation-Transcription Coupling in Parvalbumin-Positive Interneurons Employs a Novel CaM Kinase-Dependent Pathway Distinct from Excitatory Neurons. *Neuron*, 90(2), 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.001>
32. Colasante, G., Simonet, J. C., Calogero, R., Crispi, S., Sessa, A., Cho, G., ... Broccoli, V. (2015). ARX regulates cortical intermediate progenitor cell expansion and upper layer neuron formation through repression of Cdkn1c. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 25(2), 322–335. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht222>
33. Cornelia Koeberle, S., Tanaka, S., Kuriu, T., Iwasaki, H., Koeberle, A., Schulz, A., ... Okabe, S. (2017). Developmental stage-dependent regulation of spine formation by calcium-calmodulin-dependent protein kinase II α and Rap1. *Scientific Reports*, 7(1), 13409. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13728-y>
34. Costa, R. M., & Silva, A. J. (2002). Molecular and cellular mechanisms underlying the cognitive deficits associated with neurofibromatosis 1. *Journal of Child Neurology*, 17(8), 622–626; discussion 627-629, 646–651.

<https://doi.org/10.1177/088307380201700813>

35. Costales, J. L., & Kolevzon, A. (2015). Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *12*(3), 620–630. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0352-z>
36. Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R. R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., ... Herry, C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*, *505*(7481), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature12755>
37. Cracco, J. B., Serrano, P., Moskowitz, S. I., Bergold, P. J., & Sacktor, T. C. (2005). Protein synthesis-dependent LTP in isolated dendrites of CA1 pyramidal cells. *Hippocampus*, *15*(5), 551–556. <https://doi.org/10.1002/hipo.20078>
38. Crair, M. C., & Malenka, R. C. (1995). A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*, *375*(6529), 325–328. <https://doi.org/10.1038/375325a0>
39. Cui, Y., Costa, R. M., Murphy, G. G., Elgersma, Y., Zhu, Y., Gutmann, D. H., ... Silva, A. J. (2008). Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell*, *135*(3), 549–560. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.060>
40. Cuthbert, P. C., Stanford, L. E., Coba, M. P., Ainge, J. A., Fink, A. E., Opazo, P., ... Grant, S. G. N. (2007). Synapse-associated protein 102/dlgh3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(10), 2673–2682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4457-06.2007>
41. Daily, D. K., Ardinger, H. H., & Holmes, G. E. (2000). Identification and evaluation of mental retardation. *American Family Physician*, *61*(4), 1059–1067, 1070.
42. Deidda, G., Parrini, M., Naskar, S., Bozarth, I. F., Contestabile, A., & Cancedda, L. (2015). Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nature Medicine*, *21*(4), 318–326. <https://doi.org/10.1038/nm.3827>
43. Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, *504*(7479), 272–276. <https://doi.org/10.1038/nature12866>

44. Duffney, L. J., Zhong, P., Wei, J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., ... Yan, Z. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Reports*, *11*(9), 1400–1413. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.064>
45. Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D. J., ... Silva, A. J. (2008). Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, *14*(8), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nm1788>
46. Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, *62*(6), 757–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>
47. Ellison, J. W., Rosenfeld, J. A., & Shaffer, L. G. (2013). Genetic basis of intellectual disability. *Annual Review of Medicine*, *64*, 441–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140053>
48. Ernst, C. (2016). Proliferation and Differentiation Deficits are a Major Convergence Point for Neurodevelopmental Disorders. *Trends in Neurosciences*, *39*(5), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.03.001>
49. Feldman, D. E., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1999). Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *Journal of Neurobiology*, *41*(1), 92–101.
50. Fenton, T. R., & Gout, I. T. (2011). Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *43*(1), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.018>
51. Francipane, M. G., & Lagasse, E. (2014). mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget*, *5*(1), 49–66. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1548>
52. Frazier, T. W., Embacher, R., Tilot, A. K., Koenig, K., Mester, J., & Eng, C. (2015). Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism. *Molecular Psychiatry*, *20*(9), 1132–1138. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.125>
53. Gelman, D. M., Martini, F. J., Nóbrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessar, N., & Marín, O. (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for*

- Neuroscience*, 29(29), 9380–9389. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-09.2009>
54. Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), 1028–1032.
55. Gibson, J. R., Beierlein, M., & Connors, B. W. (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature*, 402(6757), 75–79. <https://doi.org/10.1038/47035>
56. Gkogkas, C. G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D. B., ... Sonenberg, N. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*, 493(7432), 371–377. <https://doi.org/10.1038/nature11628>
57. Glocrich, M., & Bos, J. L. (2011). Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.001>
58. Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L. R., & Jones, K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6309–6314. <https://doi.org/20026564>
59. Greer, P. L., Hanayama, R., Bloodgood, B. L., Mardinly, A. R., Lipton, D. M., Flavell, S. W., ... Greenberg, M. E. (2010). The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*, 140(5), 704–716. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.026>
60. Grewal, S. S., Horgan, A. M., York, R. D., Withers, G. S., Banker, G. A., & Stork, P. J. (2000). Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3722–3728.
61. Gripp, K. W., & Lin, A. E. (2012). Costello syndrome: a Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 14(3), 285–292. <https://doi.org/10.1038/gim.0b013e31822dd91f>
62. Guo, X., Hamilton, P. J., Reish, N. J., Sweatt, J. D., Miller, C. A., & Rumbaugh, G. (2009). Reduced expression of the NMDA receptor-interacting protein SynGAP causes behavioral abnormalities that model symptoms of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of*

- Neuropsychopharmacology*, 34(7), 1659–1672. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.223>
63. Hamdan, F. F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.-T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., ... Michaud, J. L. (2011). Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*, 88(3), 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.001>
64. Hamdan, F. F., Gauthier, J., Spiegelman, D., Noreau, A., Yang, Y., Pellerin, S., ... Synapse to Disease Group. (2009). Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *The New England Journal of Medicine*, 360(6), 599–605. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805392>
65. Hayashi, K., Ohshima, T., Hashimoto, M., & Mikoshiba, K. (2007). Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Developmental Neurobiology*, 67(5), 655–669. <https://doi.org/10.1002/dneu.20363>
66. Helmstetter, F. J., Parsons, R. G., & Gafford, G. M. (2008). Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.09.002>
67. Henkemeyer, M., Rossi, D. J., Holmyard, D. P., Puri, M. C., Mbamalu, G., Harpal, K., ... Pawson, T. (1995). Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature*, 377(6551), 695–701. <https://doi.org/10.1038/377695a0>
68. Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(11), 877–888. <https://doi.org/10.1038/nrn1787>
69. Hestrin, S., & Galarreta, M. (2005). Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends in Neurosciences*, 28(6), 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.001>
70. Holtmaat, A., & Caroni, P. (2016). Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1553–1562. <https://doi.org/10.1038/nn.4418>
71. Howard, M. W., Rizzuto, D. S., Caplan, J. B., Madsen, J. R., Lisman, J., Aschenbrenner-Scheibe, R., ... Kahana, M. J. (2003). Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 13(12), 1369–1374.

72. Huang, Y. Y., Nguyen, P. V., Abel, T., & Kandel, E. R. (1996). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 3(2–3), 74–85.
73. Huynh, D. P., Maalouf, M., Silva, A. J., Schweizer, F. E., & Pulst, S. M. (2009). Dissociated fear and spatial learning in mice with deficiency of ataxin-2. *PloS One*, 4(7), e6235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006235>
74. Isaac, J. T., Crair, M. C., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1997). Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron*, 18(2), 269–280.
75. Jeon, S. J., Kim, J.-W., Kim, K. C., Han, S. M., Go, H. S., Seo, J. E., ... Song, M.-R. (2014). Translational regulation of NeuroD1 expression by FMRP: involvement in glutamatergic neuronal differentiation of cultured rat primary neural progenitor cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(2), 297–305. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-0014-9>
76. Jeyabalan, N., & Clement, J. P. (2016). SYNGAP1: Mind the Gap. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 32. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00032>
77. Jiang, X., Shen, S., Cadwell, C. R., Berens, P., Sinz, F., Ecker, A. S., ... Tolias, A. S. (2015). Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6264), aac9462. <https://doi.org/10.1126/science.aac9462>
78. Jones, E. G., Huntley, G. W., & Benson, D. L. (1994). Alpha calcium/calmodulin-dependent protein kinase II selectively expressed in a subpopulation of excitatory neurons in monkey sensory-motor cortex: comparison with GAD-67 expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(2), 611–629.
79. Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(9), 521–534. <https://doi.org/10.1038/nrn4000>
80. Ka, M., Smith, A. L., & Kim, W.-Y. (2017). MTOR controls genesis and autophagy of GABAergic interneurons during brain development. *Autophagy*, 13(8), 1348–1363. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1327927>
81. Karunakaran, S., Chowdhury, A., Donato, F., Quairiaux, C., Michel, C. M., & Caroni, P. (2016). PV plasticity sustained through D1/5 dopamine signaling required for long-

- term memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 19(3), 454–464.
<https://doi.org/10.1038/nn.4231>
82. Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., & Aiba, A. (2014). Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell Reports*, 7(5), 1626–1639.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.048>
83. Kaufman, L., Ayub, M., & Vincent, J. B. (2010). The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 2(4), 182–209. <https://doi.org/10.1007/s11689-010-9055-2>
84. Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 7(6), 476–486.
85. Kepecs, A., & Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505(7483), 318–326. <https://doi.org/10.1038/nature12983>
86. Kilinc, M., Creson, T., Rojas, C., Aceti, M., Ellegood, J., Vaissiere, T., ... Rumbaugh, G. (2018). Species-conserved SYNGAP1 phenotypes associated with neurodevelopmental disorders. *Molecular and Cellular Neurosciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.03.008>
87. Kim, H., Ährlund-Richter, S., Wang, X., Deisseroth, K., & Carlén, M. (2016). Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. *Cell*, 164(1–2), 208–218.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.038>
88. Kim, J. H., Liao, D., Lau, L. F., & Haganir, R. L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*, 20(4), 683–691.
89. Kim, J. Y., Duan, X., Liu, C. Y., Jang, M.-H., Guo, J. U., Pow-anpongkul, N., ... Ming, G. (2009). DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*, 63(6), 761–773.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.008>
90. Kim, Jee Hae, Lee, H.-K., Takamiya, K., & Haganir, R. L. (2003). The role of synaptic GTPase-activating protein in neuronal development and synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1119–1124.

91. Kloog, null, Cox, null, & Sinensky, null. (1999). Concepts in Ras-directed therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 8(12), 2121–2140. <https://doi.org/10.1517/13543784.8.12.2121>
92. Knuesel, I., Elliott, A., Chen, H.-J., Mansuy, I. M., & Kennedy, M. B. (2005a). A role for synGAP in regulating neuronal apoptosis. *The European Journal of Neuroscience*, 21(3), 611–621. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03908.x>
93. Knuesel, I., Elliott, A., Chen, H.-J., Mansuy, I. M., & Kennedy, M. B. (2005b). A role for synGAP in regulating neuronal apoptosis. *The European Journal of Neuroscience*, 21(3), 611–621. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03908.x>
94. Komiyama, N. H., Watabe, A. M., Carlisle, H. J., Porter, K., Charlesworth, P., Monti, J., ... Grant, S. G. N. (2002). SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(22), 9721–9732.
95. Koukoui, S. D., & Chaudhuri, A. (2007). Neuroanatomical, molecular genetic, and behavioral correlates of fragile X syndrome. *Brain Research Reviews*, 53(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.001>
96. Kozol, R. A., Cukier, H. N., Zou, B., Mayo, V., De Rubeis, S., Cai, G., ... Dallman, J. E. (2015). Two knockdown models of the autism genes SYNGAP1 and SHANK3 in zebrafish produce similar behavioral phenotypes associated with embryonic disruptions of brain morphogenesis. *Human Molecular Genetics*, 24(14), 4006–4023. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv138>
97. Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S., & Clapham, D. E. (2004). SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron*, 43(4), 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.003>
98. Kurada, P., & White, K. (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell*, 95(3), 319–329.
99. Laclef, C., & Métin, C. (2018). Conserved rules in embryonic development of cortical interneurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 76, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.017>

100. Lafuente, E. M., van Puijenbroek, A. A. F. L., Krause, M., Carman, C. V., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., ... Boussiotis, V. A. (2004). RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Developmental Cell*, 7(4), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.021>
101. Laumonnier, F., Cuthbert, P. C., & Grant, S. G. N. (2007). The role of neuronal complexes in human X-linked brain diseases. *American Journal of Human Genetics*, 80(2), 205–220. <https://doi.org/10.1086/511441>
102. Leblond, C. S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., ... Bourgeron, T. (2014). Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genetics*, 10(9), e1004580. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004580>
103. Lee, S., Kim, S.-J., Kwon, O.-B., Lee, J. H., & Kim, J.-H. (2013). Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 129. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00129>
104. Lee, Y.-S., Ehninger, D., Zhou, M., Oh, J.-Y., Kang, M., Kwak, C., ... Silva, A. J. (2014). Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nature Neuroscience*, 17(12), 1736–1743. <https://doi.org/10.1038/nn.3863>
105. Lejeune, J., Gautier, M., & Turpin, R. (1959). [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences*, 248(11), 1721–1722.
106. Levenga, J., Krishnamurthy, P., Rajamohamedsait, H., Wong, H., Franke, T. F., Cain, P., ... Hoeffler, C. A. (2013). Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity and behavioral impairments. *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 34. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-34>
107. Levy, A. D., Omar, M. H., & Koleske, A. J. (2014). Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 116. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00116>
108. Li, H., Zhong, X., Chau, K. F., Santistevan, N. J., Guo, W., Kong, G., ... Chang, Q. (2014). Cell cycle-linked MeCP2 phosphorylation modulates adult neurogenesis involving the Notch signalling pathway. *Nature Communications*, 5, 5601.

<https://doi.org/10.1038/ncomms6601>

109. Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metabolism*, *19*(3), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>
110. Li, W., Okano, A., Tian, Q. B., Nakayama, K., Furihata, T., Nawa, H., & Suzuki, T. (2001). Characterization of a novel synGAP isoform, synGAP-beta. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(24), 21417–21424. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010744200>
111. Li, Weidong, Cui, Y., Kushner, S. A., Brown, R. A. M., Jentsch, J. D., Frankland, P. W., ... Silva, A. J. (2005). The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Current Biology: CB*, *15*(21), 1961–1967. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.043>
112. Lilja, J., Zacharchenko, T., Georgiadou, M., Jacquemet, G., De Franceschi, N., Peuhu, E., ... Ivaska, J. (2017). SHANK proteins limit integrin activation by directly interacting with Rap1 and R-Ras. *Nature Cell Biology*, *19*(4), 292–305. <https://doi.org/10.1038/ncb3487>
113. Lipton, J. O., & Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron*, *84*(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>
114. Liu, A., Zhou, Z., Dang, R., Zhu, Y., Qi, J., He, G., ... Xie, W. (2016). Neuroligin 1 regulates spines and synaptic plasticity via LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization. *The Journal of Cell Biology*, *212*(4), 449–463. <https://doi.org/10.1083/jcb.201509023>
115. Lugo, J. N., Smith, G. D., Morrison, J. B., & White, J. (2013). Deletion of PTEN produces deficits in conditioned fear and increases fragile X mental retardation protein. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *20*(12), 670–673. <https://doi.org/10.1101/lm.032839.113>
116. Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(2), 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
117. Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(10), 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
118. May, P. A., & Gossage, J. P. (2001). Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National*

Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 25(3), 159–167.

119. McMahon, A. C., Barnett, M. W., O’Leary, T. S., Stoney, P. N., Collins, M. O., Papadia, S., ... Kind, P. C. (2012). SynGAP isoforms exert opposing effects on synaptic strength. *Nature Communications*, 3, 900. <https://doi.org/10.1038/ncomms1900>
120. McNally, J. M., McCarley, R. W., & Brown, R. E. (2013). Impaired GABAergic neurotransmission in schizophrenia underlies impairments in cortical gamma band oscillations. *Current Psychiatry Reports*, 15(3), 346. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0346-z>
121. Mendola, C. E., & Backer, J. M. (1990). Lovastatin blocks N-ras oncogene-induced neuronal differentiation. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 1(10), 499–502.
122. Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., ... Grant, S. G. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, 396(6710), 433–439. <https://doi.org/10.1038/24790>
123. Mignot, C., von Stülpnagel, C., Nava, C., Ville, D., Sanlaville, D., Lesca, G., ... Depienne, C. (2016). Genetic and neurodevelopmental spectrum of SYNGAP1-associated intellectual disability and epilepsy. *Journal of Medical Genetics*, 53(8), 511–522. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103451>
124. Mishra, A., Godavarthi, S. K., & Jana, N. R. (2009). UBE3A/E6-AP regulates cell proliferation by promoting proteasomal degradation of p27. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.010>
125. Modabbernia, A., Mollon, J., Boffetta, P., & Reichenberg, A. (2016). Impaired Gas Exchange at Birth and Risk of Intellectual Disability and Autism: A Meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1847–1859. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2717-5>
126. Moon, I. S., Sakagami, H., Nakayama, J., & Suzuki, T. (2008). Differential distribution of synGAP alpha1 and synGAP beta isoforms in rat neurons. *Brain Research*, 1241, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.033>
127. Morozov, A., Muzzio, I. A., Bourtchouladze, R., Van-Strien, N., Lapidus, K., Yin, D.,

- ... Kandel, E. R. (2003). Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*, 39(2), 309–325.
128. Muhia, M., Feldon, J., Knuesel, I., & Yee, B. K. (2009). Appetitively motivated instrumental learning in SynGAP heterozygous knockout mice. *Behavioral Neuroscience*, 123(5), 1114–1128. <https://doi.org/10.1037/a0017118>
129. Ognjanovski, N., Schaeffer, S., Wu, J., Mofakham, S., Maruyama, D., Zochowski, M., & Aton, S. J. (2017). Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation. *Nature Communications*, 8, 15039. <https://doi.org/10.1038/ncomms15039>
130. Oh, J. S., Manzerra, P., & Kennedy, M. B. (2004). Regulation of the neuron-specific Ras GTPase-activating protein, synGAP, by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17980–17988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314109200>
131. Orrico, A., Lam, C., Galli, L., Dotti, M. T., Hayek, G., Tong, S. F., ... Sorrentino, V. (2000). MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Letters*, 481(3), 285–288.
132. Osterweil, E. K., Chuang, S.-C., Chubykin, A. A., Sidorov, M., Bianchi, R., Wong, R. K. S., & Bear, M. F. (2013). Lovastatin corrects excess protein synthesis and prevents epileptogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuron*, 77(2), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.034>
133. Ozkan, E. D., Creson, T. K., Kramár, E. A., Rojas, C., Seese, R. R., Babyan, A. H., ... Rumbaugh, G. (2014). Reduced cognition in Syngap1 mutants is caused by isolated damage within developing forebrain excitatory neurons. *Neuron*, 82(6), 1317–1333. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.015>
134. Pak, D. T., Yang, S., Rudolph-Correia, S., Kim, E., & Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron*, 31(2), 289–303.
135. Palmer, L. D., Butcher, N. J., Boot, E., Hodgkinson, K. A., Heung, T., Chow, E. W. C., ... Bassett, A. S. (2018). Elucidating the diagnostic odyssey of 22q11.2 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 176(4), 936–944.

<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38645>

136. Park, S., Kramer, E. E., Mercaldo, V., Rashid, A. J., Insel, N., Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. (2016). Neuronal Allocation to a Hippocampal Engram. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *41*(13), 2987–2993. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.73>
137. Parker, M. J., Fryer, A. E., Shears, D. J., Lachlan, K. L., McKee, S. A., Magee, A. C., ... FitzPatrick, D. R. (2015). De novo, heterozygous, loss-of-function mutations in SYNGAP1 cause a syndromic form of intellectual disability. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *167A*(10), 2231–2237. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37189>
138. Parsons, R. G., Gafford, G. M., & Helmstetter, F. J. (2006). Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(50), 12977–12983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4209-06.2006>
139. Pena, V., Hothorn, M., Eberth, A., Kaschau, N., Parret, A., Gremer, L., ... Scheffzek, K. (2008). The C2 domain of SynGAP is essential for stimulation of the Rap GTPase reaction. *EMBO Reports*, *9*(4), 350–355. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.20>
140. Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J., & Scanziani, M. (2013). Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1068–1076. <https://doi.org/10.1038/nn.3446>
141. Polepalli, J. S., Wu, H., Goswami, D., Halpern, C. H., Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2017). Modulation of excitation on parvalbumin interneurons by neuroligin-3 regulates the hippocampal network. *Nature Neuroscience*, *20*(2), 219–229. <https://doi.org/10.1038/nn.4471>
142. Porter, K., Komiyama, N. H., Vitalis, T., Kind, P. C., & Grant, S. G. N. (2005). Differential expression of two NMDA receptor interacting proteins, PSD-95 and SynGAP during mouse development. *The European Journal of Neuroscience*, *21*(2), 351–362. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03874.x>
143. Provenzano, G., Pangrazzi, L., Poli, A., Pernigo, M., Sgadò, P., Genovesi, S., ... Bozzi, Y. (2014). Hippocampal dysregulation of neurofibromin-dependent pathways is associated with impaired spatial learning in engrailed 2 knock-out mice. *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(40), 13281–13288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2894-13.2014>
144. Puelles, L., & Rubenstein, J. L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends in Neurosciences*, 16(11), 472–479.
145. Purpura, D. P. (1974). Dendritic spine “dysgenesis” and mental retardation. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4169), 1126–1128.
146. Rakić, S., Kanatani, S., Hunt, D., Faux, C., Cariboni, A., Chiara, F., ... Parnavelas, J. G. (2015). Cdk5 phosphorylation of ErbB4 is required for tangential migration of cortical interneurons. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 25(4), 991–1003. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht290>
147. Rashid, A. J., Yan, C., Mercaldo, V., Hsiang, H.-L. L., Park, S., Cole, C. J., ... Josselyn, S. A. (2016). Competition between engrams influences fear memory formation and recall. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6297), 383–387. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0594>
148. Rauch, A., Wieczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Endeke, S., Schwarzmayr, T., ... Strom, T. M. (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet (London, England)*, 380(9854), 1674–1682. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61480-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61480-9)
149. Ropers, H.-H., & Hamel, B. C. J. (2005). X-linked mental retardation. *Nature Reviews. Genetics*, 6(1), 46–57. <https://doi.org/10.1038/nrg1501>
150. Rozeske, R. R., Valerio, S., Chaudun, F., & Herry, C. (2015). Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain, and Behavior*, 14(1), 22–36. <https://doi.org/10.1111/gbb.12181>
151. Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain, and Behavior*, 2(5), 255–267.
152. Rumbaugh, G., Adams, J. P., Kim, J. H., & Huganir, R. L. (2006). SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4344–4351. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600084103>
153. Saraf, A., Luo, J., Morris, D. R., & Storm, D. R. (2014). Phosphorylation of eukaryotic

- translation initiation factor 4E and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (4EBP) and their upstream signaling components undergo diurnal oscillation in the mouse hippocampus: implications for memory persistence. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 20129–20138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552638>
- 154.Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., & Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(33), 7366–7377. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1739-04.2004>
- 155.Schreiber, J., Grimbergen, L.-A., Overwater, I., Vaart, T. van der, Stedehouder, J., Schuhmacher, A. J., ... Elgersma, Y. (2017). Mechanisms underlying cognitive deficits in a mouse model for Costello Syndrome are distinct from other RASopathy mouse models. *Scientific Reports*, 7(1), 1256. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01218-0>
- 156.Scotto-Lomassese, S., Nissant, A., Mota, T., Néant-Féry, M., Oostra, B. A., Greer, C. A., ... Caillé, I. (2011). Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(6), 2205–2215. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5514-10.2011>
- 157.Sgadò, P., Genovesi, S., Kalinovsky, A., Zunino, G., Macchi, F., Allegra, M., ... Bozzi, Y. (2013). Loss of GABAergic neurons in the hippocampus and cerebral cortex of Engrailed-2 null mutant mice: implications for autism spectrum disorders. *Experimental Neurology*, 247, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.021>
- 158.Shah, S., Brock, E. J., Ji, K., & Mattingly, R. R. (2018). Ras and Rap1: A tale of two GTPases. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.03.005>
- 159.Simpson, P. B., Challiss, R. A., & Nahorski, S. R. (1995). Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends in Neurosciences*, 18(7), 299–306.
- 160.Somogyi, P. (1977). A specific “axo-axonal” interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Research*, 136(2), 345–350.
- 161.Song, I., & Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(11), 578–588.

162. Sui, L., Wang, J., & Li, B.-M. (2008). Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *15*(10), 762–776. <https://doi.org/10.1101/lm.1067808>
163. Szczaluba, K., Brzezinska, M., Kot, J., Rydzanicz, M., Walczak, A., Stawiński, P., ... Płoski, R. (2016). SETD5 loss-of-function mutation as a likely cause of a familial syndromic intellectual disability with variable phenotypic expression. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *170*(9), 2322–2327. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37832>
164. Tamás, G., Lorincz, A., Simon, A., & Szabadics, J. (2003). Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5614), 1902–1905. <https://doi.org/10.1126/science.1082053>
165. Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(1), 467–472. <https://doi.org/10.1073/pnas.012605299>
166. Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., ... Huang, Z. J. (2011). A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*, *71*(6), 995–1013. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.026>
167. Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J., & Sabatini, B. L. (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nature Neuroscience*, *8*(12), 1727–1734. <https://doi.org/10.1038/nn1566>
168. Tolia, K. F., Bikoff, J. B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., ... Greenberg, M. E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*, *45*(4), 525–538. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.024>
169. Tomoda, T., Kim, J. H., Zhan, C., & Hatten, M. E. (2004). Role of Unc51.1 and its binding partners in CNS axon outgrowth. *Genes & Development*, *18*(5), 541–558. <https://doi.org/10.1101/gad.1151204>
170. Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience*, *16*(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>

171. Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, *91*(2), 260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
172. Tripathi, P. P., Sgadò, P., Scali, M., Viaggi, C., Casarosa, S., Simon, H. H., ... Bozzi, Y. (2009). Increased susceptibility to kainic acid-induced seizures in Engrailed-2 knockout mice. *Neuroscience*, *159*(2), 842–849. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.007>
173. Vazquez, L. E., Chen, H.-J., Sokolova, I., Knuesel, I., & Kennedy, M. B. (2004). SynGAP regulates spine formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(40), 8862–8872. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3213-04.2004>
174. Walkup, W. G., Washburn, L., Sweredoski, M. J., Carlisle, H. J., Graham, R. L., Hess, S., & Kennedy, M. B. (2015). Phosphorylation of synaptic GTPase-activating protein (synGAP) by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) alters the ratio of its GAP activity toward Ras and Rap GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(8), 4908–4927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.614420>
175. Wang, C.-C., Held, R. G., & Hall, B. J. (2013). SynGAP regulates protein synthesis and homeostatic synaptic plasticity in developing cortical networks. *PloS One*, *8*(12), e83941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083941>
176. Wang, R. C., & Levine, B. (2010). Autophagy in cellular growth control. *FEBS Letters*, *584*(7), 1417–1426. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.009>
177. Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C. Z., & Markram, H. (2002). Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *12*(4), 395–410.
178. Wechsler, D. (2003). *Wechsler Intelligence Scale for Children* (4th ed.).
179. Weston, M. C., Chen, H., & Swann, J. W. (2012). Multiple roles for mammalian target of rapamycin signaling in both glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(33), 11441–11452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1283-12.2012>

180. Wigler, M. H. (1990). Oncoproteins. GAPs in understanding Ras. *Nature*, *346*(6286), 696–697. <https://doi.org/10.1038/346696a0>
181. Wolff, S. B. E., Gründemann, J., Tovote, P., Krabbe, S., Jacobson, G. A., Müller, C., ... Lüthi, A. (2014). Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature*, *509*(7501), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nature13258>
182. Xia, F., Richards, B. A., Tran, M. M., Josselyn, S. A., Takehara-Nishiuchi, K., & Frankland, P. W. (2017). Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *eLife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.27868>
183. Xu, Q., Tam, M., & Anderson, S. A. (2008). Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *The Journal of Comparative Neurology*, *506*(1), 16–29. <https://doi.org/10.1002/cne.21529>
184. Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., ... Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, *393*(6687), 809–812. <https://doi.org/10.1038/31735>
185. Yiu, A. P., Mercaldo, V., Yan, C., Richards, B., Rashid, A. J., Hsiang, H.-L. L., ... Josselyn, S. A. (2014). Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. *Neuron*, *83*(3), 722–735. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.017>
186. Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O’Shea, D. J., ... Deisseroth, K. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, *477*(7363), 171–178. <https://doi.org/10.1038/nature10360>
187. York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W., & Stork, P. J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, *392*(6676), 622–626. <https://doi.org/10.1038/33451>
188. Zhang, W., Vazquez, L., Apperson, M., & Kennedy, M. B. (1999). Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(1), 96–108.
189. Zhong, J. (2016). RAS and downstream RAF-MEK and PI3K-AKT signaling in

neuronal development, function and dysfunction. *Biological Chemistry*, 397(3), 215–222. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0270>

190. Zhu, J. J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., & Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, 110(4), 443–455.