



HAL
open science

Altérations de la connectivité corticale au cours de périodes critiques du développement

Mélanie Druart

► **To cite this version:**

Mélanie Druart. Altérations de la connectivité corticale au cours de périodes critiques du développement. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS075 . tel-03354944

HAL Id: tel-03354944

<https://theses.hal.science/tel-03354944v1>

Submitted on 27 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

École doctorale Cerveau-Cognition-Comportement

Institut du Fer à Moulin U1270/ Sérotonine, Microglie, Plasticité et Pathologies

Thèse de doctorat en Neurosciences

Altérations de la connectivité corticale au cours de périodes critiques du développement

Par **Mélanie Druart**

Dirigée par Corentin Le Magueresse

Présentée et soutenue le 25 septembre 2020

Devant un jury composé de :

Pascale Chavis

Etienne Audinat

Bénédicte Amilhon

Rebecca Piskorowski

Mathieu Letellier

Stéphane Charpier

Corentin Le Magueresse

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Examinateur

Président

Directeur de thèse

« La logique est la plus belle invention du cerveau humain. »

J.A. Bertrand

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer le résultat de mes 4 années de travail et de prendre le temps de réfléchir avec moi sur l'avancée de mes projets. Je remercie particulièrement Pascale Chavis et Etienne Audinat d'avoir entrepris la lourde tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie chaleureusement Bénédicte Amilhon, Rebecca Piskorowski, Matthieu Letellier et Stéphane Charpier de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement Stéphane qui, il y a 6 ans déjà, m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a initié au monde fascinant de l'électrophysiologie. Je remercie aussi chaleureusement Rebecca d'avoir suivi l'avancée de mes travaux de thèse à travers les jurys de mi-parcours mais également pour toutes nos interactions scientifiques et amicales en dehors des murs de nos laboratoires.

Je remercie Jean-Antoine Girault pour son accueil au sein de l'institut du Fer à Moulin depuis le Master 1 mais également pour ses conseils scientifiques au détour de couloirs.

Bien qu'il existe des tournures conventionnelles pour remercier son directeur de thèse, je ne pense pas en trouver une adéquate pour décrire l'aventure exceptionnelle qu'a été cette thèse à tes côtés. Corentin, je te remercie pour ces 4 années de thèse intenses, productives et extrêmement enrichissantes. Merci pour ta disponibilité, aussi bien scientifique qu'humaine, qui m'a permis de m'épanouir complètement pendant ce doctorat et de « soulever des montagnes » face à l'adversité.

J'adresse également tous mes remerciements à ma famille pour leur soutien, et leur compréhension tout au long de mes années d'études qui ont du paraître interminables. Valérie et Eric, Catherine et Patrick, Choupi et Morgane, Fred, Hélène, merci à vous tous.

Mathilde, Violaine, Lisa, Poppy, Joss, Charles, Louis et Clément, merci à vous « potes de la butte » de m'avoir adoptée si rapidement et d'être restés présents tout au long de cette thèse. Merci d'avoir assuré la lourde tâche de me faire sortir du labo avant la fin des Happy Hours et surtout d'avoir partagé la passion de Gladine.

Éric et Romain, vous êtes présents depuis le début et je vous remercie pour tous les moments de décompression que nous avons pu avoir ensemble au cours de ces 4 années.

S'il est cliché de décrire son lieu de travail comme une grande famille, je suis obligée de reconnaître que l'IFM aura été pour moi un environnement enrichissant, fait de rencontres improbables et où de belles amitiés se sont créées, sans lesquelles cette thèse n'aurait probablement pas abouti.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance d'interagir au sein de mon équipe actuelle et passée : Thomas, Marion, Yaëlle, Imane, Giulia, Catherine, Amina, Fanny, Anne, Luc, Célia, Naya. Marion, un grand merci de m'avoir laissé transformer notre bureau en jungle sauvage. Imane, s'il convient de te remercier pour ton aide en bio mol, ce n'est rien à côté de ton soutien en cette période de fin de thèse et de rédaction qui m'a permis d'en venir à bout. Célia, merci pour ta bonne humeur et d'avoir patiemment corrigé l'orthographe calamiteuse de ce manuscrit.

Je tiens également à saluer tous les « anciens » de l'IFM avec qui nous avons partagé un grand nombre de moments joyeux, de soirées dans les bars ou dans le labo : Ana, Melissa, Emily, Jimmy, Delfina, Giorgia, Delphine et Mariano. Benoit, merci pour toutes ces belles discussions qui m'ont fait évoluer et pour ton amitié qui traverse les frontières. François, merci pour tous ces moments au 7ème, nuits fraîches et musicales, ces bières en canette et ces chips de mauvais goût. Vous tous avez rendu ces années de thèse vivantes et tellement agréables !

« Dans la vie il y a deux types de personnes. Ceux qui patchent et ceux qui font de la merde. Moi je patche. »

Je ne pensais pas avoir un jour à me battre pour dormir sur un canapé sur mon lieu de travail, c'est chose faite, et c'était chouette. Vincent et Mathieu merci pour les ballons, les heures de distraction au poste de patch, les verres au baratin et les « nombreux » joggings au jardin des plantes.

« Problème de train mais je suis là dans 10min. Tu m'attends ? » Gaël, 8h07 – 28/11/17

Gaël, comme si sauver une animalerie n'était pas suffisant, merci pour ta bonne humeur, ton esprit taquin et surtout ton soutien moral lors des traditionnels café-clope de 8h pétantes.

« Je t'ai laissé des bananes pas trop mûres. Mange ces fichues bananes. »

Baptiste, merci pour tes petits déjeuners équilibrés à 5h30 du matin, les cafés sur le toit au lever du soleil, ta bonne humeur quotidienne et les beaux projets de vie.

« Le sport c'est horrible. » Maxime, Néoness Austerlitz 7h35.

Maxime, on a surmonté une thèse ensemble, et ce n'est pas rien. Cette prouesse vaut bien plus que toutes les heures de cardio sur les machines de Néoness à 7h le matin. Merci d'avoir été là si souvent.

« *L'important est d'être synchro avec soi-même.* »

Sana, merci d'avoir été là les nuits de désespoir en pièce de culture, d'avoir supporté et dansé sur mes musiques de bonne humeur et pour toutes ces soirées à la Butte aux cailles. Justine, merci pour l'accueil à Arcueil et de m'avoir laissé jouer avec le feu lors de nos dîners.

« *Tu n'es pas l'arbre en automne, tu es le jardinier.* » Marta, Baratin 21h32 - 15/11/18

Marta, merci d'avoir cru en moi dès le M1 et de m'avoir présenté Corentin. Bien plus important, avec Antoine, merci à tous les deux de m'avoir soutenue dans les moments de fléchissement. Cette amitié riche en partage, concerts improbables, karaokés improvisés et dîners sans légume se poursuivront sans aucun doute de l'autre côté de l'Atlantique.

« *Tu vas trouver.* » Marika

Mk, merci infiniment de m'avoir aidée à surmonter les épreuves rencontrées durant ces années de thèse, tant scientifiques que personnelles, toujours avec positivisme et bienveillance. Merci pour ces matins, soirées, nuits de discussion rive droite et yoga du dimanche qui font qu'aujourd'hui je me tiens debout - en short - pour affronter l'avenir.

« *Que la force synaptique soit avec toi !* » Vincent, 4h10 (Heure Française) - 24/05/2020

Vincent, tout comme l'hippocampe entraîne le cortex à osciller malgré la distance (Buzsáki 1996 ; Sirota et al., 2008), merci pour ton soutien quotidien, sans faille, même à 5800 km. Merci d'avoir cru en moi, en la finalisation de cette thèse, et enfin (et surtout) en notre avenir scientifique.

Cette thèse a été rendue possible grâce à un financement de 3 ans provenant du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur et grâce à la Fondation pour la Recherche Médicale qui m'a octroyé une allocation doctorale de quatrième année de thèse (FDT20190400802).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	13
RESUME	15
ABSTRACT	17
CHAPITRE I : INTRODUCTION	19
I. Développement structurel et fonctionnel du néocortex	21
1. Organisation laminaire du cortex	21
2. Développement embryonnaire : mise en place et composition du cortex	24
A. Cellules excitatrices : composition et origine.....	24
B. Grande diversité des interneurons corticaux.....	25
C. Origine des interneurons GABAergiques	28
D. Synaptogenèse et perte de synapses excitatrices au cours du développement postnatal	30
3. Établissement de réseaux fonctionnels : périodes critiques de développement	33
A. Période critique : découverte et définition.....	33
B. Similarité et diversité des périodes critiques	34
II. Le cortex visuel chez la souris : un modèle privilégié pour l'étude des périodes critiques corticales dépendantes de l'activité	37
1. Organisation générale des voies visuelles	37
A. Rétine et tractus optique : première étape de régulation de la vision binoculaire	38
B. Thalamus : une structure-relais	38
C. Cortex visuel primaire : architecture et connexions	39
2. Période critique du cortex visuel primaire : une période d'hyper-plasticité.....	40
A. Déprivation monoculaire : mise en évidence de la période critique.....	41
B. Période critique et plasticité	42
3. Rôle de l'inhibition dans la période critique	50
A. Modulation de l'inhibition.....	50
B. Rôle clé des interneurons PV.....	51

C.	Implication des afférences excitatrices sur les interneurons PV.....	52
4.	Plasticité chez l'adulte et réouverture de période critique.....	53
A.	Caractéristiques de la plasticité dans le cortex visuel adulte.....	53
B.	Réouverture de périodes critiques chez l'adulte.....	53
III.	La période du raffinement synaptique : une période critique de développement dont les altérations sont associées à la schizophrénie.....	55
1.	Les microglies : alliées indispensables à la formation et au maintien des réseaux neuronaux... 56	56
A.	Origine et développement.....	56
B.	Rôle de la microglie dans le SNC adulte.....	57
C.	Rôle de la microglie au cours du développement.....	59
2.	Le système du complément, un acteur majeur dans la construction du SNC.....	63
A.	Cascades du système du complément.....	63
B.	Le complément dans le SNC.....	65
C.	Implication dans le développement du SNC.....	66
3.	La schizophrénie, une pathologie du neuro-développement.....	67
A.	Caractéristiques cliniques de la pathologie.....	67
B.	Une pathologie neuro-développementale.....	67
C.	Marqueurs anatomiques et moléculaires dans le cortex préfrontal de patients schizophrènes.....	68
D.	Etiopathologie de la schizophrénie : implication génétique et environnementale.....	72
E.	Système du complément et schizophrénie.....	75
	OBJECTIF DE LA THESE.....	79
	CHAPITRE 2 : RESULTATS.....	83
	Article 1 : Altération de la rectification des courants AMPA et de la plasticité homéostatique dans les interneurons PV au cours de la période critique du cortex visuel chez la souris.....	85
1.	Présentation de l'article.....	85
2.	Article.....	89
	Article 2 : La sur-expression de la protéine du complément C4 dans le cortex préfrontal chez la souris induit des endophénotypes associés à la schizophrénie.....	113
1.	Présentation de l'article.....	113
2.	Article.....	117

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPPECTIVES	167
I. Implication de la protéine GRIP1 dans la période critique de développement du cortex visuel	169
II. Rôle de C4 dans la période critique d'élagage synaptique du cortex préfrontal.....	176
III. Influences croisées des deux périodes critiques étudiées	179
REFERENCES	183
ANNEXES.....	221
Annexe 1 : Une mutation étiologique du gène FoxP2 provoque la diminution du gain neuronal des cellules cortico-thalamiques de la couche VI du cortex par augmentation de la signalisation GABA_B/GIRK.....	223
1. Présentation de l'article	223
2. Article.....	227
Annexe 2 : « Rôles émergents du système du complément dans les maladies psychiatriques »..	251

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1 : Organisation schématique des circuits excitateurs au sein du néocortex.....	23
Figure 2 : Diversité des interneurons corticaux.....	26
Figure 3 : Origine spatio-temporelle des interneurons corticaux	29
Figure 4 : Synaptogenèse dans les cortex primaire et préfrontal chez l'Homme.	31
Figure 5 : Développement des périodes critiques corticales chez l'homme.....	34
Figure 6 : Voies visuelles chez la souris	37
Figure 7 : Développement du cortex visuel chez la souris.....	41
Figure 8 : Déprivation monoculaire au cours de la période critique de dominance oculaire.	42
Figure 9 : Composition des récepteurs AMPA.....	44
Figure 10 : « Synaptic scaling » aux synapses excitatrices	47
Figure 11 : Interaction entre GRIP1 et GluA2	48
Figure 12 : Implication de l'inhibition dans la période critique du cortex visuel.....	50
Figure 13 : Fonctions de la microglie dans le SNC.....	59
Figure 14 : Elagage synaptique dépendant de la microglie dans le dLGN.....	61
Figure 15 : Cascade du complément	64
Figure 16 : Marqueurs anatomiques retrouvés dans le cerveau de patients schizophrènes.....	69
Figure 17: Risque de développer la schizophrénie chez les apparentés de patients schizophrènes	72
Figure 18 : Association du gène C4 avec la schizophrénie	76

CHAPITRE 2 : RESULTATS

Article 1

Figure 0 : Étude transcriptionnelle des gènes liés à la fonction synaptique dans la maturation des interneurons PV corticaux	86
Figure 1 : Different developmental trajectories of AMPAR rectification at excitatory synapses on PV neurons and pyramidal cells	102
Figure 2 : Short-term plasticity of excitatory synapses onto PV neurons and pyramidal cells across postnatal development in visual cortex	103

Figure 3 : AMPA-mediated excitatory currents in PV neurons across postnatal development in visual cortex.....	104
Figure 4 : Homeostatic plasticity at excitatory synapses onto PV interneurons from the visual cortex before, during and after the critical period	105
Figure 5: Characterization of mice with PV neuron-specific ablation of <i>GRIP1</i>	106
Figure 6 : Effect of PV neuron-specific <i>Grip1</i> ablation on excitatory synapse properties.....	107

Article 2

Figure 0 : Méthodes utilisées et stades de développement étudiés.....	124
Figure 1 : C4 overexpression in prefrontal cortex using in utero electroporation.....	129
Figure 2 : Reduced excitatory input onto C4-OE pyramidal cells.....	130
Figure 3 : Decreased spine turnover in young (P15-P18) C4-OE mice	131
Figure 4 : Altered AMPA/NMDA ratio and AMPAR rectification index in C4-OE mice	133
Figure 5 : Decreased presynaptic release from PV neurons onto C4-OE pyramidal cells.....	135
Figure 6 : Decreased GAD67 expression and PV neuron excitability in C4-OE mice	137
Figure 7 : Increased excitatory inputs onto on PV neurons in C4-OE mice.....	138
Figure 8 : Impaired working memory in C4-OE mice	139
Figure S1 : Similar laminar position of electroporated pyramidal cells in control and C4-OE mice...	141
Figure S2 : Passive and active neuronal properties in control and C4-OE mice	142
Figure S3 : Light-evoked firing of ChR2-expressing PV neurons	143
Figure S4 : Laminar distribution of PV neurons in control and C4-OE mice	144
Table S1 : Summary table of patch-clamp results (pyramidal cells).....	148
Table S2 : Summary table of imaging results	149
Table S3 : Summary table of patch-clamp results (PV interneurons)	150
Table S4: Summary table of behavioral studies	151
Table S5 : Key ressource table	153

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Table 1 : Stratégies virales pour la réexpression de GRIP1 dans les interneurons PV.....	172
--	-----

ANNEXES

Article 3

Figure 1 : Transgenic approach to study auditory cortex Foxp2 ⁺ neurons in mice carrying the R552H mutation.....	239
Figure 2 : Sholl analysis demonstrating decreased apical dendrite arborisation of Foxp2 ^{+/R552H} cortical neurons	240
Figure 3 : Decrease in excitatory synaptic transmission in Foxp2 ^{+/R552H} cortical neurons	241
Figure 4 : Decreased intrinsic excitability in Foxp2 ^{+/R552H} cortical neurons.....	242
Figure 5 : Unchanged delayed-rectifier and A-type potassium currents, two putative transcriptional targets of Foxp2, in Foxp2 ^{+/R552H} cortical neurons	243
Figure 6 : Enhanced effect of the R552H mutation on the firing response to small depolarizing currents by decreasing extracellular potassium concentration	244
Figure 7 : Increased GABA _B -mediated currents in Foxp2 ^{+/R552H} cortical neurons	245
Figure 8 : GIRK channel-dependent effect of the R552H mutation on intrinsic neuronal excitability	246

Revue

Figure 1 : The complement pathways.	255
Table 1 : Complement molecules expressed by brain cells.....	256
Figure 2 : Synapses elimination by microglia in normal and pathologic development.....	258
Table 2 : Complement pathways involved in selected brain disorders.	260

LISTE DES ABREVIATIONS

5HT3aR : Récepteur à la sérotonine 3a	EPSC: Excitatory postsynaptic current
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique	FoxP2 : Forkhead-Box P2
APO : Aire préoptique	GABA : Gamma-Aminobutyric acid
APV: Acide 2-amino-5-phosphonovalérique	GABA _{A/B} : Gamma-Aminobutyric acid receptor A et B
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor	GAD 65/67 : Isoformes 65 et 67 de la glutamate decarboxylase
C3aR : Récepteur à C3a	GAD1/2 : Gènes glutamate decarboxylase 1 et 2
C4 : Protéine du complément 4	GAT-1: GABA transporter 1
C4-OE : C4-overexpression	GFP : Green fluorescent protein
ChR2: Channelrhodopsine	GIRK : G-protein activated Inwardly Rectifying K ⁺ current
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	GRIP1 : Glutamate Receptor Interacting Protein 1
CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione	Gsh2 : Genomic screened homeobox 2
CP : Critical period	GWAS : Genome-wide association studies
CR : Calrétinine	HERV : Human Endogenous retroviruses
CR3 : Récepteur à C3b	IPSC: Inhibitory postsynaptic current
Cre : Recombinase Cre	IR : Index de rectification
CSMD1 : CUB and Sushi multiple domains 1	KO : Knock-out
CTB : Cholera toxine subunit β	LTD : Long term depression
CX3CR1 : CX3C chemokine receptor 1	LTP : Long term potentiation
DISC 1 : Disrupted in Schizophrenia 1	MAC : Membran attack complex
dLGN : dorsal lateral geniculate nucleus	MBL : Mannose Binding Lectin
E : Jour embryonnaire	MIA : Maternal immune activation
EGC : Eminence ganglionnaire caudale	
EGL : Eminence ganglionnaire latérale	
EGM : Eminence ganglionnaire médiale	

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NPY : Neuropeptide Y

Nrg1: Neuregulin 1

OD : Ocular dominance

P : Jour postnatal

PA : Potentiel d'action

PCP: Phencyclidine

PDZ: Postsynaptic density 95, Discs large, and

Zonula occludens-1

PET-scan : Imagerie de tomographie par
émission de positrons

PFC : Prefrontal cortex

PICK1: Protein Interacting with C Kinase - 1

PNN : Perineuronal net

Poly I :C : lipopolysaccharide

PPR : paired-pulse ratio

PV : Parvalbumine

Rln: Reelin

SNC : Système nerveux central

SR95531 : Gabazine

SST : Somatostatine

SZ : Schizophrenia

TGF- β : Transforming Growth Factor-beta

TTX : Tétrodotoxine

V1 : Cortex visuel primaire

VIP : Peptide vasoactif intestinal

VZ : Zone ventriculaire

YFP : Yellow fluorescence protein

RESUME

Les premières étapes de la construction du cerveau chez les mammifères dépendent de programmes génétiques et de l'activité intrinsèque de réseaux de neurones immatures. Après la naissance, le cerveau en développement devient rapidement remarquablement plastique : les connexions synaptiques et les propriétés physiologiques des neurones et de la glie deviennent susceptibles d'être remodelées en réponse à des changements de l'environnement. Cette réorganisation des circuits neuronaux, qui dépend de l'activité neuronale induite par des stimuli sensoriels, atteint son apogée pendant des fenêtres temporelles spécifiques appelées « périodes critiques ». L'importance fonctionnelle des périodes critiques de développement du cerveau est considérable, puisqu'elles permettent à long terme l'adéquation entre structure cérébrale et environnement au sein duquel l'individu se développe. Elles constituent aussi des périodes de vulnérabilité, en ce que des altérations pathologiques de la physiologie cérébrale au moment de ces pics de plasticité entraînent des modifications durables et délétères de la structure et de la fonction des réseaux neuronaux.

Dans le cadre de mes travaux de doctorat, je me suis intéressée aux mécanismes physiologiques qui sous-tendent la plasticité des réseaux au cours de deux périodes critiques distinctes du développement cérébral.

1) Une période critique a été bien caractérisée dans le cortex visuel où des changements permanents dans les réseaux neuronaux se produisent en réponse à la fermeture transitoire d'un œil à un stade spécifique de développement, mais pas aux stades antérieurs ou ultérieurs. Chez la souris, on considère généralement que cette période critique a lieu entre les jours de développement postnatal 21 et 35 (P21-P35), avec un pic de plasticité entre P25 et P30. Des indices convergents impliquent les synapses glutamatergiques sur les interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine (neurones PV) dans l'ouverture de cette période critique. Cependant, les mécanismes moléculaires et synaptiques sous-jacents restent incomplètement compris. J'ai montré que la rectification des récepteurs AMPA augmente pendant la période critique dans les neurones PV mais pas dans les cellules pyramidales de la couche IV du cortex visuel, ce qui suggère la perte transitoire des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2 à ces synapses. Cette modification est corrélée à une perte transitoire de la plasticité homéostatique des afférences glutamatergiques vers les neurones PV en réponse à une déprivation monoculaire de trois jours. De manière surprenante, cette plasticité homéostatique est caractérisée par une augmentation de la fréquence des courants miniatures et non de leur amplitude comme dans les cellules pyramidales. Comme des données de transcriptomique indiquent que l'expression de la protéine d'échafaudage GRIP1, impliquée dans le trafic synaptique de GluA2 et la plasticité homéostatique de la synapse, diminue dans des neurones PV corticaux à P25, nous avons testé l'effet de la perte de GRIP1 sur la composition des récepteurs AMPA et la plasticité homéostatique observée. Nous avons généré des souris avec une

ablation du gène *Grip1* spécifiquement dans les neurones PV, et avons retrouvé chez ces souris adultes la rectification augmentée des récepteurs AMPA et la perte de plasticité homéostatique observée pendant la période critique chez les souris sauvages. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la régulation développementale de l'expression de GRIP1 dans les interneurons PV gouverne la composition des récepteurs AMPA et la plasticité homéostatique des synapses, et pourrait jouer un rôle dans l'ouverture de la période critique de dominance oculaire.

2) Au cours du développement postnatal, le cerveau génère un excès de synapses. La fraction inactive de ces synapses est éliminée à l'adolescence, un phénomène connu sous le nom d'élagage synaptique. L'élagage synaptique dépend de l'activité neuronale induite par l'environnement, et la période du remodelage synaptique constitue donc une autre période critique de développement. Des défauts d'élagage synaptique ont été identifiés dans certaines pathologies neuro-développementales, en particulier la schizophrénie. Des recherches récentes montrent que les gènes du complément, un système contribuant à l'immunité innée, sont impliqués dans l'élagage synaptique dans le cerveau. Par ailleurs, des variants de forte expression du gène C4 ont été associés à la schizophrénie, mais les conséquences d'une expression élevée de C4 sur le développement et la fonction des réseaux corticaux sont mal connues. J'ai montré que la surexpression de C4 dans le cortex préfrontal de souris par électroporation *in utero* cause une réduction des entrées glutamatergiques dans les cellules pyramidales *ex vivo* et une perte d'épines dendritiques. Des expériences d'imagerie bi-photonique *in vivo* montrent que la perte d'épines est corrélée à une diminution de leur formation et de leur élimination. J'ai observé une perte spécifique de la transmission portée par les récepteurs NMDA, ce qui a fréquemment été associé à la schizophrénie. L'expression élevée de C4 induit aussi de multiples altérations de la transmission GABAergique, en particulier une diminution de la probabilité de libération de GABA par les neurones PV. Enfin, nos études comportementales montrent des déficits de la mémoire de travail chez les souris sur-exprimant C4. Ces résultats indiquent que l'expression élevée de C4 induit plusieurs phénotypes qui, chez l'homme, sont associés à la schizophrénie, et révèlent certains mécanismes cellulaires sous-jacents.

Mots clés : Développement cortical, Période critique, Plasticité homéostatique, GRIP1, GluA2, Récepteurs AMPA, Élagage synaptique, Système du complément, C4, Schizophrénie.

ABSTRACT

The early stages of brain development in mammals depend on genetic programs and on the intrinsic activity of immature neural networks. After birth, the developing brain rapidly becomes remarkably plastic: synaptic connections and the physiological properties of neurons and glia become susceptible to remodeling in response to changes in the environment. This reorganization of neural circuits, which depends on neuronal activity induced by changing sensory stimuli, reaches its peak during specific time windows called critical periods. The functional importance of the critical periods of brain development is considerable, since they allow for the long-term adjustment between brain connectivity and the environment in which the individual develops. They are also periods of vulnerability, in that pathological alterations in brain physiology at the time of these peaks in plasticity lead to lasting and deleterious changes in the structure and function of neural networks.

In my PhD work, I investigated the physiological mechanisms underlying network plasticity during two distinct critical periods of brain development.

1) A critical period has been well characterized in the visual cortex where permanent changes in neural networks occur in response to the transient closure of an eye at a specific stage of development, but not at earlier or later stages. In mice, this critical period is generally considered to occur between postnatal development days 21 and 35 (P21-P35), with peak plasticity between P25 and P30. Converging evidence implicates glutamatergic synapses on GABAergic interneurons expressing parvalbumin (PV neurons) in the opening of this critical period. However, the underlying molecular and synaptic mechanisms remain incompletely understood. I have shown that AMPA receptor rectification increases during the critical period in layer IV PV neurons but not in pyramidal cells of the visual cortex, suggesting the transient loss of AMPA receptors containing the GluA2 subunit at these synapses. This change is correlated with a transient loss of homeostatic plasticity of glutamatergic afferents to PV neurons in response to a three-day monocular deprivation. Surprisingly, this homeostatic plasticity is characterized by an increase in the frequency of miniature currents and not in their amplitude as in pyramidal cells. Since transcriptomic data indicate that the expression of the scaffolding protein GRIP1, involved in GluA2 synaptic trafficking and synaptic homeostatic plasticity, decreases in cortical PV neurons at P25, we tested the effect of GRIP1 loss on the composition of AMPA receptors and the observed homeostatic plasticity. We generated mice with an ablation of the *Grip1* gene specifically in PV neurons, and found in these adult mice the increased rectification of AMPA receptors and the loss of homeostatic plasticity observed during the critical period in wild-type mice. These results suggest that developmental regulation of GRIP1 expression in PV interneurons governs the composition of AMPA receptors and the homeostatic plasticity of synapses, and could play a role in the opening of the critical period of ocular dominance plasticity.

2) During postnatal development, the brain generates an excess of synapses. The inactive fraction of these synapses is eliminated during adolescence, a phenomenon known as synaptic pruning. Synaptic pruning is dependent on environmentally induced neuronal activity, so the period of synaptic remodeling is another critical period of development. Synaptic pruning defects have been identified in certain neurodevelopmental pathologies, in particular schizophrenia. Recent studies show that genes of the complement, a system contributing to innate immunity, are involved in synaptic pruning in the brain. In addition, high-expression variants of the *C4* gene have been associated with schizophrenia, but the consequences of high *C4* expression on the development and function of cortical networks are poorly understood. Using electroporation in utero, I have shown that overexpression of *C4* in the mouse prefrontal cortex causes a reduction in glutamatergic inputs to pyramidal cells *ex vivo* and a loss of dendritic spines. *In vivo* biphotonic imaging experiments revealed that the loss of spines is correlated with a decrease in their formation and elimination. In *C4*-overexpressing pyramidal cells, I observed NMDA receptor hypofunction, which has frequently been associated with schizophrenia. Elevated *C4* expression also caused multiple alterations in GABAergic transmission, in particular a decrease in the probability of GABA release from PV neurons. Finally, our behavioural studies show impaired working memory in *C4*-overexpressing mice. These results indicate that elevated *C4* expression causes several phenotypes that in humans have been associated with schizophrenia, and shed light on some underlying cellular mechanisms.

Keywords: Cortical development, Critical period, Homeostatic plasticity, GRIP1, GluA2, AMPA receptors, Synaptic pruning, Complement system, *C4*, Schizophrenia.

CHAPITRE I:
INTRODUCTION

I. DEVELOPPEMENT STRUCTUREL ET FONCTIONNEL DU NEOCORTEX

Le néocortex, qui comprend les six couches neuronales les plus externes localisées à la surface des hémisphères cérébraux, est le siège de nombreuses fonctions cognitives majeures. Il est composé de différentes aires pouvant être divisées en trois catégories fonctionnelles : les aires sensorielles, qui sont en charge de la réception et de l'intégration des stimuli sensoriels ; les aires motrices, permettant la genèse des mouvements ; et les aires associatives impliquées dans des fonctions cognitives plus complexes telles que la mémoire, le langage ou les émotions. Ces différentes aires sont présentes chez tous les mammifères mais leur taille relative varie. Par exemple, les aires associatives comme le cortex préfrontal représentent une plus grande partie du cortex chez l'homme que chez les rongeurs qui ont des cortex sensoriels proportionnellement plus développés (Kaas, 2011; Krubitzer and Seelke, 2012).

Malgré ces différences inter-espèces, la mise en place du cortex dépend d'une succession de processus biologiques suivant une chronologie bien définie et conservée au cours de l'évolution (Molnár et al., 2014). Des perturbations génétiques ou environnementales lors de la formation embryonnaire du cortex ou au moment de l'établissement de ses réseaux neuronaux après la naissance peuvent avoir des conséquences profondes sur son fonctionnement à l'âge adulte. L'étude de son organisation, de sa formation et de sa plasticité en conditions physiologiques est cruciale pour élucider les mécanismes pouvant être impliqués dans les pathologies neurologiques et psychiatriques.

1. Organisation laminaire du cortex

Chez l'homme comme chez les rongeurs, le cortex est organisé en couches parallèles partant de la surface piale jusqu'au corps calleux. Cette organisation laminaire a été identifiée à la fin du 19^{ème} siècle grâce aux études histologiques pionnières de Ramon Y Cajal et Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1934). Ces travaux ont mis en évidence des différences de morphologies et de densité cellulaires permettant de séparer le cortex en six couches. Cette séparation, basée à l'origine sur des critères strictement anatomiques, reflète l'ontogenèse corticale. Chaque couche corticale est composée de différents types de cellules (excitatrices, inhibitrices et gliales) issues de stades de développement embryonnaire précisément déterminés par l'expression de combinaisons uniques de facteurs de transcription. De plus, les cellules de ces différentes couches établissent des connexions avec des aires cérébrales spécifiques permettant un traitement approprié de l'information. Schématiquement, la composition cellulaire des différentes couches en partant de la surface piale est la suivante (**Figure 1**) :

- La couche I contient majoritairement des axones organisés horizontalement de façon parallèle à la surface du cortex, provenant à la fois de cellules excitatrices corticales et des noyaux

thalamiques associatifs (Cauller et al., 1998; Cruikshank et al., 2012). Cette couche n'abrite pas de soma de cellule excitatrice mais leurs dendrites distales qui s'étendant perpendiculairement à la surface corticale. De plus, la couche I comporte différents types d'interneurones inhibiteurs impliqués dans la modulation des afférences corticales et thalamiques permettant le traitement de l'information (Schuman et al., 2019).

- Les couches II/III sont difficilement différenciables. Les corps cellulaires des cellules pyramidales se trouvent principalement dans la couche III. Elles reçoivent des connexions cortico-corticales provenant des cellules alentours et des cellules de la couche IV, ainsi que d'autres aires corticales. Leur axone projette vers les autres couches corticales et vers le cortex contralatéral (Broser et al., 2008; Yamashita et al., 2018). Au cours de ma thèse, j'ai étudié en détail les propriétés de ces cellules pyramidales, ainsi que celles des interneurones adjacents exprimant la parvalbumine (interneurones PV) dans le cortex préfrontal chez la souris à différents stades du développement post-natal, en réponse à la surexpression d'un gène du complément.
- La couche IV est la principale cible des afférences thalamiques (Killackey and Sherman, 2003). Dans la plupart des cortex sensoriels, les cellules excitatrices de cette couche sont des cellules dites étoilées ou granulaires, de petite taille, et qui projettent très localement (au sein de cette couche et dans la couche III). Cependant, il existe des cortex comme le cortex visuel V1 et le moteur M1 où les cellules excitatrices sont des cellules pyramidales ayant des projections plus distales (Yamawaki et al., 2014). Pendant ma thèse, je me suis intéressée à la plasticité des connexions établies par les cellules excitatrices de la couche IV sur les interneurones PV dans le cortex visuel au cours du développement dans une étude présentée dans la partie « Résultats ».
- La couche V contient les corps cellulaires de neurones pyramidaux de grande taille. On distingue les cellules projetant dans le cortex se situant principalement dans la partie supérieure de cette couche et des cellules projetant dans les régions sous-corticales, se trouvant plus proche de la couche VI (Groh et al., 2010; Kim et al., 2015). Dans les cortex sensoriels, les cellules thalamiques projettent également vers la bordure formée par cette couche avec la couche VI.
- La couche VI, appelée aussi couche polymorphe, contient essentiellement des neurones de projections sous-corticales dont les axones projettent directement vers le thalamus (Bourassa et al., 1995). Les neurones excitateurs et inhibiteurs reçoivent également des afférences des noyaux sous-corticaux (Briggs, 2010). En parallèle de mes travaux de doctorat développés dans ce manuscrit, j'ai contribué en tant qu'auteure principale à une étude présentée en annexe portant

sur les propriétés électrophysiologiques des neurones exprimant le facteur de transcription FoxP2 dans la couche VI du cortex auditif.

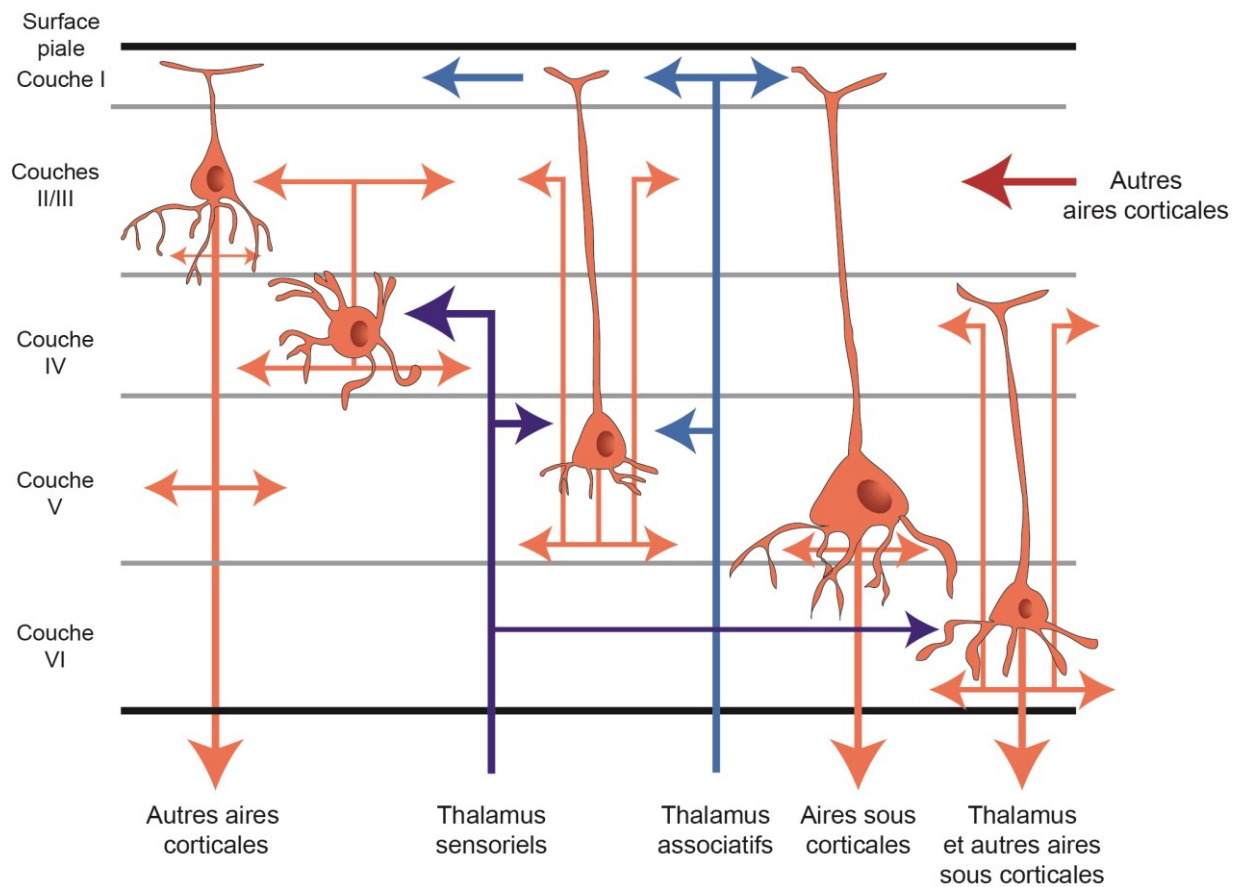


FIGURE 1 : ORGANISATION SCHEMATIQUE DES CIRCUITS EXCITATEURS AU SEIN DU NEOCORTEX

Schéma simplifié illustrant les principaux neurones excitateurs corticaux, leur localisation au sein des couches, ainsi que les principales connectivités excitatrices (Adapté de Allene et al., 2015).

Même si les différentes aires corticales ont une organisation laminaire comparable, il existe cependant des différences de taille et de composition cellulaires en fonction de la spécialisation fonctionnelle des cortex. Par exemple, les cortex sensoriels, impliqués dans le traitement de l'information extérieure, ont des couches dites « d'entrées » (couche II/III et IV) bien plus développées que les cortex moteurs qui ont des couches de projections (V et VI) plus importantes et une sous-représentation de la couche IV (Yamawaki et al., 2014).

L'établissement de cette organisation laminaire dépend d'un grand nombre de paramètres : origine (spatio)-temporelle des cellules au cours du développement, expression de facteurs de transcription et post-transcriptionnels, ainsi que de mécanismes épigénétiques (DeBoer et al., 2013; Nguyen et al., 2016;

Pilaz and Silver, 2015). Des dysfonctionnements de l'un de ces facteurs au cours du développement peuvent engendrer des troubles neurologiques à long terme tels que l'épilepsie, la microcéphalie ou encore des troubles cognitifs et comportementaux (Lewis and Levitt, 2002).

2. Développement embryonnaire : mise en place et composition du cortex

Le cortex est composé de deux grandes catégories de neurones : les neurones glutamatergiques excitateurs qui représentent environ 80% et les neurones inhibiteurs représentant les 20% restants (DeFelipe and Fariñas, 1992; Gabbott and Somogyi, 1986). Leurs origines embryonnaires, ainsi que leurs emplacements dans les couches corticales sont différents. En plus de ces deux types neuronaux, les cellules gliales constituent un troisième type cellulaire majoritaire en nombre ; elles se démarquent des neurones par leur origine embryonnaire et par leur caractère non-excitabile (incapacité à produire des potentiels d'action). Leurs rôles cruciaux dans l'établissement et le maintien des réseaux corticaux seront détaillés plus loin.

A. Cellules excitatrices : composition et origine

Les cellules excitatrices représentent la majorité des neurones corticaux. Ces cellules sont caractérisées par la libération de glutamate au niveau des terminaisons axonales et la présence systématique d'épines dendritiques, protrusions membranaires au niveau des dendrites où se trouvent les synapses excitatrices – bien que des épines soient aussi présentes au niveau des dendrites de certaines cellules inhibitrices. Ces cellules peuvent être séparées en deux catégories : les cellules pyramidales majoritaires dans le cortex et ayant un soma de taille variable, mais des projections axonales et dendritiques distales (DeFelipe and Fariñas, 1992), et les cellules dites étoilées ou granulaires qui sont de petite taille avec une très grande concentration d'épines dendritiques et qui projettent localement (Staiger, 2004).

Dans le cerveau embryonnaire, l'ensemble des cellules excitatrices du cortex suivent des étapes communes de développement : genèse à partir des cellules progénitrices provenant de la zone ventriculaire (ZV), migration et enfin maturation. Ces processus sont très finement régulés et ont été très largement étudiés dans différentes espèces de mammifères (Cooper, 2013; Greig et al., 2013; Kwan et al., 2012).

Très tôt au cours du développement prénatal, des cellules progénitrices de la ZV se divisent de manière symétrique afin d'accroître la population cellulaire et permettre une croissance de la structure. A partir du 11^{ème} jour embryonnaire (E11 chez la souris), les premières cellules se différencient en cellules de la glie radiaire et se divisent asymétriquement pour donner les premiers neurones (Mitsubishi and

Takahashi, 2009). Ces neurones nouvellement formés utilisent les cellules de glie radiaire pour migrer de la zone de production (dite zone germinale) vers la surface et produire une couche transitoire appelée pré-plaque. A partir du stade E13.5, une autre vague de neurones migre et divise la pré-plaque en deux zones : la zone marginale superficielle (qui sera la future couche I du cortex) et la sous-plaque (située plus tard en dessous de la couche VI). Les divisions cellulaires se poursuivent jusqu'au stade E17.5, formant en premier les cellules des couches profondes (couche VI puis V), puis les neurones des couches superficielles (couche IV puis II/III). La migration se fait donc de façon inversée, les cellules nouvellement formées migrant au-delà des cellules plus anciennes pour s'installer plus en surface. Il est intéressant de noter que les premières cellules formées, celles des couches profondes, sont des cellules de projection vers les aires sous-corticales, tandis que les cellules plus jeunes sont des cellules qui projettent majoritairement au sein du cortex. Ces différences dans les destins cellulaires sont dues à l'expression spécifique à chaque type neuronal de nombreux facteurs de transcription différents (Molyneaux et al., 2007; Pollen et al., 2015; Telley et al., 2016), lesquels constituent des marqueurs cellulaires permettant de distinguer les différentes couches au cours du développement et à l'âge adulte. Par conséquent, le « jour de naissance » développemental d'un neurone pyramidal détermine non seulement sa localisation dans les futures couches cortex mais également ses futures connexions et fonctions.

B. Grande diversité des interneurones corticaux

Les interneurones corticaux sont des cellules responsables de l'inhibition dans le cortex. Contrairement aux cellules pyramidales, leurs projections axonales sont généralement proches de leur corps cellulaire. Ces cellules ont un rôle crucial dans la génération et le maintien des oscillations corticales qui sont des variations de potentiel membranaire fondamentales pour la coordination des réseaux corticaux et les fonctions qui en résultent (Isaacson and Scanziani, 2011; Mann and Paulsen, 2006). Elles synthétisent le neurotransmetteur GABA qui a un effet post-synaptique inhibiteur à l'exception des premiers jours post-natals. Cette synthèse est rendu possible par l'expression de deux isoformes de l'enzyme glutamate décarboxylase 65 et 67 (codées respectivement par les gènes *Gad2* et *Gad1*) (Martin and Rimvall, 1993). Les interneurones corticaux modulent l'activité des réseaux en fonction de l'emplacement subcellulaire ciblé par leur axone sur les cellules post-synaptiques, permettant ainsi de réguler la capacité de produire des potentiels d'action, l'intégration synaptique et la plasticité dans les cellules excitatrices (**Figure 22**) (Huang et al., 2007). De plus, ce type cellulaire se caractérise par une très grande hétérogénéité permettant le contrôle inhibiteur de l'excitabilité des cellules cibles à divers niveaux.

La classification des interneurones corticaux est une tâche complexe. Plus de vingt sous-types d'interneurones corticaux ont été identifiés en se basant sur leur morphologie axonale et dendritique, leur propriétés électrophysiologiques, leur connectivité ainsi que sur leur profil d'expression génétique

(DeFelipe et al., 2013; The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING), 2008). Cependant, des études récentes montrent qu'il est possible de séparer l'ensemble des interneurons corticaux en fonction de l'expression de trois marqueurs principaux : PV, somatostatine (SST) et récepteur sérotoninergique 3a (5HT3aR) (Lee et al., 2010; Rudy et al., 2011), chacune de ces catégories pouvant être ensuite subdivisée en de nombreux autres groupes en fonction d'autres marqueurs exprimés (polypeptide vasoactif intestinal, cholécystokinine, reelin etc.)

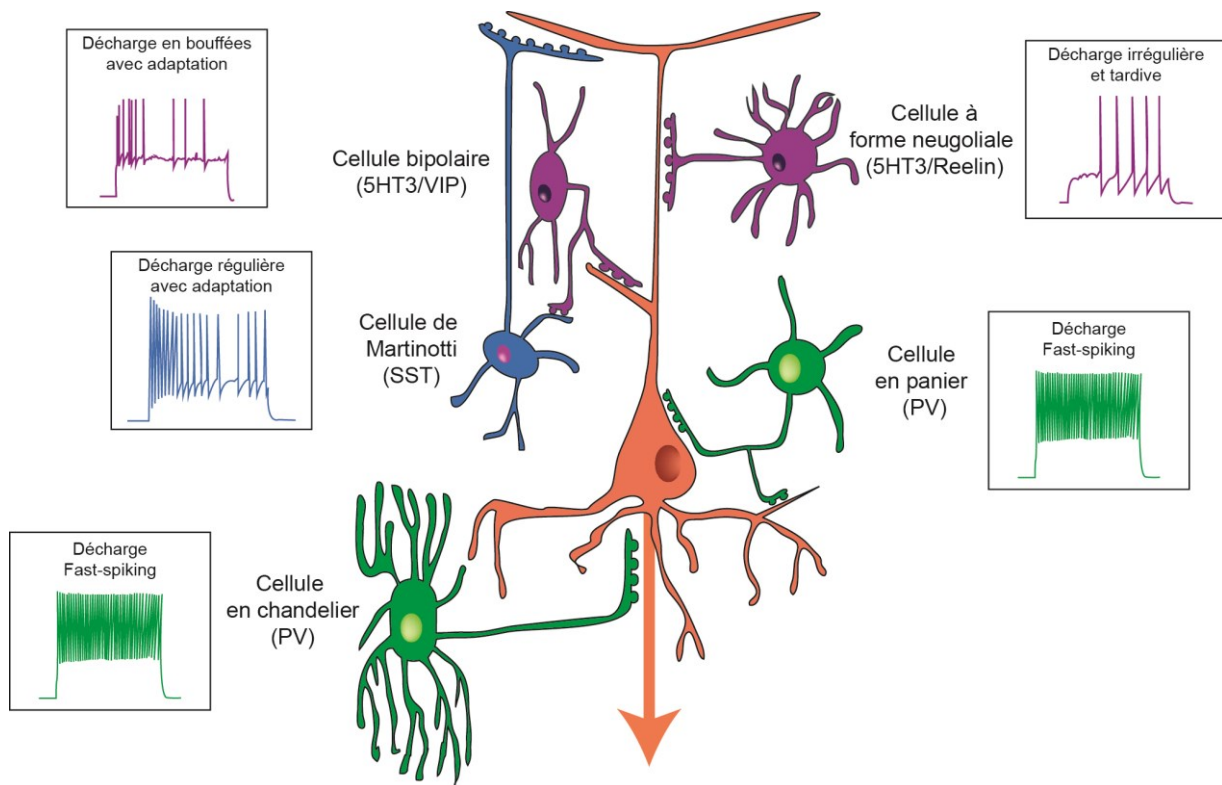


FIGURE 2 : DIVERSITE DES INTERNEURONES CORTICAUX

Schéma simplifié montrant la localisation subcellulaire des connexions établies par les interneurons sur leurs cellules cibles ainsi que leur pattern de décharge de potentiels d'action. Ces différentes cibles permettent une modulation fine de l'intégration dendritique, de la génération de la décharge de potentiels d'action, et des oscillations corticales (Adapté de Wamsley and Fishell, 2017; The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING), 2008).

Interneurones exprimant PV

La parvalbumine est une protéine de liaison au calcium dont l'expression dépend de l'activité de la cellule (Donato et al., 2013). Les interneurons exprimant PV représentent entre 40 et 50 % des interneurons corticaux (Fogarty et al., 2007; Lee et al., 2010). Ces cellules présentent un profil de décharge de potentiel

d'action (PA) caractérisé par des trains de potentiel d'action à haute fréquence (« fast-spiking ») avec une faible adaptation (Hu et al., 2014; Xu and Callaway, 2009). La majorité de ces cellules sont appelées cellules « en panier » en raison de la morphologie de leur arbre dendritique dite « multipolaire » et de la forte densité de l'innervation axonale périsonomatique de leurs cellules cibles. Elles peuvent être ensuite divisées en différentes sous-catégories en fonction de la taille de leur soma, l'arborisation dendritique et le site de leur projection axonale (The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING), 2008). Ces interneurons établissent des synapses au niveau du soma et des dendrites proximales des cellules excitatrices permettant ainsi un contrôle rapide de l'inhibition, mais également des synapses récurrentes sur d'autres cellules en panier PV permettant une gestion fine de la balance excitation/inhibition corticale (Ferguson and Gao, 2018). L'autre catégorie de neurones PV correspond aux cellules dites « en chandelier » ou « axo-axoniques », qui inhibent les neurones excitateurs au niveau du segment initial de l'axone ; étant donné que le potentiel d'inversion du GABA est élevé dans l'axone, elles peuvent cependant promouvoir l'excitabilité des neurones cibles quand ceux-ci sont hyperpolarisés (Somogyi et al., 1982; Szabadics, 2006; Woodruff et al., 2011).

Interneurones exprimant SST

La somatostatine (SST) est un neuropeptide exprimé par environ 30% des neurones corticaux. Deux types d'interneurones expriment SST, les cellules de Martinotti et les cellules non-Martinotti. Les cellules de Martinotti présentent une morphologie typique, avec un axone ascendant projetant de multiples ramifications dans la couche I du cortex, au niveau des dendrites distales des cellules pyramidales (Kawaguchi, 1997; Wang et al., 2004). Ces cellules présentent des profils de décharge de PA de type régulier ou en « burst » avec une grande adaptation (Wang et al., 2004). Les cellules SST non-Martinotti ont une morphologie de type cellule en panier et des projections locales (Riedemann, 2019). Leur profil électrophysiologique de décharge est plus rapide que celui des cellules de Martinotti, mais présente une adaptation qui les différencie des interneurons « fast-spiking ».

Interneurones exprimant 5HT3aR

Une troisième catégorie, retrouvée dans le cortex, est composée d'interneurones très hétérogènes qui expriment le récepteur à la sérotonine 3a (5-HT3aR). On distingue différents sous-types de cellules en fonction de leur expression spécifique des marqueurs suivants : le peptide vasoactif intestinal (VIP), la Reelin, et le neuropeptide Y (NPY). Cependant, certains interneurons peuvent co-exprimer ces facteurs. Les interneurons VIP déchargent des potentiels d'action en bouffées, et inhibent les cellules excitatrices au niveau des dendrites (Cauli et al., 2000; Lee et al., 2010; Miyoshi et al., 2010), ainsi que d'autres interneurons corticaux (Acsády et al., 1996; Dávid et al., 2007). Deux autres types d'interneurones expriment 5HT3aR : les cellules multipolaires NPY+ et les neurones interstitiels GABAergiques Meis2+.

Les interneurons multipolaires NPY+ présentent des propriétés de décharge irrégulière et sont particulièrement abondants à la frontière entre les couches I et II (Gelman et al., 2009; Miyoshi et al., 2010). Les neurones Meis2+ résident dans la substance blanche et étendent leur axone vers les couches profondes du cortex et le striatum (Frazer et al., 2017; von Engelhardt et al., 2011).

C. Origine des interneurons GABAergiques

Les interneurons corticaux sont générés pour l'essentiel au stade embryonnaire dans le télencéphale ventral. Les cellules progénitrices qui donneront les interneurons corticaux sont situées dans trois régions distinctes : l'éminence ganglionnaire médiane (EGM), l'éminence ganglionnaire caudale (EGC) et l'aire préoptique (APO) (Anderson, 2002; Gelman et al., 2009; Ma et al., 2013). Chez la souris, cette neurogenèse commence dès le stade embryonnaire E9.5 et se poursuit jusqu'au stade E18.5 (Hu et al., 2017). Les interneurons formés dans le télencéphale ventral migrent d'abord tangentiellement jusqu'à la pré-plaque, puis de manière radiale pour aller coloniser les différentes couches corticales. Une petite fraction des interneurons corticaux exprimant le marqueur 5HT3aR est générée après la naissance dans la zone sous-ventriculaire (**Figure 3**) (Inta et al., 2008; Le Magueresse et al., 2011).

L'identité de ces interneurons dépend de l'expression d'une combinaison complexe de facteurs de transcription dans les différentes régions où les cellules progénitrices se divisent. Les facteurs *Dlx1/2* et *Mash1* sont exprimés dans toutes les zones productrices donnant l'identité d'interneurons aux futures cellules (Parras, 2002; Stühmer et al., 2002). L'importance de ces facteurs de transcription a été mise en évidence par la genèse de souris KO pour les gènes *Dlx1* et *Dlx2* qui présentent une forte diminution de la densité d'interneurons corticaux (Potter et al., 2009). A l'inverse, l'expression ectopique des gènes *Dlx*, et particulièrement *Dlx2*, est suffisante pour induire l'expression de *GAD65* dans les interneurons (Stühmer et al., 2002). Par la suite, d'autres facteurs de transcription ont été identifiés dans les trois régions productrices d'interneurons corticaux en utilisant des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de différents promoteurs (Fogarty et al., 2007; He et al., 2016).

- L'éminence ganglionnaire médiane est la principale source des interneurons du cortex (Butt et al., 2005; Wichterle et al., 1999). Les cellules de cette zone expriment notamment le facteur de transcription *Nkx2.1*, et peuvent également être identifiées par l'expression des gènes *Nkx6.2*, *Nr2f2* ou *Lhx6* qui sont exprimés en gradient au sein des différentes subdivisions de la EGM (dorsale, intermédiaire et ventrocaudale). Cela permet en partie d'expliquer la genèse de différents sous-types d'interneurons provenant de cette région (Butt et al., 2005; Fogarty et al., 2007; Miyoshi et al., 2007). Ces interneurons exprimeront par la suite PV (environ 70%) et SST (30%).

- L'éminence ganglionnaire caudale produit entre 20 et 30% des interneurons corticaux (Miyoshi et al., 2010). Les cellules progénitrices expriment *Gsh2* (« *Genomic screened homeobox 2* ») (Fogarty et al., 2007) et donneront plus tard les interneurons 5HT3a.
- Enfin, une petite proportion des interneurons corticaux provient de l'aire préoptique (environ 5%). Ces cellules progénitrices expriment *Nkx5.1* et donneront des interneurons exprimant le neuropeptide Y et/ou la reeline (Gelman et al., 2009). Dans le cortex post-natal, on retrouve ces interneurons dans les couches superficielles (**Figure 3**).

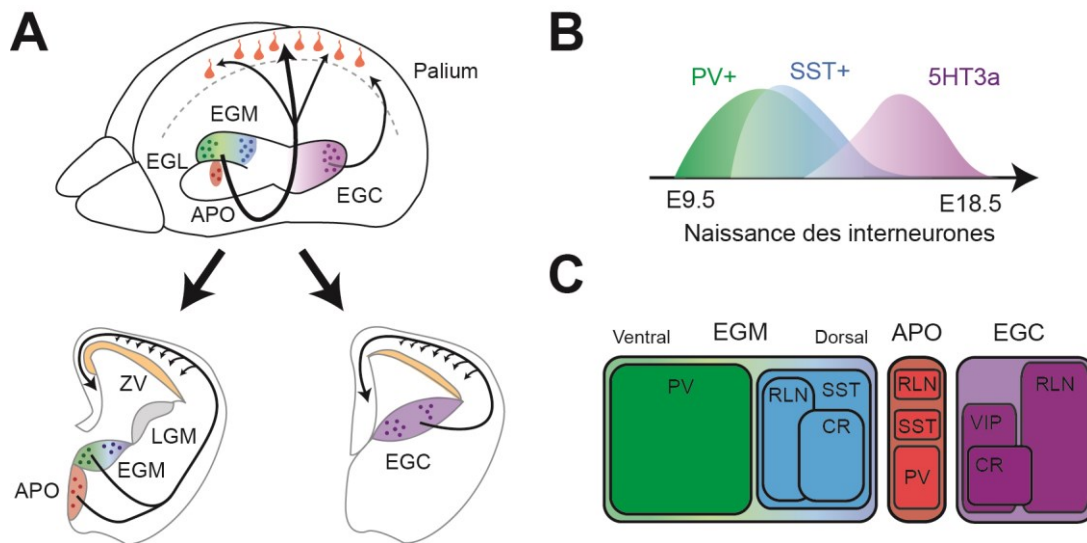


FIGURE 3 : ORIGINE SPATIO-TEMPORELLE DES INTERNEURONES CORTICAUX

- A) Schémas représentant les différentes zones de production des interneurons, leur migration tangentielle avant de coloniser le cortex en formation par une migration radiale. ZV : zone ventriculaire.*
- B) Genèse temporelle des interneurons provenant l'EGM et EGC (Adapté de Butt et al., 2017).*
- C) Devenir des interneurons en fonction de leur zone de production. (Adapté de Kessarar et al., 2014).*

La grande diversité d'interneurons corticaux est donc en partie une conséquence de différences d'origine spatiale. Cependant, la dimension spatiale n'explique pas à elle seule la diversité des interneurons corticaux et qui dépend également d'une composante temporelle (Miyoshi and Fishell, 2011). Des études sur le devenir de clones d'interneurons dans l'EGM ont montré qu'un pool de cellules progénitrices pouvait donner à la fois des interneurons PV et des interneurons SST en fonction du jour de naissance de la cellule (Brown et al., 2011; Harwell et al., 2015). Par la suite, la position dans le cortex ne se fait pas de façon aléatoire : les cellules issues d'un même clone se retrouve majoritairement dans la même « colonne corticale », organisation cellulaire verticale du cortex formant des microcircuits au

sein desquels les cellules sont très connectées (Brown et al., 2011; Ciceri et al., 2013; Harris and Shepherd, 2015).

La perturbation du déroulement correct des différentes étapes de genèse, migration et intégration dans les réseaux des neurones impacte fortement le cerveau adulte. La voie neuréguline-ErbB en offre un exemple intéressant. Des perturbations survenant lors de la migration des cellules inhibitrices ont été associées à différentes maladies psychiatriques telles que la schizophrénie et l'autisme (Marín, 2012). La migration tangentielle des interneurons est dépendante de la voie de signalisation Neureguline-ErbB et notamment de l'interaction entre *Nrg1* et son récepteur *ErbB4* qui est exprimé par les progéniteurs provenant de l'EGM (Flames et al., 2004; Yau, 2003). Des modèles murins de sur-expression ou de délétion de l'une ou l'autre de ces protéines montrent des diminutions du nombre d'interneurones PV dans le cortex (Li et al., 2012). De façon intéressante, *NRG1* ainsi que *ERBB4* sont tous deux des gènes fortement associés à la schizophrénie, à la fois dans des études génétiques sur des cohortes de patients et par le biais de l'analyse des ARNm de tissus post mortem (Britsch, 2007; Joshi et al., 2014; Lewis et al., 2003; Li et al., 2006). Les modèles animaux présentent également des phénotypes comportementaux semblables à ceux qui, chez l'homme, sont associés à la schizophrénie (Li et al., 2012). De plus, la suppression de *ErbB4* spécifiquement dans les interneurons PV est suffisante pour induire ces phénotypes (Shamir et al., 2012) démontrant l'importance de ces neurones dans la pathologie. Cette voie est également impliquée dans le phénomène de période critique du cortex visuel qui sera décrit plus loin.

D. Synaptogenèse et perte de synapses excitatrices au cours du développement postnatal

A la naissance chez les mammifères, la plupart des neurones ont atteint leur position définitive dans les couches corticales, mais sont encore immatures. Ainsi, les cellules pyramidales ont un axone basal peu développé et très peu de dendrites latérales. Dès la fin des années 1970, des données obtenues par marquage de Golgi sur du tissu cortical humain montraient que la densité d'épines dendritiques augmente fortement au cours des premières années de vie postnatale, avant de décroître à la fin de l'enfance, pour finalement se stabiliser à l'âge adulte (Huttenlocher, 1979). L'utilisation de la microscopie électronique, notamment sur des coupes de cortex de primate par les équipes de Pasko Rakic et Patricia Goldman-Rakic à Yale, a permis de préciser les étapes de formations des synapses corticales de la conception à la mort (Bourgeois and Rakic, 1993; Bourgeois et al., 1994; Rakic et al., 1994). Ces études ont notamment montré que la synaptogenèse débute tôt au cours du développement embryonnaire avec une production massive de synapses jusqu'aux premières années de vie postnatale, suivie d'un plateau jusqu'à l'adolescence où le nombre de synapses est très élevé puis décroît progressivement chez le jeune animal jusqu'à l'âge adulte suite au phénomène d'élagage synaptique (**Figure 4**). Cette cinétique est conservée chez tous les mammifères étudiés, ce qui suggère un contrôle génétique fin des phénomènes de

synaptogénèse (Bourgeois, 1997). Toutefois, le pic de production synaptique ne se produit pas au même moment dans toutes les régions du cerveau. Les études réalisées chez l'homme ont montré un développement des contacts synaptiques plus précoce dans les cortex auditif et visuel que dans le cortex préfrontal (Huttenlocher and Dabholkar, 1997). Ce pic de formation synaptique pourrait avoir une importance fonctionnelle car il est corrélé aux périodes de plasticité retrouvées plus tard au cours du développement : les régions tel que le cortex préfrontal ayant un pic de production synaptique tardif ont des périodes de plasticité débutant plus tard que les cortex sensoriels. De plus, cette première phase de synaptogénèse est dépendante de facteurs intrinsèques et indépendante de l'activité neuronale. Ceci a notamment été démontré par une étude quantitative dans le cortex visuel chez le primate qui révèle que la densité synaptique est indépendante de l'âge d'exposition à la lumière (Bourgeois et al., 1989). L'influence du patrimoine génétique est alors prédominante (Gilman et al., 2011). Cette première étape contraste avec la formation de nouvelles synapses plus tardive dans la vie de l'individu, dépendante de l'apprentissage et des expériences sensorielles (Kleim et al., 1996; Knott et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002).

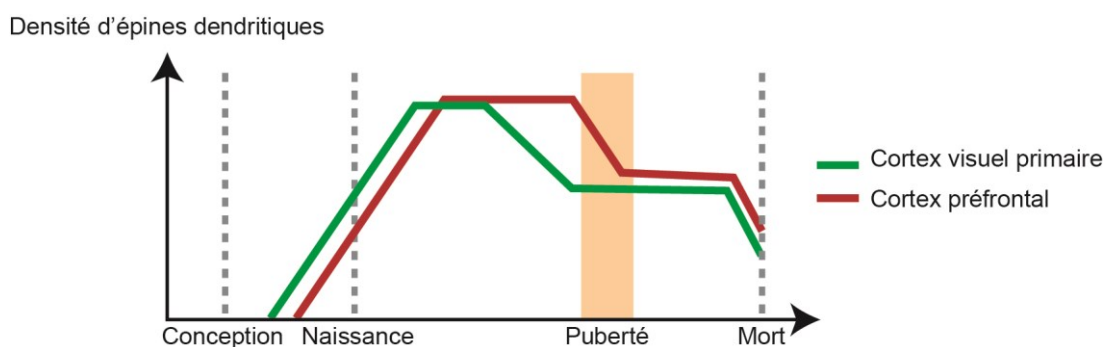


FIGURE 4 : SYNAPTOGENESE DANS LES CORTEX PRIMAIRE ET PREFRONTAL CHEZ L'HOMME.

Cinétique de la densité d'épines dendritiques dans deux régions corticales au cours de la vie (Adapté de Kolb and Fantie, 2009).

La synaptogénèse au cours du développement embryonnaire et post-natal précoce produit des synapses en excès. Une suppression des synapses surnuméraires permet, par stabilisation sélective des synapses les plus actives au détriment des synapses inactives, d'établir des circuits neuronaux matures adaptés à l'environnement. Ce phénomène d'élagage synaptique se produit au cours du développement postnatal et est dépendant notamment des cellules gliales (Pour revue Schafer and Stevens, 2013). Il sera décrit plus en détail par la suite.

Mécanismes de formation des synapses excitatrices

La formation d'une synapse débute par le contact entre le cône de croissance de la branche axonale d'un neurone présynaptique et les filopodes dendritiques postsynaptiques. Les filopodes sont des protrusions de la membrane dendritique transitoires, très mobiles, et contenant une forte concentration de molécules d'actine (Landis and Reese, 1983). L'utilisation de la microscopie bi-photonique *in vivo* a permis d'établir que le renouvellement (ou turnover) des filopodes est très rapide, pouvant être de l'ordre de quelques heures dans le cortex (Pan and Gan, 2008). Ces filopodes sont à l'origine des futures synapses mais ne contiennent pas encore le matériel essentiel pour la transmission synaptique (Ziv and Smith, 1996). Une fois le contact membranaire stabilisé entre l'axone et le filopode, un ensemble de molécules de signalisation, de protéines d'échafaudage, de molécules d'adhésion, ainsi que de récepteurs au glutamate NMDA sont recrutés au niveau du filopode, formant ainsi une épine dendritique encore immature (Hlushchenko et al., 2016). La partie présynaptique de la synapse, provenant de l'axone, recrute également des protéines d'échafaudage, des canaux ioniques voltage-dépendants, des récepteurs aux neurotransmetteurs, ainsi qu'un grand nombre de protéines impliquées dans l'endocytose et exocytoses de vésicules (Ziv, 2001). Ces synapses sont dites silencieuses, caractérisées par la présence de récepteurs NMDA postsynaptiques, mais dépourvues de récepteurs AMPA. La maturation des synapses se poursuit avec l'incorporation de récepteurs glutamatergiques de type AMPA, indispensables à la transformation des synapses silencieuses en synapses fonctionnelles : en effet, les récepteurs de type NMDA présents au niveau postsynaptique sont bloqués par les ions magnésium au potentiel de repos de la cellule, empêchant l'influx cationique excitateur suite à la réception de glutamate d'origine présynaptique. Ainsi, les synapses silencieuses exprimant uniquement des récepteurs NMDA sont incapables de transmettre l'information communiquée par les potentiels d'action présynaptiques. L'insertion de récepteurs AMPA permet l'établissement de synapses fonctionnelles. Ce phénomène est dépendant de l'activité (Funahashi et al., 2013).

Synapses silencieuses

Les synapses silencieuses sont très abondantes aux premiers stades du développement, puis leur concentration diminue progressivement au cours de la maturation des réseaux (Rumpel et al., 1998). Il a été montré par exemple que ces synapses silencieuses sont abondantes aux afférences thalamo-corticales dans le cortex somato-sensoriel à P2-P3, puis diminuent progressivement jusqu'à P6-7. Au stade P8-P9, on ne détecte plus de synapses silencieuses (Isaac et al., 1997). La perte développementale de ces synapses silencieuses peut être expliquée par leur passage de stade silencieux au stade actif (incorporation de récepteurs AMPA dans la membrane postsynaptique) via un processus dépendant de l'activité (Hall and Ghosh, 2008; Hanse et al., 2013; Huang et al., 2015). En effet, les synapses silencieuses des cellules pyramidales de la couche II/III sont fortement présentes avant l'âge d'ouverture des yeux, puis diminuent progressivement jusqu'à disparaître au début de l'âge adulte. L'élevage de

souris dans le noir bloque cette perte de synapses silencieuses, et leur concentration ne varie que très peu entre les stades juvénile et adulte dans ces conditions de déprivation sensorielle qui diminue l'activité (Funahashi et al., 2013). Cependant, on ne peut pas exclure qu'une partie de ces synapses disparaît à cause de l'élagage synaptique préférentiel des synapses peu ou pas actives, dépendant des cellules microgliales (Basilico et al., 2019). Ces synapses jouent donc un rôle important dans le développement des circuits corticaux, ainsi que dans la plasticité.

3. Établissement de réseaux fonctionnels : périodes critiques de développement

Les grandes étapes de mise en place du cortex pendant la vie embryonnaire et les premiers jours post-nataux sont, pour l'essentiel, régulées par des facteurs génétiques. Une deuxième période, pendant laquelle l'activité synaptique et l'expérience jouent un rôle prépondérant, intervient dans les jours et semaines qui suivent. Une fois les synapses formées, les réseaux établis se raffinent afin d'assurer de façon durable un traitement optimal de l'information tout au long de la vie de l'individu. Les connexions neuronales sont alors encore immatures. La maturation des réseaux neuronaux s'opère à la fois par l'intermédiaire du raffinement synaptique (Keemst et al., 2016) et par un ensemble de phénomènes de plasticité synaptique, de changements morphologique et d'excitabilité, permettant d'établir des circuits stables et matures. Cette maturation est ainsi influencée à la fois par le patrimoine génétique et l'activité neuronale.

A. Période critique : découverte et définition

On retrouve chez un grand nombre d'espèces et pour différentes modalités (sensorielles, motrices et cognitives) des périodes développementales pendant lesquelles les réseaux neuronaux sont extrêmement plastiques et peuvent se reconfigurer en réponse à des altérations de l'environnement. Ces « périodes critiques » sont définies comme des phases de forte plasticité dépendante de l'activité et sont restreintes à des fenêtres temporelles délimitées au cours du développement post-natal. En dehors des périodes critiques, la plasticité des réseaux est amoindrie. En fonction de la modalité et de l'espèce, les périodes critiques peuvent être plus ou moins longues et ont lieu à différents stades du développement post-natal (**Figure 5**).

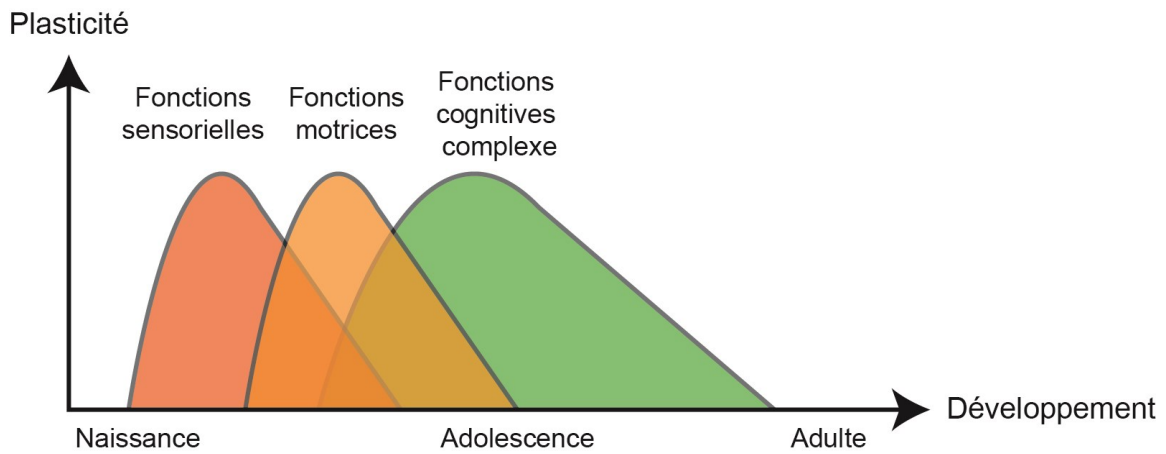


FIGURE 5 : DEVELOPPEMENT DES PERIODES CRITIQUES CORTICALES CHEZ L'HOMME (ADAPTE DE HENSCH, 2005)

La notion de période critique a commencé à émerger au début du XXème siècle avec les travaux de Lorenz sur l'attachement maternel chez le poussin. Tirant parti des observations de Heinroth dans les années 1910, Lorenz a, dans les années 1930, étudié et popularisé l'existence d'un phénomène d'empreinte se produisant très rapidement après l'éclosion de l'œuf d'un oisillon (quelques heures). Cette fenêtre temporelle très courte, durant laquelle un oisillon s'attache de façon rapide et indélébile au premier objet ou individu en mouvement après sa sortie de l'œuf, a d'abord été nommée période critique, puis période de sensibilité. L'empreinte ne peut avoir lieu en dehors de ce laps de temps bien défini (Lorenz, 1935). Par la suite, l'existence d'un grand nombre de périodes critiques a été décrite. Ainsi, de nombreuses études ont identifié et caractérisé les périodes critiques d'apprentissage du langage et de la mise en place de la vision chez l'homme (Daw, 1998; Friedmann and Rusou, 2015; Snow and Hoefnagel-Hohle, 1978).

B. Similarité et diversité des périodes critiques

L'utilisation de modèles animaux a permis d'identifier différents mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les périodes critiques corticales et notamment dans celles des cortex sensoriels. Chez la souris et le rat, les études se sont majoritairement portées sur les périodes critiques du cortex visuel, du cortex auditif et du cortex somatosensoriel (de Villers-Sidani et al., 2007; Erzurumlu and Gaspar, 2012; Hensch, 2005; Kilgard et al., 2001; van der Bourg et al., 2019).

Ces études ont démontré des points communs aux différentes périodes critiques sensorielles. Tout d'abord, ces périodes critiques sont dépendantes du développement des organes sensoriels associés, ainsi que de leur activation. En effet, en l'absence d'entrées sensorielles à certains stades de développement,

l'ouverture des périodes critiques est retardée. Placer une souris dans le noir durant les premières semaines post-natales décale l'ouverture de la période critique du cortex visuel (Fagiolini et al., 1994). Dans le cortex auditif, l'établissement des cartes auditives corticales est retardé si la souris a été placée dans un environnement insonorisé durant les premiers jours post-nataux (Chang, 2003; de Villers-Sidani et al., 2007). Des études ultérieures ont démontré que l'inhibition médiée par les interneurons GABAergiques joue un rôle clé dans la survenue et la délimitation de ces périodes critiques. Certaines molécules telles que des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (« *Brain-derived neurotrophic factor* » ou BDNF), ou certaines drogues peuvent déplacer temporellement la survenue de ces périodes critiques (Huang et al., 1999; Singh et al., 1997). Enfin, les cellules gliales jouent également un rôle important dans les périodes critiques corticales en général (Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007; VanRyzin et al., 2018). Un exemple de période critique dépendante des microglies sera détaillé dans la troisième partie de l'Introduction.

Cependant, il existe des différences notables dans le développement des différentes modalités sensorielles et par conséquent dans les périodes critiques associées. La période critique la plus étudiée est celle se produisant dans le cortex visuel et sera détaillée dans la deuxième partie de cette introduction. Elle survient chez la souris entre le 21^{ème} et 35^{ème} jour post-natal (Hensch, 2005). La période critique dans le système somato-sensoriel se produit plus tôt, avec un raffinement des territoires de projection des afférences thalamo-corticales en réponse au développement des vibrisses dans les premiers jours de vie (Erzurumlu and Gaspar, 2012). Le système auditif quant à lui a une période critique très limitée dans le temps, et qui s'étend du 11^{ème} au 13^{ème} jour post-natal chez le rongeur (Zhang et al., 2001). Cependant, il convient de mentionner que les méthodes expérimentales utilisées diffèrent selon les modalités sensorielles étudiées. Pour étudier les conséquences de la perte transitoire de la vision pendant la période critique dans le système visuel, une suture des paupières est réalisée, laissant intacte les cellules de la rétine et les voies associées. Il est donc ensuite possible, après une fermeture provisoire, de rouvrir l'œil suturé et d'étudier la réponse aux stimuli provenant de cet œil. En revanche, l'étude des périodes critiques du système somato-sensoriel fait en général intervenir une ablation des vibrisses, organe sensoriel chez la souris, ou une section du nerf projetant au thalamus puis au cortex, empêchant tout retour possible à une stimulation sensorielle par la suite.

On comprend aisément que les cortex sensoriels soient de bons modèles d'études pour les périodes critiques de développement dépendant de l'environnement, car il est possible de maîtriser les entrées sensorielles chez les animaux étudiés. Cependant, d'autres périodes critiques ont été mises en évidence, notamment dans des régions corticales associatives impliquant le système limbique. Chez le rongeur, une séparation maternelle répétée pendant les premiers jours de vie postnatale induit de profond changement au niveau comportemental ainsi qu'au niveau des connexions synaptiques dans le cortex cingulaire antérieur et dans l'hippocampe (Helmeke, 2001; Monroy et al., 2010; Ovtscharoff and Braun, 2001). Chez l'octodon, rongeur utilisé comme modèle pour étudier les phénomènes d'attachement social

(Colonnello et al., 2011), la séparation maternelle répétée pendant les trois premières semaines de vie provoque une augmentation de la densité d'épines dendritiques, ainsi qu'une augmentation de la taille des dendrites dans les cellules pyramidales du cortex cingulaire antérieur chez l'adulte. De plus, des études menées chez le rat ont montré qu'un stress répété induit chez la mère pendant la gestation ou les premières semaines de vie de la progéniture provoque des modifications drastiques et persistantes de la morphologie des cellules des couches II/III du cortex préfrontal à l'âge adulte (Murmu et al., 2006; Mychasiuk et al., 2012). Même si l'on retrouve des modifications similaires après un stress réalisé chez l'adulte, ces changements sont réversibles après 3 semaines d'absence de stress, contrairement à ceux produits par le stress pré-natal ou péri-natal (Radley et al., 2005). L'ensemble de ces expériences suggère donc une période critique précoce des cortex limbiques.

II. LE CORTEX VISUEL CHEZ LA SOURIS : UN MODELE PRIVILEGIE POUR L'ETUDE DES PERIODES CRITIQUES CORTICALES DEPENDANTES DE L'ACTIVITE

Les phénomènes de plasticité se produisant durant les périodes critiques ont été très étudiés dans le cortex visuel chez un grand nombre de mammifères tels que le chat, la souris, le furet et le macaque (Gordon and Stryker, 1996; Horton and Hocking, 1997; Issa et al., 1999; Olson and Freeman, 1980). En particulier, les études pionnières réalisées par Hubel et Wiesel dans les années 1960 chez le chat ont initié la compréhension des mécanismes impliqués.

Avant de détailler les mécanismes de la période critique du cortex visuel, il convient de décrire les bases de la vision et les voies visuelles chez la souris. Seront ensuite précisés les mécanismes cellulaires déjà identifiés dans la période critique de plasticité du cortex visuel et enfin le rôle crucial des interneurons PV.

1. Organisation générale des voies visuelles

Chez la souris comme chez les autres mammifères, la vision est binoculaire. La formation d'une image requiert l'arrivée d'informations en provenance des deux yeux qui va ensuite être modulées avant d'être traitées au niveau du cortex visuel primaire (V1), ce qui permet une représentation en trois dimensions. Le système visuel comprend la rétine, les tractus optiques, différents noyaux sous corticaux dont le corps géniculé latéral (noyau thalamique, dLGN) et le colliculus supérieur, et enfin le cortex visuel (**Figure 6**) (Hübener, 2003). Les mammifères supérieurs présentent une rétinotopie, c'est-à-dire que l'organisation topographique est conservée entre les réponses sensorielles des cellules ganglionnaires de la rétine et celles de leurs cibles post-synaptiques dans les zones cérébrales en aval (LGN, V1). De récentes expériences d'imagerie ont pu mettre en évidence l'existence d'une rétinotopie chez la souris dans le dLGN et le cortex (Huberman et al., 2008; Zhuang et al., 2017).

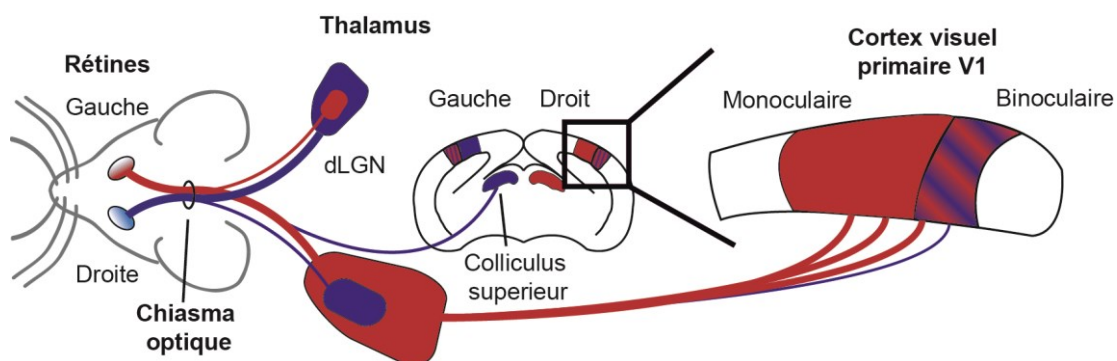


FIGURE 6 : VOIES VISUELLES CHEZ LA SOURIS (ADAPTE DE HOOKS AND CHEN, 2020)

A. *Rétine et tractus optique : première étape de régulation de la vision binoculaire*

La rétine est l'organe sensoriel responsable de la vision chez les mammifères. Elle est composée de différentes couches cellulaires tapissant le fond de l'œil dont le rôle est de capter le signal lumineux et de le transformer en signal électrique pour l'acheminer le long du nerf optique. Les cellules qui la composent répondent spécifiquement à certaines orientations ou intensités lumineuses, dépendant en partie de leur position dans la rétine (Paik and Ringach, 2011). La couche la plus profonde de la rétine est composée du corps cellulaire des cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique. La majorité de ces axones, organisés en fibres, croise les axones provenant de l'autre œil au niveau du chiasma optique et continue jusqu'au thalamus de l'hémisphère opposé (contralatéral). Cependant, 5 à 10 % des cellules ganglionnaires de la rétine ne croisent pas le chiasma et projettent vers le thalamus du même côté (ipsilatéral) (Dräger and Olsen, 1980; Grafstein, 1971; Jeffery and Erskine, 2005). Ce phénomène est finement régulé par un grand nombre de molécules permettant le bon acheminement des axones et permettant ainsi la vision binoculaire (Murcia-Belmonte and Erskine, 2019). Ces axones provenant de chaque œil sont ségrégués le long du nerf optique et projettent dans des territoires spécifiques du dLGN (rétinotopie).

B. *Thalamus : une structure-relais*

Le dLGN comporte deux types cellulaires majoritaires recevant tous deux des axones provenant de la rétine. 90% de ces cellules sont des cellules excitatrices thalamo-corticales dont l'axone projette directement vers le cortex visuel (Arcelli et al., 1997). Cet axone ascendant envoie également des collatérales dans d'autres structures thalamiques dont le noyau réticulé, composé de cellules inhibitrices qui assurent un contrôle inhibiteur latéral (ou « *feedforward* ») des cellules thalamo-corticales (Pinault, 2004). Les 10% restants sont des interneurons GABAergiques dont le champ d'action se limite au dLGN où ils inhibent les cellules thalamo-corticales par rétrocontrôle négatif (inhibition « *feedback* »). Ces différents mécanismes d'inhibition permettent au dLGN de jouer un rôle de filtre de l'information visuelle transmise au cortex.

L'anatomie du dLGN est caractérisée par une organisation complexe en colonne chez les mammifères carnassiers tel que le chat, le furet et également chez les primates (Usrey and Alitto, 2015). Ces colonnes successives reçoivent de façon ségréguée des axones des différentes cellules ganglionnaires de la rétine de l'œil ipsi et de l'œil contralatéral. Chez le rongeur, cette discrimination des afférences provenant de chaque œil est simplifiée. Le dLGN du rongeur est divisé en deux territoires non-chevauchants recevant les connexions d'un des deux yeux (Reese, 1988; Usrey and Alitto, 2015). Ces territoires, appelé domaines oculaires spécifiques, ont été mis en évidence par des expériences d'injection dans chaque œil

de la toxine cholérique β conjuguée à des molécules fluorescentes différentes, permettant de tracer les axones le long du tractus optique, ainsi que d'identifier leurs cellules cibles dans le dLGN (Discenza and Reinagel, 2012; Rebsam et al., 2012). Ces expériences ont notamment permis de montrer que la grande majorité des connexions du dLGN proviennent de l'œil contralatéral, et que seule une petite partie située au centre du dLGN reçoit les axones de l'œil ipsilatéral. La position des yeux diffère en fonction des espèces, ce qui a un impact important sur la vision binoculaire, ainsi que sur la ségrégation des informations provenant de chaque œil et sur l'organisation des structures le long des voies visuelles (Howarth et al., 2014). La localisation latérale des yeux chez la souris engendre une faible zone binoculaire comparativement au chat ou au primate.

L'établissement des domaines oculaires dans le dLGN se fait au cours d'une période bien défini très tôt au cours du développement post-natal qui permet l'établissement de domaines non-chevauchant par la suite. Initialement, l'ensemble du dLGN est colonisé par des axones provenant des deux yeux. Puis des étapes d'élagage synaptique définissent des territoires spécifiques (Stevens et al., 2007) et permettent une bonne transmission de l'information visuelle au cortex. Les mécanismes impliqués dans ce raffinement des domaines oculaires constituent depuis longtemps un champ de recherche majeur. L'étude de ce système a ainsi permis d'élucider les mécanismes d'élagage synaptique au cours du développement et notamment la contribution des cellules microgliales dans ce processus. Les différentes études et phénomènes impliqués seront détaillés dans la troisième partie de cette introduction.

C. Cortex visuel primaire : architecture et connexions

L'organisation topographique des projections rétiniennes dans le dLGN est conservée par ses cellules thalamo-corticales qui projettent ensuite vers le cortex visuel primaire (V1) dans des territoires bien définis. Des études chez le chat, le furet et le primate ont montré l'existence de colonnes de dominances oculaires dans V1 correspondant à celles présentes dans le dLGN (Gattass et al., 2005; Hubel and Wiesel, 1962). Les neurones présents au sein d'une même colonne corticale répondent de la même façon à une stimulation lumineuse provenant spécifiquement d'un des deux yeux. De plus, on retrouve une alternance des afférences thalamiques provenant de l'œil ipsi et contralatéral organisées en fines bandelettes dans l'ensemble du cortex visuel primaire (Wiesel et al., 1974). L'établissement de ces colonnes de dominance oculaire est dépendant de l'activité rétinienne au cours du développement post-natal. Stryker et Harris l'ont démontré par l'injection de tétrodoxtine (TTX) dans l'œil chez le chat au stade P14, ayant pour effet de bloquer l'activité des cellules ganglionnaires rétiniennes, provoquant une disparition de ces colonnes dans le cortex (Stryker and Harris, 1986). C'est notamment grâce à ces colonnes de dominance oculaire que l'étude des réponses des cellules pyramidales suite à une stimulation lumineuse d'un des deux yeux a permis de mettre en évidence la période critique dépendante de l'activité.

Chez les rongeurs, à l'instar du dLGN, on ne retrouve pas de colonnes de dominance oculaire dans V1. Schématiquement, le cortex visuel est séparé en deux domaines : un domaine dit monoculaire, qui occupe la majorité du cortex visuel primaire, dont les cellules excitatrices répondent presque exclusivement aux stimulations visuelles provenant de l'œil contralatéral ; et un domaine dit binoculaire, recevant des afférences excitatrices provenant des deux yeux (Hübener, 2003).

Organisation d'une colonne corticale visuelle

Comme je l'ai exposé brièvement dans la première partie de cette introduction, le cortex visuel est organisé en différentes couches cellulaires et comporte une épaisse couche IV. L'arrivée des afférences du dLGN se fait majoritairement au niveau de la couche IV du cortex visuel primaire, et également vers les couches V et VI (Ghosh et al., 1990; Morgenstern et al., 2016). Les cellules de la couche IV projettent fortement vers la couche II/III qui est considérée comme une couche d'intégration car ses neurones reçoivent également des afférences des autres aires corticales. Les cellules de la couche II/III envoient des projections vers les cellules pyramidales de la couche V qui en retour projettent vers d'autres noyaux sous-corticaux. Les interneurons inhibiteurs présents dans la couche IV sont majoritairement des interneurons PV et SST. Ces deux types d'interneurons reçoivent des afférences directes du thalamus (Scala et al., 2019), bien que cette connexion soit plus importante sur les interneurons PV (Cruikshank et al., 2010). L'inhibition somatique forte que procurent les interneurons PV aux cellules pyramidales de la couche IV permet un contrôle « *feedforward* » de l'afférence thalamique. Dans les couches II/III, on retrouve également des interneurons VIP inhibant les interneurons SST (Pfeffer et al., 2013) et modulés par la libération d'acétylcholine des noyaux sous corticaux (Fu et al., 2014).

2. Période critique du cortex visuel primaire : une période d'hyper-plasticité

Le circuit visuel fonctionnel adulte est dépendant d'un développement progressif des différents maillons de la chaîne des voies visuelles. Par exemple, chez la souris la rétinitopie se met en place au cours de la première semaine post-natale, avant même l'ouverture des yeux (qui se produit aux alentours de P13) alors que la sensibilité à l'orientation et la binocularité se mettent en place plus tardivement (**Figure 7**). Comme je l'ai indiqué dans la première partie de cette introduction, la mise en place physiologique des réseaux du cortex se fait lors de périodes critiques dépendantes de l'activité.

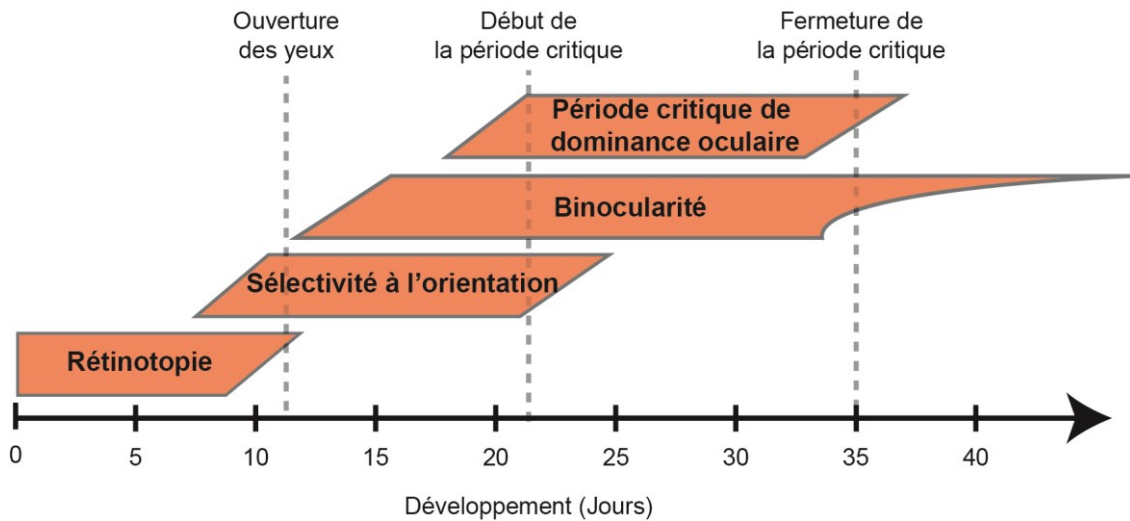


FIGURE 7 : DEVELOPPEMENT DU CORTEX VISUEL CHEZ LA SOURIS (ADAPTE DE ESPINOSA ET STRYKER, 2013)

A. Déprivation monoculaire : mise en évidence de la période critique

L'existence du phénomène de période critique dans le cortex visuel a été mis en évidence chez le chat par David Hubel et Torsten Wiesel en suturant un œil chez le jeune chat pendant une période de 2 à 4 semaines, bloquant ainsi toute l'activité visuelle en provenance de cet œil. Après réouverture de l'œil, l'enregistrement des réponses des cellules du cortex visuel primaire à des stimulations lumineuses d'un des deux yeux leur a permis d'identifier un changement drastique de la dominance oculaire de ces cellules qui répondaient désormais majoritairement aux stimuli provenant de l'œil resté ouvert. Ils ont également pu déterminer que cette modification de la dominance oculaire se produisait uniquement si la suture de l'œil était réalisée pendant les 4 à 6 premières semaines de vie chez le chat (Hubel and Wiesel, 1970). Ce phénomène de plasticité de dominance oculaire a été observé chez un grand nombre de mammifères dont l'homme. L'amblyopie chez l'enfant, caractérisée par une différence d'acuité visuelle entre les deux yeux, en est un exemple. La diminution d'acuité visuelle de l'œil chez l'enfant, qui peut entraîner des défauts de perception de la profondeur doit être traitée avant l'âge de 8 ans pour pouvoir restaurer une vision normale (Daw, 1998) bien qu'une plasticité résiduelle persiste jusqu'à l'âge de 12 ans environ (Scheiman et al., 2005).

Bien que le cortex visuel des rongeurs, à la différence de celui des chats ou des primates, ne présente pas d'organisation en colonnes de dominance oculaire, l'effet que provoque une déprivation monoculaire pendant la période critique est cependant comparable : après suture transitoire d'un œil, les neurones du

cortex visuel binoculaire de rongeur répondent plus aux stimulus visuels en provenance de l'œil resté ouvert et moins à ceux de l'œil fermé (**Figure 8**). Les études récentes de la plasticité de dominance oculaire privilégient le plus souvent la souris comme modèle, l'utilisation de souris transgéniques permettant d'évaluer l'impact de gènes spécifiques et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués (Gerfen et al., 2013; Taniguchi et al., 2011).

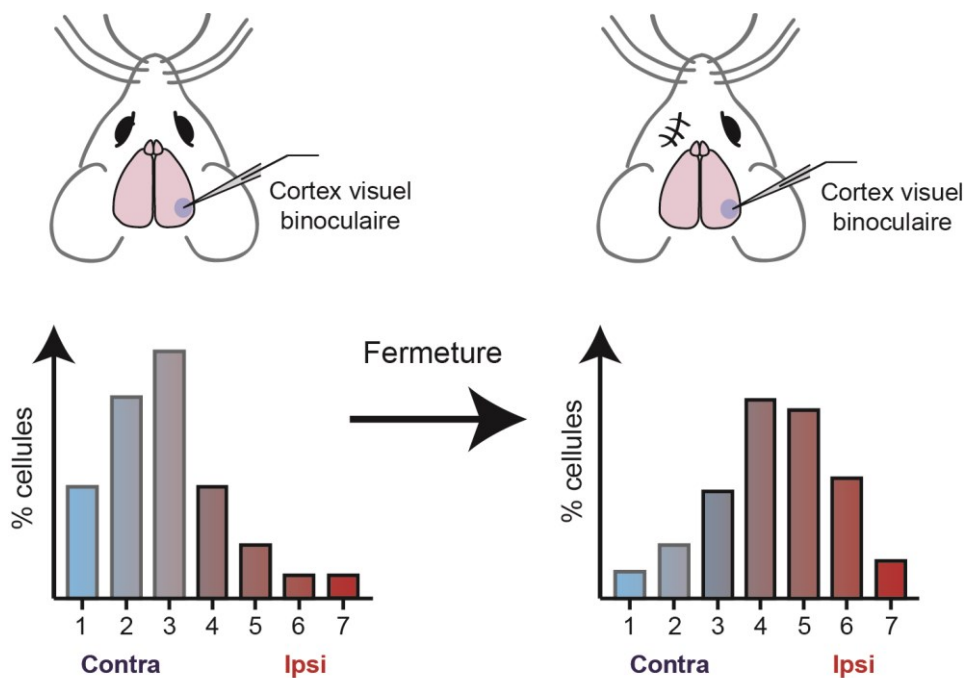


FIGURE 8 : DEPRIVATION MONOCULAIRE AU COURS DE LA PERIODE CRITIQUE DE DOMINANCE OCULAIRE.

La fermeture d'un œil pendant la période critique provoque une diminution de la décharge des cellules pyramidales en réponse à des stimulations lumineuses de l'œil fermé ; à l'inverse une augmentation de la décharge est enregistrée lors de stimulations de l'œil resté ouvert. La dominance oculaire des cellules est évaluée sur une échelle de 1 à 7 ; le déplacement des réponses de l'œil contra (1-3) vers l'œil ipsilatéral (5-7) se produit spécifiquement pendant la période critique (Adapté de Hensch, 2005).

B. Période critique et plasticité

La plasticité observée *in vivo* par enregistrements électrophysiologiques pendant la période critique de dominance oculaire correspond aux changements d'activité des cellules pyramidales dans les couches superficielles du cortex (V1) en réponse à des stimulations visuelles de l'œil ipsilatéral ou de l'œil contralatéral (Gordon and Stryker, 1996; Wiesel and Hubel, 1963). Cependant, de nombreux changements dans l'ensemble des réseaux de neurones participent à l'effet observé dans les cellules pyramidales : des modifications des circuits inhibiteurs, des régulations de l'excitabilité intrinsèque des cellules, et des altérations anatomiques des connexions cortico-corticales (Price et al., 1994) et thalamo-

corticales (Callaway and Katz, 1991; Coleman et al., 2010; Gordon and Stryker, 1996). Ces changements s'accompagnent de bouleversements des règles de plasticité façonnant les réseaux corticaux. Disséquer le fonctionnement de ces réseaux de neurones est donc d'une importance capitale pour élucider le phénomène de période critique.

Les mécanismes de plasticité impliqués après une déprivation monoculaire peuvent être divisés en deux catégories : des phénomènes de plasticité hebbienne et de plasticité homéostatique (Crozier et al., 2007; Desai et al., 2002; Heynen et al., 2003; Maffei and Turrigiano, 2008). Les principes généraux de ces plasticités sont détaillés ci-dessous, et suivis de la description de ceux spécifiques à la période critique du cortex visuel.

Récepteurs des synapses excitatrices du cortex

La transmission glutamatergique dans le cortex est assurée par la présence de deux types de récepteurs ionotropiques aux synapses, les récepteurs à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (AMPA) et les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA).

Récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont présents à la majorité des synapses excitatrices du cortex. Ils sont composés de quatre types de sous-unités (GluA1-4) qui s'assemblent pour former des hétérotétramères. La composition en sous-unités détermine les propriétés du récepteur. En particulier, la présence ou l'absence de la sous-unité GluA2 influence la perméabilité aux ions du canal, ainsi que les règles de plasticité aux synapses. Cette sous-unité est caractérisée par la présence d'une arginine dans le pore du canal, alors que les trois autres sous-unités contiennent au même endroit une glutamine (Wright and Vissel, 2012). L'absence de l'arginine dans le pore du canal AMPA lui confère une perméabilité au calcium ainsi qu'une sensibilité aux polyamines endogènes. Ainsi, pour des potentiels de membrane dépolarisés, les polyamines bloquent le pore des récepteurs qui ne contiennent pas la sous-unité GluA2, entraînant une forte rectification entrante de la courbe courant-voltage. L'étude de la rectification entrante des courants AMPA permet d'évaluer la proportion de récepteurs contenant la sous-unité GluA2 (**Figure 9**) (Bowie and Mayer, 1995). L'importance de la composition en sous-unité des récepteurs AMPA dans les phénomènes de plasticité sera décrite plus loin et étudiée en détail dans mon premier article de thèse.

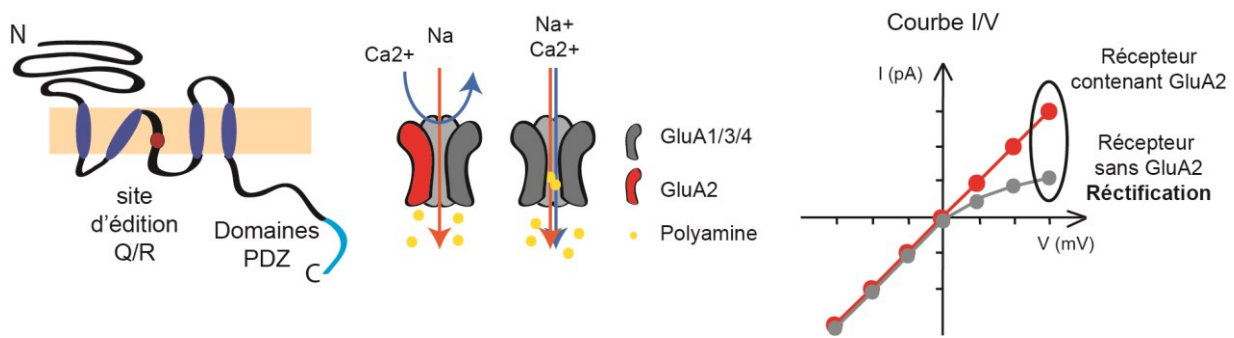


FIGURE 9 : COMPOSITION DES RECEPTEURS AMPA

Dans la sous-unité GluA2, la présence d'un site d'édition Q/R rend les récepteurs AMPA imperméable au calcium et empêche leur blocage par les polyamines endogènes. Les domaines PDZ intracellulaires permettent les interactions avec les protéines d'échafaudages synaptiques. La composition en sous-unité détermine la rectification des courants médiés par les récepteurs AMPA.

Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont également des récepteurs ionotropiques hétérotétramériques. Les récepteurs NMDA sont perméables au calcium, et jouent pour cette raison un rôle majeur dans les phénomènes de plasticité que je décrirai plus loin dans cette introduction. Cependant, deux conditions sont nécessaires pour leurs activations : la liaison d'une molécule de glutamate et éventuellement de D-sérine, ainsi qu'une dépolarisation de la membrane afin de lever le « blocage par les ions Magnésium » présents au potentiel de repos. En effet, à un potentiel hyperpolarisé, les ions Mg^{2+} présents dans le milieu extracellulaire bloquent l'entrée du canal, rendant impossible l'entrée des ions Ca^{2+} . La dépolarisation préalable de la synapse permet le retrait des ions Mg^{2+} et le passage des ions Ca^{2+} . Les récepteurs NMDA sont généralement composés de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 dont il existe quatre sous-types différents (NR2A à D). La composition en sous-unités évolue au cours du développement. Ainsi, au cours des deux premières semaines de développement postnatal chez la souris, la sous-unité NR2B est majoritaire dans le cortex et confère une cinétique lente aux courants NMDA (Vicini et al., 1998). Par la suite NR2B est graduellement remplacé par NR2A. La modification des propriétés fonctionnelles des récepteurs NMDA liée à la composition en sous-unités modifie les règles de plasticité synaptique dépendante de l'activité au cours du développement (Coyle et al., 2003; Erisir and Harris, 2003).

Plasticité hebbienne

Formulée par Donald Hebb en 1949 afin d'expliquer des phénomènes de mémorisation et d'apprentissage, l'hypothèse de plasticité « hebbienne » de la synapse postule qu'une augmentation de l'efficacité synaptique résulte de la stimulation répétée et persistante d'une cellule présynaptique sur une cellule postsynaptique. La majorité des travaux sur l'étude de la plasticité synaptique est fondée sur ce postulat, et a cherché à déterminer les mécanismes moléculaires responsables de cette plasticité.

Les premières preuves expérimentales de cette plasticité ont été apportées par les expériences de Bliss et Lomo, qui ont montré que des stimulations brèves et répétitives des synapses excitatrices dans l'hippocampe provoquaient une augmentation persistante de l'efficacité synaptique (Bliss and Lomo, 1973). Appelée potentialisation à long terme (« *long-term potentiation* » ou LTP), cette forme de plasticité, caractérisée par le renforcement de la force synaptique durable dans le temps, a ensuite été décrite dans un grand nombre de réseaux synaptiques dont le cortex (Artola and Singer, 1987; Bliss and Collingridge, 1993; Zhao et al., 2005). Les protocoles de LTP incluent en général des stimulations à haute fréquence des afférences présynaptiques provoquant entre autres une activation des récepteurs NMDA, ainsi qu'une forte entrée de Ca^{2+} intracellulaire dans l'espace postsynaptique. De nombreux travaux, qui ne seront pas détaillés dans le cadre de cette introduction, ont été consacrés à l'étude des voies de signalisation mises en jeu dans les phénomènes de LTP. Il a été montré notamment que l'expression de la LTP se caractérisait par des modifications postsynaptiques du nombre de récepteurs AMPA, ainsi que leurs phosphorylations (Bredt and Nicoll, 2003; Malinow and Malenka, 2002), des modifications de libération de neurotransmetteurs par les afférences présynaptique (Kullmann and Nicoll, 1992) et également des modifications du nombre de synapses fonctionnelles (Liao et al., 1995; Yuste and Bonhoeffer, 2001). Le maintien à long terme de cette plasticité est assuré par l'activation de gènes et la synthèse de nouvelles protéines (Demmer et al., 1993).

Le phénomène inverse, appelé dépression à long terme (« *long-term depression* » ou LTD) se produit expérimentalement par une perte de l'efficacité synaptique en réponse à des stimulations de basse fréquence (Dudek and Bear, 1993). Également dépendante des récepteurs NMDA, cette plasticité peut être induite en décorrélant l'activation des neurones pré et postsynaptiques. La stimulation répétée à basse fréquence de l'élément présynaptique engendre une faible entrée de Ca^{2+} au niveau postsynaptique, produisant une dé-phosphorylation des récepteurs AMPA et leur internalisation dans des vésicules (Lissin et al., 1998; Morishita et al., 2001). La diminution du nombre de récepteurs AMPA postsynaptiques provoque une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique.

Plasticité homéostatique

Bien que la plasticité hebbienne représente la forme de plasticité la plus étudiée, une autre forme de plasticité synaptique, dite homéostatique, a été caractérisée à la fin du XX^{ème} siècle et va être ici présentée plus en détail car elle est centrale dans l'étude que j'ai menée sur la période critique du cortex visuelle. La plasticité homéostatique consiste en une régulation de l'efficacité globale des synapses d'un neurone afin de maintenir un niveau d'excitabilité proche d'une valeur de référence (Turrigiano, 2012). La première mise en évidence de la plasticité homéostatique a été réalisée sur des cellules en culture provenant de l'hippocampe (Rao and Craig, 1997) et du cortex (Turrigiano et al., 1998), système expérimental dans lequel l'activité des réseaux peut être facilement modulée par l'application de molécules qui bloquent la décharge de potentiels d'action ou l'activité synaptique. Ces études ont montré que diminuer l'activité excitatrice des réseaux par l'application de tétrodothine (TTX) pendant 24h ou 48h provoque une augmentation de l'amplitude des courants postsynaptique excitateurs (« *excitatory post-synaptic currents* » ou EPSCs) dans les cellules pyramidales (Turrigiano et al., 1998). A l'inverse, l'ajout de bloqueurs des récepteurs GABA_A ou une dépolarisation générale des neurones par augmentation des ions potassiques dans le milieu extérieur a pour effet de diminuer l'amplitude des EPSCs enregistrés (Moulder et al., 2006). Ce mécanisme, appelé « *synaptic scaling* », a été par la suite observé *ex vivo* sur des tranches de cortex visuel de rat ayant subi ou non une déprivation visuelle par injection de TTX dans la rétine. L'absence d'entrées sensorielles pendant 48h, ayant pour effet de diminuer l'excitation sur les neurones du cortex de la couche IV, provoque une forte augmentation de l'amplitude des courants excitateurs dans les cellules pyramidales chez les animaux de 16 jours (Desai et al., 2002). Cet effet est réversible car l'augmentation n'est plus observée 48h après l'arrêt d'exposition à la TTX démontrant ainsi l'effet transitoire et adaptatif de la plasticité homéostatique (Desai et al., 2002). L'augmentation de l'amplitude des EPSCs a pu être expliquée par une augmentation du nombre de récepteurs AMPA aux synapses (**Figure 10**) (Barnes et al., 2017; Hobbiss et al., 2018; Turrigiano et al., 1998). La plasticité homéostatique peut également se caractériser par une modulation de la composition en sous-unité des récepteurs AMPA. L'ajout d'APV, antagoniste des récepteurs NMDA diminuant donc l'entrée de Ca²⁺ aux synapses, pendant 1 à 3 heures sur une culture de neurones traités par la TTX, provoque une augmentation de récepteurs AMPA perméables au calcium à la synapse, ce qui a notamment pour corrélat une augmentation de la synthèse de la sous-unité GluA1 sans modification du nombre de sous-unité GluA2 (Sutton et al., 2006). D'autres études réalisées sur des cellules en culture *in vitro* (O'Brien et al., 1998; Wierenga, 2005) et dans des modèles *in vivo* (Wierenga, 2005) ont démontré une régulation des deux sous-unités GluA1 et GluA2 lors de la plasticité homéostatique synaptique (Gainey et al., 2009). Par ailleurs, la présence de microARN qui réduisent l'expression des sous-unités GluA1 (Letellier et al., 2014) ou GluA2 (Hou et al., 2015) dans des cultures de neurones hippocampiques empêche l'établissement de la plasticité synaptique homéostatique en réponse à une exposition à la TTX pour bloquer les potentiels d'action.

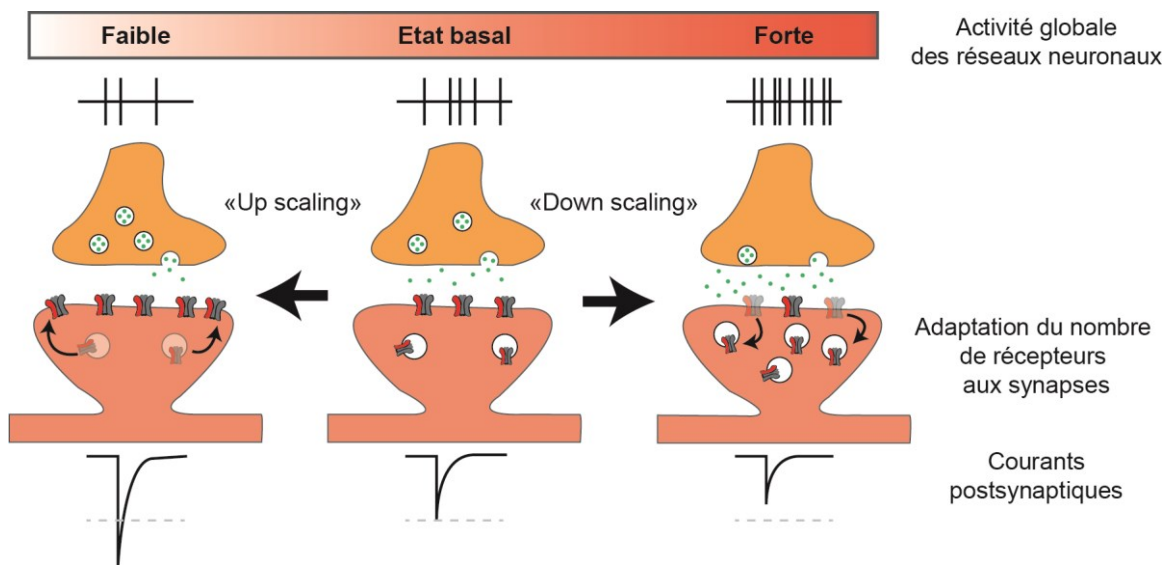


FIGURE 10 : « SYNAPTIC SCALING » AUX SYNAPSES EXCITATRICES

Schéma illustrant le phénomène de « synaptic scaling » : en réponse à une augmentation ou une diminution globale de l'activité des réseaux neuronaux, le nombre de récepteurs AMPA aux synapses est ajusté (Adapté de Fernandes and Carvalho, 2016).

Des études portant sur les mécanismes intervenant dans la plasticité homéostatique ont permis d'identifier des protéines nécessaires et suffisantes pour induire ou bloquer cette plasticité (Chowdhury and Hell, 2018). Si la composition en sous-unité des récepteurs AMPA joue un rôle essentiel dans la plasticité homéostatique, c'est également le cas de protéines d'échafaudages qui permettent leur présence aux synapses telles que PICK1 (Anggono et al., 2011), GRIP1 (Gainey et al., 2015; Tan et al., 2015) et stargazine (Louros et al., 2014). Dans le cadre de mes recherches sur la période critique, nous avons étudié particulièrement l'interaction entre la sous-unité GluA2 et la protéine GRIP1.

Interaction GluA2-GRIP1 dans la plasticité homéostatique

Bien que plusieurs études aient mis en évidence un rôle de GluA1 dans la plasticité synaptique homéostatique (Diering et al., 2014; Goel et al., 2011; Soares et al., 2013), la sous-unité GluA2 joue aussi un rôle central dans cette plasticité par l'intermédiaire de son domaine C-terminal. Ainsi, le knock-down de GluA2 bloque l'accumulation de récepteurs AMPA aux synapses (*synaptic scaling up*) en réponse à la diminution d'activité provoquée par l'inhibition des potentiels d'action (Gainey et al., 2009). Il a été démontré par la suite que l'interaction entre la protéine d'échafaudage Glutamate Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1) à travers son interaction avec la sous-unité GluA2 est essentielle pour la plasticité synaptique homéostatique (Tan et al., 2015).

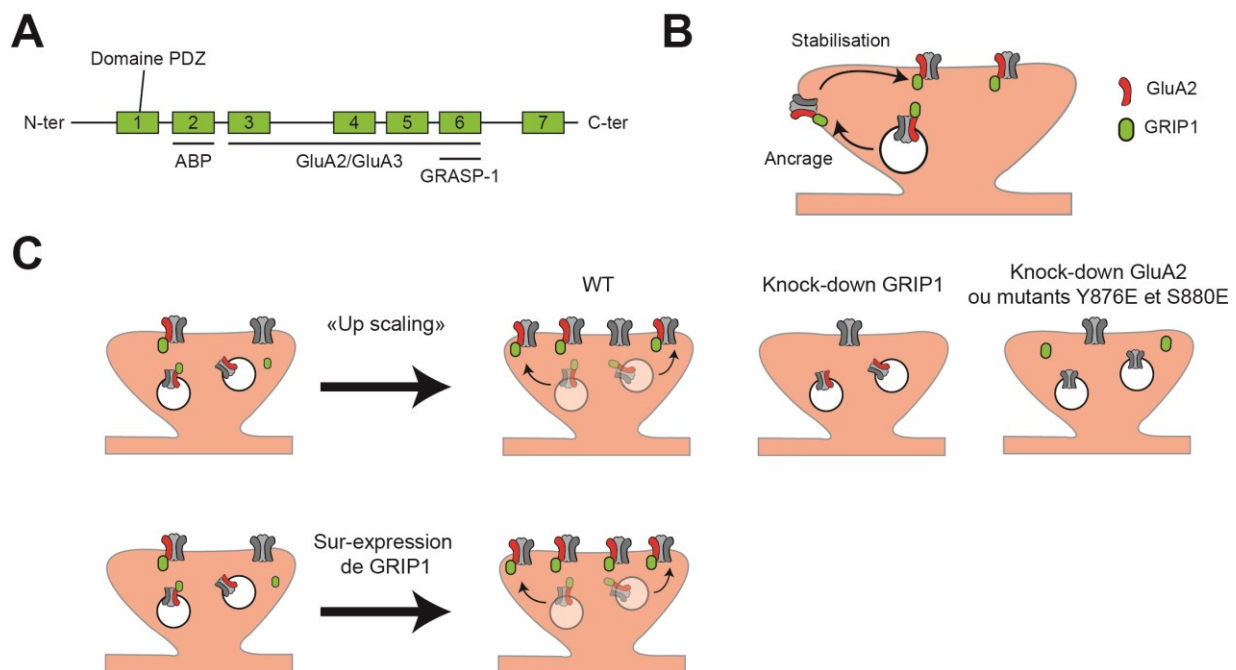


FIGURE 11 : INTERACTION ENTRE GRIP1 ET GLUA2

A) Schéma représentant la structure de la protéine GRIP1 et les domaines d'interactions avec d'autres protéines. **B)** Rôle de GRIP1 dans l'ancrage et la stabilisation à la synapse des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2. **C)** Schéma présentant les conséquences de l'interaction entre GRIP1 et GluA2 sur la plasticité synaptique homéostatique. En haut à gauche : augmentation du nombre de récepteurs AMPA contenant GluA2 à la synapse en réponse à une diminution des entrées glutamatergiques (« up scaling »). A droite : l'upscaling disparaît après knock-down de GRIP1, knock-down de GluA2 ou mutations spécifiques de GluA2. En bas : la surexpression de GRIP1 permet d'augmenter le nombre de récepteurs AMPA dotés de la sous-unité GluA2 par synapse.

La protéine GRIP1 est l'une des principales protéines d'ancrage des sous-unités GluA2 et GluA3 des récepteurs AMPA. Elle est composée de 7 domaines PDZ qui interagissent directement avec le domaine C-terminal de GluA2/GluA3 (Dong et al., 1997, 1999b). Elle est exprimée depuis le stade embryonnaire dans la plupart des régions cérébrales par les cellules excitatrices, mais également dans les interneurons PV (Dong et al., 1999a; Enwright III et al., 2018). Une fonction importante de cette protéine est d'acheminer les récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2 depuis les vésicules présentes sous la synapse jusqu'à la membrane et permettre leur stabilisation (Anggono and Huganir, 2012; Osten et al., 2000). Cette action est possible grâce à l'interaction entre les domaines PDZ 3 à 6 de GRIP1 et le domaine C-terminal de GluA2 (Dong et al., 1997). En effet, il a été montré que l'accumulation synaptique des récepteurs AMPA en réponse à une diminution d'activité (*scaling up*) en condition de knock-down de GluA2 peut être restaurée par des mutants du domaine C-terminal de GluA2 - qui n'interfèrent pas avec

la liaison GRIP1 - mais pas par des mutants (Y876E et S880E) qui réduisent la liaison GluA2-GRIP1. De plus, l'augmentation d'expression de GRIP1 est suffisante pour induire une augmentation de récepteurs AMPA contenant GluA2 à la synapse, tandis que sa suppression empêche toute plasticité homéostatique en culture (Gainey et al., 2015). Ces résultats indiquent que GRIP1 est un médiateur du *synaptic scaling* par le biais d'interactions avec GluA2 (**Figure 11**).

Mécanismes synaptiques impliqués dans la plasticité de dominance oculaire du cortex visuel

La plasticité corticale est fortement dépendante de l'activité. Durant la période critique, un grand nombre de changements synaptiques a été observé en réponse à une déprivation monoculaire. Des mécanismes de plasticité modifient la force des différentes synapses excitatrices et inhibitrices à la fois thalamo-corticales et cortico-corticales (Gordon and Stryker, 1996; Turrigiano, 2012). Par définition, la plasticité de dominance oculaire au cours de la période critique dans V1 est une modification des réponses des neurones pyramidaux en faveur de l'œil resté ouvert à la suite d'une déprivation monoculaire (Gordon and Stryker, 1996). La diminution des réponses corticales provenant de l'œil fermé provoque une LTD, induisant notamment des changements de composition en sous-unités des récepteurs NMDA (Frenkel and Bear, 2004; Heynen et al., 2003).

De plus, des différences entre les afférences thalamo-corticales et cortico-corticales ont été observées. Des méthodes d'optogénétique ont permis de stimuler spécifiquement l'une ou l'autre des afférences et d'étudier leurs modifications en réponse à des déprivations visuelles (Maffei et al., 2006; Miska et al., 2018). Ainsi, une déprivation monoculaire pendant la période critique engendre une diminution de la force des entrées thalamiques plus fortement sur les interneurons PV que sur les cellules pyramidales de la couche IV. Au contraire, l'activation optogénétique des afférences cortico-corticales en réponse à une déprivation monoculaire pousse la balance excitation/inhibition vers l'inhibition (Maffei et al., 2006; Miska et al., 2018). Des modifications de l'excitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux de la couche II/III ont aussi été observées à la suite d'une déprivation monoculaire pendant la période critique, illustrant un autre phénomène de plasticité homéostatique (Lambo and Turrigiano, 2013). Si les cellules pyramidales du cortex visuel sont fortement impactées par la déprivation sensorielle, les interneurons GABAergiques semblent cependant orchestrer la plasticité des réseaux pendant la période critique.

3. Rôle de l'inhibition dans la période critique

A. Modulation de l'inhibition

Des études sur la modulation de l'inhibition ont mis en évidence que l'initiation de la période critique est corrélée à la maturation de l'inhibition dans le cortex (Hensch, 2005). Des manipulations pharmacologiques ou génétiques de la transmission GABAergique peuvent influencer drastiquement la plasticité de dominance oculaire (**Figure 12**).

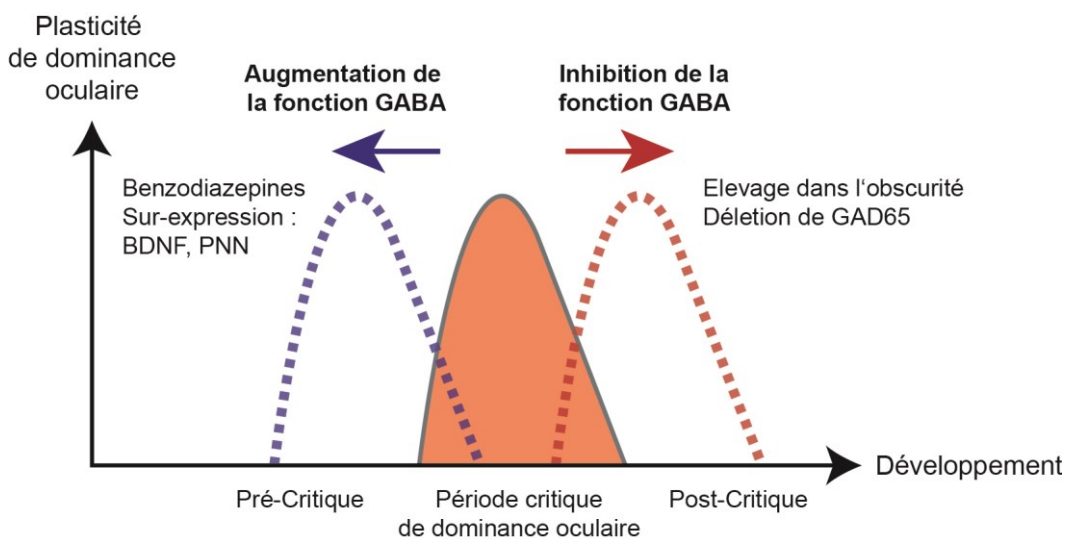


FIGURE 12 : IMPLICATION DE L'INHIBITION DANS L'OUVERTURE ET LA FERMETURE DE LA PERIODE CRITIQUE DU CORTEX VISUEL

Schéma illustrant les modulations génétiques et pharmacologiques de l'inhibition provoquant des déplacements temporels de la plasticité de dominance oculaire (Adapté de Hensch, 2005).

Par exemple, favoriser la maturation des synapses inhibitrices en surexprimant le BDNF est suffisant pour avancer le début de la période critique de dominance oculaire chez la souris (Hanover et al., 1999; Huang et al., 1999). La diminution de l'expression de BDNF - normalement synthétisée par les cellules pyramidales du cortex visuel en réponse aux stimulations lumineuses - induite par l'élevage des rongeurs dans le noir provoque à l'inverse un retard d'ouverture de la période critique (Capsoni et al., 1999; Lein and Shatz, 2000). D'autres expériences montrant l'importance de l'inhibition ont été menées sur des souris knock-out pour le gène *Gad2*, qui code pour GAD65, une enzyme convertissant le glutamate en GABA dans les interneurons GABAergiques. La délétion de *Gad2* empêche la survenue de la période critique de dominance oculaire après déprivation visuelle. L'administration de benzodiazépines, modulateurs allostériques du récepteur GABA_A, permet de restaurer cette période critique (Hensch,

1998; Fagiolini and Hensch, 2000; Iwai et al., 2003). Enfin l'exposition chronique aux benzodiazépines tôt au cours du développement chez des souris sauvages est suffisante pour induire une période critique précoce (Iwai et al., 2003).

B. Rôle clé des interneurons PV

Les expériences décrites ci-dessus ont démontré le rôle crucial de la modulation de l'inhibition globale dans le cortex visuel sur la période critique. Par la suite, l'utilisation de souris mutantes a permis de mettre en évidence l'implication plus spécifique des interneurons PV dans la plasticité de dominance oculaire. Tout d'abord, les souris exprimant un récepteur mutant $\alpha 1$ des récepteurs GABA_A - rendu insensible aux benzodiazépines - ne présentent pas de période critique de dominance oculaire précoce en réponse à un traitement aux benzodiazépines (Fagiolini, 2004). Cette sous-unité est majoritairement présente dans les récepteurs GABA_A présents au niveau des synapses formées par les interneurons PV de type « cellules en panier » sur le corps cellulaire des cellules pyramidales (Klausberger et al., 2002). Ces expériences ont été les premières à mettre en lumière le rôle prépondérant des neurones PV de type « cellules en panier » dans la période critique du cortex visuel.

Un autre marqueur important de la maturation des interneurons PV est l'expression du facteur de transcription OTX2. Il s'agit d'une homéoprotéine synthétisée par le plexus brachial, libérée dans le liquide céphalorachidien, puis internalisée par les interneurons PV au cours de leur développement (Spatazza et al., 2013). Le niveau d'accumulation d'OTX2 dans les interneurons PV au niveau de leur matrice extracellulaire, appelée PNN (« *Peri-neural net* »), semble être lié à l'initiation de la période critique. En effet, l'infusion d'OTX2 dans le cortex de souris accélère l'arrivée de la période critique (Sugiyama et al., 2008). A l'inverse, le blocage de son expression en utilisant l'injection de la Cre recombinase dans des souris *Otx2^{flex/flex}* à l'âge adulte permet de restaurer une plasticité de dominance oculaire comparable à celle observée pendant la période critique en réponse à quatre jours de déprivation monoculaire (Spatazza et al., 2013).

L'ensemble de ces travaux montre l'importance de la maturation des interneurons PV, ainsi que le rôle de leurs projections GABAergiques sur les cellules pyramidales. Cependant, d'autres résultats indiquent que le processus de maturation des afférences GABAergiques vers les cellules pyramidales n'est pas corrélé avec la fin de la plasticité de dominance oculaire (Huang et al., 2010; Gu et al., 2013). Ainsi, la maturation des afférences GABAergiques qui projettent vers les cellules pyramidales ne peut à elle seule expliquer l'existence de la période critique (Huang et al., 2010).

C. *Implication des afférences excitatrices sur les interneurons PV*

Une étude réalisée par l'équipe de Josh Trachtenberg à UCLA a mis en évidence des modifications au niveau des afférences excitatrices des interneurons PV pendant la période critique (Kuhlman et al., 2013). Ces travaux ont montré, en utilisant l'imagerie bi-photonique *in vivo*, qu'une brève déprivation monoculaire pendant la période critique induit une diminution des réponses neuronales à une stimulation visuelle dans les interneurons PV de la couche II/III. Cette diminution des réponses neuronales PV, qui est restreinte à la période critique, entraîne une réduction du taux de décharge des neurones PV. Une hypothèse proposée est que cette diminution d'activité désinhibe les cellules pyramidales adjacentes. Ce mécanisme de plasticité homéostatique permet aux neurones pyramidaux d'augmenter leur fréquence de décharge en réponse à la diminution globale des entrées excitatrices après fermeture d'un œil (Kuhlman et al., 2013).

Une autre étude a montré que des souris génétiquement modifiées présentant une réduction du nombre d'afférences glutamatergiques sur les interneurons PV n'expriment pas de plasticité de dominance oculaire (Gu et al., 2013). Dans cette étude, la suppression de NARP, qui est une protéine se liant aux récepteurs AMPA très enrichie au niveau des synapses excitatrices sur les interneurons PV, abolit la plasticité de dominance oculaire. De façon intéressante, l'administration de benzodiazépines restaure cette plasticité aussi bien chez la souris juvénile qu'adulte, ce qui indique que l'effet de NARP sur la plasticité de dominance oculaire se produit, en aval, par l'intermédiaire du contrôle de la transmission GABAergique. Enfin, il a été montré que la déprivation monoculaire se produisant pendant la période critique entraîne une diminution de la voie NRG1/ErbB4 spécifiquement dans les interneurons PV, ainsi qu'une rétraction des afférences excitatrices sur ces interneurons (Sun et al., 2016). L'inhibition de cette voie spécifiquement dans les interneurons PV dans les souris ErbB4 KO permet l'apparition de plasticité de dominance oculaire adulte. A l'inverse, l'injection chronique de NRG1 permet de restaurer cette plasticité dans les souris NARP^{-/-} ainsi que chez des souris élevées dans le noir (Gu et al., 2016).

Enfin, les afférences excitatrices provenant du thalamus sur les interneurons PV ont également été impliquées dans la fermeture de la période critique. Les afférences thalamiques activent fortement les interneurons PV (Ji et al., 2016; Kloc and Maffei, 2014) et le développement de ces afférences est dépendant de la présence de la protéine SynCAM-1 (Ribic et al., 2019). SynCAM-1 est une immunoglobuline impliquée dans l'assemblage et le maintien des synapses à la fois dans les neurones pyramidaux et les interneurons PV (Földy et al., 2016) et son expression dans le cortex visuel est régulée par l'activité. Une déprivation monoculaire provoque une augmentation de son expression dans le cortex binoculaire contralatéral. La suppression de SynCAM-1 spécifiquement dans les interneurons PV permet à la plasticité de dominance oculaire de se poursuivre chez la souris adulte (Ribic et al., 2019).

L'ensemble de ces résultats suggère que la capacité du réseau à recruter les interneurons PV par l'intermédiaire de leurs afférences glutamatergiques joue un rôle central dans les mécanismes de

plasticité au cours de la période critique. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents sont encore peu connus. C'est pourquoi j'ai axé une de mes études sur le développement des afférences excitatrices sur les interneurons PV dans le cortex visuel, et notamment sur la composition en sous-unité des récepteurs AMPA, dans la plasticité en réponse à une déprivation visuelle.

4. Plasticité chez l'adulte et réouverture de période critique

Bien que la plasticité soit accrue pendant la période critique, les réseaux ne sont pas figés une fois cette période terminée : une plasticité de dominance oculaire modérée persiste. Cependant, les mécanismes de plasticité diffèrent de ceux qui sont à l'œuvre pendant la période critique.

A. Caractéristiques de la plasticité dans le cortex visuel adulte

Une plasticité de dominance oculaire peut être induite chez le chat et la souris adulte, cependant la durée de déprivation nécessaire pour obtenir une modification significative de la dominance oculaire est augmentée par rapport à la durée nécessaire chez l'animal jeune (Blakemore et al., 1978; Lehmann and Löwel, 2008; Pham, 2004). De plus, l'amplitude de la modification de la dominance oculaire est moins importante chez l'adulte que chez le jeune (Pham, 2004; Sato and Stryker, 2008). La plasticité induite pendant la période critique produit des changements drastiques d'innervation thalamique dans le cortex. Chez le chat par exemple, la fermeture d'un œil pendant la période critique provoque la rétractation des afférences thalamo-corticales de cet œil et une expansion des afférences de l'œil resté ouvert (Antonini et al., 1999; Shatz and Stryker, 1978) ce qui n'est pas le cas chez l'adulte. Il a été montré que la déprivation visuelle engendrait une diminution d'épines dendritiques de la dendrite apicale des cellules pyramidales de la couche II/III durant la période critique, ce qui n'est pas le cas chez la souris adulte (Mataga et al., 2004).

Ces résultats indiquent donc que la plasticité dans le cortex visuel primaire peut encore être induite à l'âge adulte bien que de manière moins efficace. Il est cependant possible de moduler les circuits génétiquement et pharmacologiquement afin d'induire de nouvelles périodes de plasticité comparable à celles retrouvées durant la période critique.

B. Réouverture de périodes critiques chez l'adulte

Premièrement, restaurer un réseau inhibiteur à un stade plus immature permet d'étendre la période critique existante, voire de provoquer l'ouverture d'une nouvelle période critique. Ainsi, l'infusion de chondroitinase ABC dans le cortex visuel adulte, ayant pour effet de dégrader les filets périneuronaux (PNN) qui sont des éléments de la matrice extracellulaire retrouvés autour des interneurons PV, permet

de restaurer la plasticité de dominance oculaire (Pizzorusso, 2002). L'administration de chondroitinase ABC a aussi pour effet de permettre la diminution des entrées synaptiques excitatrices vers les neurones PV en réponse à une déprivation monoculaire (Faini et al., 2018), ce qui constitue une indication supplémentaire que les voies excitatrices vers les neurones PV pourraient jouer un rôle clé dans la survenue de la période critique.

La greffe d'interneurones au stade de développement embryonnaire dans le cerveau de souris juvéniles permet aussi la réouverture d'une période critique de dominance oculaire après la fermeture de la période critique « physiologique ». Ces résultats ont été obtenus en implantant des cellules embryonnaires provenant de l'éminence ganglionnaire médiane d'une souris donneuse au stade E12.5 dans le cortex visuel de souris au stade de développement P10. Les cellules implantées sont majoritairement des interneurones PV et SST, qui s'insèrent dans les réseaux déjà existants et forment des synapses inhibitrices sur les cellules pyramidales avoisinantes (Southwell et al., 2010; Tang et al., 2014). La présence de ces cellules ouvre une nouvelle fenêtre de plasticité, arrivant après celle de la souris hôte, et qui survient au stade de développement des interneurones greffés qu'ils auraient eu au moment de la période critique de la souris donneuse. Cette nouvelle période de plasticité chez l'adulte a les mêmes propriétés que celle se produisant durant la période critique, démontrant l'importance de la maturation des interneurones dans l'établissement de la période critique (Davis et al., 2015). De surcroît, une greffe d'interneurones embryonnaires dans le cerveau adulte d'une souris ayant subi une déprivation monoculaire durant la période critique permet d'ouvrir une nouvelle fenêtre de plasticité, capable de restaurer l'amblyopie provoquée lors de la privation visuelle juvénile (Davis et al., 2015). Ces résultats mettent en lumière l'existence de facteurs génétiques intrinsèques, indépendant de l'environnement cellulaire, qui gouvernent à la fois le développement des interneurones provenant de l'éminence ganglionnaire médiane et la période critique de dominance oculaire.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il est primordial d'identifier les modifications moléculaires et cellulaires impliquant les interneurones PV au cours du développement, en particulier au niveau de leurs afférences excitatrices, afin d'élucider les différentes transitions d'ouverture et de fermeture de la période critique.

III. LA PERIODE DU RAFFINEMENT SYNAPTIQUE : UNE PERIODE CRITIQUE DE DEVELOPPEMENT DONT LES ALTERATIONS SONT ASSOCIEES A LA SCHIZOPHRENIE

La mise en place de réseaux neuronaux matures et fonctionnels résulte d'une succession de processus développementaux complexes incluant la genèse neuronale, la synaptogenèse, et l'élagage synaptique, c'est-à-dire la perte des synapses surnuméraires au cours du développement postnatal. L'élagage synaptique se produit à un stade de développement relativement tardif, alors que les neurones ont terminé leur migration et sont déjà intégrés dans des réseaux fonctionnels. De ce fait, l'activité neuronale induite par des stimuli environnementaux est en mesure d'influencer considérablement le raffinement des connexions neuronales au cours de l'enfance et de l'adolescence. La période de raffinement de la connectivité synaptique n'implique cependant pas simplement une perte de synapses, en particulier dans le cortex où la formation et l'élimination des épines dendritiques dans les couches superficielles ont pu être étudiées de manière dynamique par imagerie bi-photonique *in vivo* : elle se caractérise par une synaptogenèse importante doublée d'une élimination synaptique accrue, c'est-à-dire d'un turnover important des synapses glutamatergiques (Holtmaat et al., 2005). Il s'agit ainsi d'une période pendant laquelle le foisonnement des synapses peut permettre un remodelage important des réseaux par stabilisation sélective des synapses les plus actives, l'élimination prenant progressivement le pas sur la formation des synapses. La période de raffinement synaptique est donc une période critique, bien que beaucoup plus longue que celles classiquement décrites dans les cortex sensoriels chez les mammifères, puisqu'elle se poursuit tout au long du développement postnatal. Des différences de temporalité existent cependant entre les différentes aires cérébrales dans lesquelles le raffinement synaptique a été étudié ; par exemple, le pic de la période critique de raffinement synaptique dans le thalamus visuel se situe à la fin de la première semaine de vie postnatale chez la souris, alors que le pic du « turn-over synaptique » observé dans le néocortex a lieu vers le début de la troisième semaine de vie postnatale (Holtmaat et al., 2005).

Le rôle des cellules gliales, et en particulier de la microglie, dans la synaptogenèse et l'élagage synaptique a été très étudié au cours des quinze dernières années. L'une des découvertes majeures dans ce domaine a été le lien entre le système du complément, dont la fonction est bien établie dans l'immunité innée, et le raffinement des connexions synaptiques dépendant des microglies au cours du développement postnatal. Des perturbations génétiques ou environnementales peuvent affecter ces processus et de ce fait altérer la connectivité des réseaux neuronaux, favorisant la susceptibilité à certaines pathologies neuro-développementales comme la schizophrénie.

Une première partie de ce chapitre décrira tout d'abord brièvement les caractéristiques, l'origine et les fonctions des cellules microgliales et abordera leur rôle clé dans les phénomènes de synaptogenèse et d'élagage synaptique. Après un exposé des cascades du complément, je détaillerai les rôles connus du complément dans le processus de d'élagage synaptique dans les interactions microglies-neurones. La troisième partie du chapitre sera consacrée à la schizophrénie, et se focalisera plus particulièrement sur les liens entre dysfonctions du complément et de l'élagage synaptique dans cette pathologie.

1. Les microglies : alliées indispensables à la formation et au maintien des réseaux neuronaux

Les microglies sont les macrophages résidents du système nerveux central (SNC), et font partie des cellules gliales du SNC. En tant que cellules immunitaires, leur rôle principal est d'assurer la défense immunitaire et le maintien de l'homéostasie du SNC. Ces cellules sont présentes dans l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière, ce qui permet leur intervention rapide en cas d'invasion d'un pathogène ou de lésion tissulaire (Donat et al., 2017; Thameem Dheen et al., 2007).

A. Origine et développement

Contrairement aux neurones corticaux ayant pour origine les régions ventriculaire et sous-ventriculaire, les cellules microgliales sont issues de cellules progénitrices hématopoïétiques provenant du sac vitellin qui circulent ensuite grâce au flux sanguin avant de coloniser le SNC au cours du développement embryonnaire (Ginhoux et al., 2010). Les macrophages primitifs qui donneront plus tard les cellules microgliales sont observés dès le stade embryonnaire E8.5 chez la souris (Alliot et al., 1999). L'entrée dans le parenchyme cérébral se fait par plusieurs voies : une première au niveau des méninges par traversée de la surface piaie, une autre au niveau des ventricules par passage entre les cellules neuro-épithéliales, et une dernière au niveau du plexus choroïde (Arnò et al., 2014; Lelli et al., 2013; Monier et al., 2007). Cette dispersion est facilitée par la barrière hémato-encéphalique encore immature à ce stade de développement. Par la suite, les précurseurs prolifèrent et génèrent des cellules microgliales, encore immatures, qui migrent selon un profil spatio-temporel précis (Monier et al., 2007; Verney et al., 2010). Chez la souris, les premières cellules microgliales peuvent être observées dans le cortex dès le stade E10.5 (Swinnen et al., 2013). Lors d'une première phase de migration tangentielle, les microglies forment une couche uniforme le long de la surface piaie, puis colonisent l'ensemble des couches corticales en formation au cours d'une deuxième phase de migration cette fois perpendiculaire à la surface (Monier et al., 2007; Mosser et al., 2017). Cette migration semble être facilitée par des molécules de guidage telle que les sémaphorines et nitrines (Spassky et al., 2002), ainsi que par des chimiokines (Arnò et al., 2014; Rezaie et al., 2002). La prolifération des microglies se poursuit après la naissance pendant les deux premières semaines de vie chez le rongeur avant de décroître de près de 50% jusqu'à la

6^{ème} semaine. Par la suite, le nombre de microglie reste relativement constant tout au long de la vie (Alliot et al., 1999; Nikodemova et al., 2015).

Au premier stade de développement, les microglies sont immatures et présentent une forme ronde avec peu ou pas de prolongement. Cette forme, appelée amiboïde, est caractérisée par une forte capacité de migration. Une fois bien positionnées dans les différents tissus neuronaux, les microglies commencent à se différencier en cellules ramifiées. Bien que les mécanismes permettant cette transition ne soient pas encore très bien connus, des études en culture ont montré l'importance des cellules astrocytaires pour cette maturation (Sievers et al., 1994), ou du moins des facteurs qu'elles libèrent telles que les purines et certaines cytokines (Schilling et al., 2001; Wollmer et al., 2001). Le passage au stade ramifié de la microglie la rend capable de *scruter* le milieu avoisinant afin de détecter rapidement la présence d'agents infectieux et de facteurs d'inflammation tout en veillant au maintien de l'homéostasie locale (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn, 2005). Historiquement, cette morphologie ramifiée a longtemps été perçue comme étant corrélée à un stade de quiescence des microglies. Cependant, le développement et l'utilisation de la microscopie bi-photonique *in vivo* de souris exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur spécifique des microglies a pu mettre en évidence le mouvement rapide et continu des prolongements microgliaux sans déplacement du corps cellulaire (Nimmerjahn, 2005). Cet état de surveillance en condition physiologique peut être modifié rapidement en réponse à la détection d'une intrusion pathogène, d'un dérèglement des concentrations ioniques, ou de signaux inflammatoires. La microglie s'active alors et change de morphologie en rétractant ses prolongements au niveau du corps cellulaire, ce qui induit une augmentation de volume de ce dernier. Cette activation est également caractérisée par la modification d'expression de protéines et la libération de facteurs pro et anti-inflammatoires (Hanisch, 2002; Wyss-Coray et al., 2001).

B. Rôle de la microglie dans le SNC adulte

En tant que cellules médiatrices des réponses immuno-inflammatoires du SNC, les cellules microgliales ont été étudiées de manière approfondie en conditions pathologiques (Donat et al., 2017). En effet, la fonction microgliale dans la réponse à l'inflammation locale ou en présence de pathogènes est aujourd'hui bien connue (Thameem Dheen et al., 2007). Cependant, des études récentes ont démontré que les cellules microgliales jouent un rôle important dans le cerveau en l'absence d'état pathologique. Les microglies étant des macrophages, leur fonction principale réside dans leur capacité à phagocyter les débris cellulaires, ainsi que les cellules apoptotiques afin d'éviter le relargage dans le milieu extracellulaire de molécules toxiques et pro-inflammatoires (Hanisch and Kettenmann, 2007; Magnus et al., 2001; Streit et al., 2005). Cette action permet d'assurer un maintien de l'homéostasie dans les tissus cérébraux (Chan et al. 2006). De plus, la microglie est impliquée dans la modulation de l'activité neuronale. La présence de prolongements microgliaux au niveau des synapses a été montrée en culture

et chez l'animal à l'aide de la microscopie bi-photonique et électronique (Tremblay et al., 2010), laissant présager un rôle dans la communication synaptique. Les cellules microgliales expriment un grand nombre de récepteurs aux neurotransmetteurs à leur membrane et peuvent libérer des molécules telles que des cytokines, des neurotransmetteurs, ainsi que des protéines de matrice extracellulaire (Béchade et al., 2013). La présence de ces microglies aux synapses influence également la plasticité à long terme. Il a été montré en culture de neurones qu'une exposition à un milieu conditionné par les cellules microgliales augmente l'amplitude des courants médiés par les récepteurs NMDA en comparaison à un milieu n'ayant pas été exposé aux microglies (Hayashi et al., 2006; Moriguchi et al., 2003). *In vivo*, la déplétion des microglies à l'âge adulte provoque des défauts d'apprentissage moteurs, ainsi que des diminutions de la fréquence des EPSCs médiés par les récepteurs AMPA et NMDA dans les neurones du cortex moteur, suggérant une diminution du relargage de glutamate (Parkhurst et al., 2013). De plus, l'apprentissage moteur dépend de la formation de nouvelles synapses qui est également régulée par la présence des microglies. Cette fonction de contrôle du nombre de synapses a été très largement étudiée, et notamment au cours du développement postnatal dans différentes régions telles que l'hippocampe, le système rétinogéniculé et le cortex. Les mécanismes ainsi que les voies impliquées seront décrits plus en détail dans la suite de cette introduction. Enfin, les microglies sont également impliquées dans la neurogenèse adulte. Dans le cerveau adulte, deux zones de neurogenèse locale ont été identifiées : la zone sous-granulaire et le gyrus dentelé. Seule une fraction des neurones produits par les cellules progénitrices de ces zones germinales survivent et s'intègrent dans les réseaux déjà établis. Des travaux suggèrent que la régulation de l'équilibre entre survie et élimination neuronale pourrait être assurée par les cellules microgliales. En effet, la présence de cellules microgliales ramifiées phagocytant les cellules apoptotiques dans le gyrus dentelé a été observée en conditions physiologiques, en l'absence des caractéristiques d'activation microgliale associées aux conditions pathologiques (Sierra et al. 2010). Des études en culture suggèrent que la migration et la différenciation des neurones nouvellement formés seraient régulées par la sécrétion de certains facteurs, encore non identifiés, par la microglie (Aarum et al., 2003).

Ces différentes fonctions, présentées ici de manière non exhaustive, illustrent le rôle majeur des microglies dans le cerveau adulte (**Figure 13**). Je détaillerai dans les paragraphes suivants les rôles connus de la microglie dans le développement cérébral.

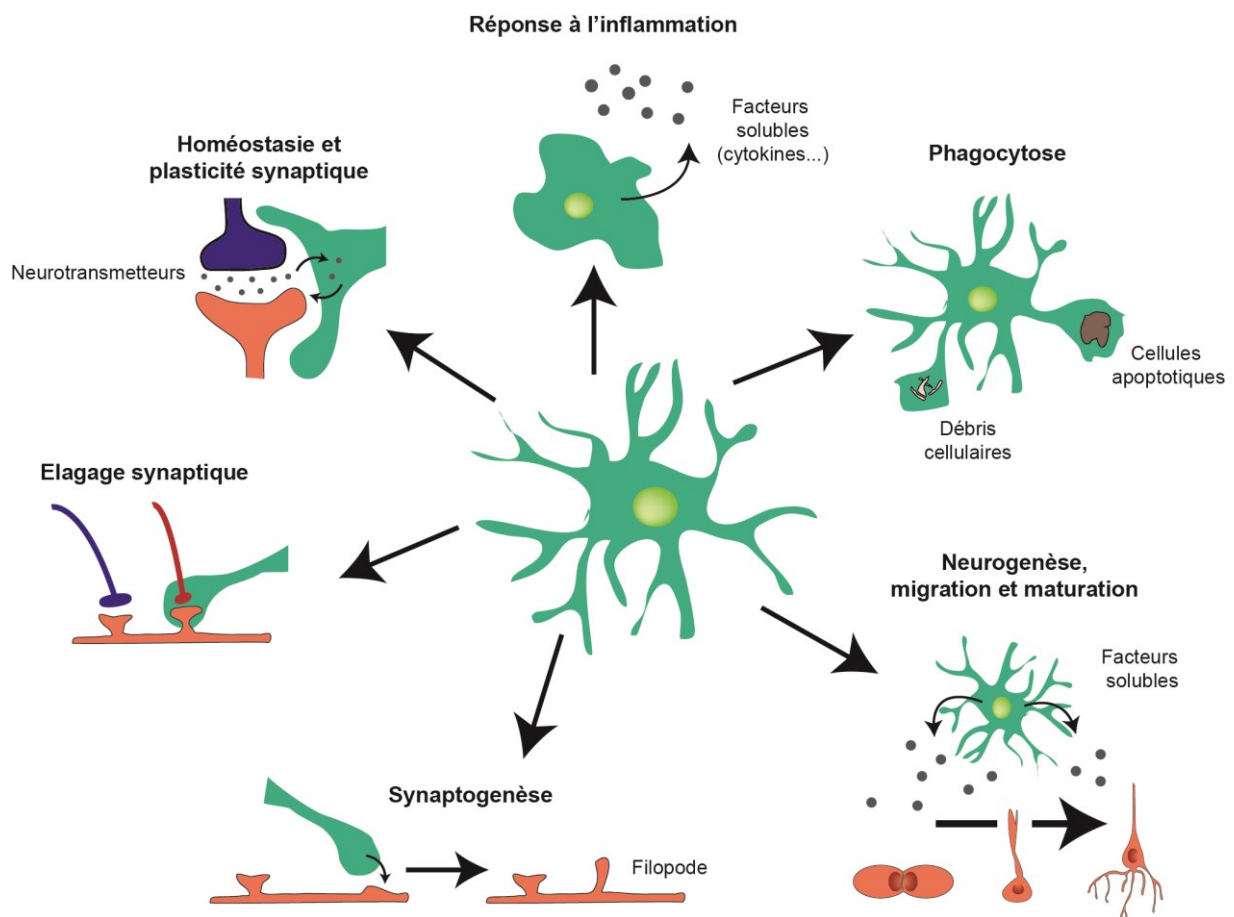


FIGURE 13 : FONCTIONS DE LA MICROGLIE DANS LE SNC

Schéma représentant les différentes fonctions des microglies dans le cerveau en condition physiologique (Adapté Sierra et al., 2019)

C. Rôle de la microglie au cours du développement

Prolifération cellulaire et maturation

Le rôle de la microglie dans la prolifération et la maturation des cellules souches neurales a été mis en évidence sur des cultures de neurones corticaux où la suppression du facteur de transcription PU.1, un facteur de transcription exprimé par les macrophages dont les microglies (Walton et al. 2000), entraîne une diminution de la prolifération cellulaire (Antony et al. 2011). L'ajout de microglies exprimant PU.1 restaure un niveau de prolifération comparable au niveau observé sur des cellules sauvages, démontrant ainsi le rôle de ces cellules dans la neurogenèse *in vitro*. Cependant, la microglie plus tôt au cours du développement semble avoir un effet opposé et être impliquée dans la diminution du nombre de neurones au cours du développement embryonnaire. Des études réalisées sur des cultures de neurones provenant de rétines et de cervelets ont montré que la microglie était impliquée dans la phagocytose postnatale précoce de neurones (Bessis et al., 2007). Une autre étude a montré que la suppression des microglies

par l'utilisation de chlodronate encapsulé dans des lysosomes sur des tranches organotypiques de cortex de rat au stade E16 provoque une augmentation du nombre de précurseurs neuraux identifiés par des immunomarquages Pax6 et Tbr2. Ce résultat est corroboré par l'observation *in vivo* d'une augmentation de précurseurs neuraux après blocage de l'activité microgliale par l'injection *in utero* de doxycycline ou de minocycline chez le rat aux stades E15 et E16. Ces résultats suggèrent que la microglie, à travers son activité phagocytaire, contrôle l'équilibre entre formation et mort neuronale au cours du développement (Cunningham et al., 2013).

Synaptogenèse

L'implication de la microglie sur la synaptogenèse au cours du développement a été démontré dans plusieurs régions cérébrales distinctes (Milinkeviciute et al., 2019; Miyamoto et al., 2016; Weinhard et al., 2018). Dans les couches II/III du cortex somatosensoriel par exemple, une période de forte formation de filopodes est observée entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour postnatal. L'utilisation de la microscopie bi-photonique *in vivo* et de microglies exprimant des protéines rapporteuses fluorescentes a montré que cette formation était initiée par le contact entre les microglies et les dendrites des neurones pyramidaux (Miyamoto et al., 2016). L'inactivation des cellules microgliales entre P5 et P8 engendre une diminution de formation de ces filopodes, suggérant l'importance de l'activation microgliale dans la formation des synapses. De plus, la suppression génétique des microglies spécifiquement à ce stade de développement provoque une diminution de la densité d'épines dendritiques des cellules des couches II/III, ainsi que des synapses moins matures (Miyamoto et al., 2016). Une autre étude s'est intéressée au développement des connexions entre le thalamus et le cortex en tonneau qui se forment à partir du 5^{ème} jour de développement postnatal. Les auteurs ont montré que la voie de signalisation de la fractalkine, dont les récepteurs Cx3CR1 sont exprimés uniquement par les microglies dans le cerveau, est nécessaire pour le bon développement de ces connexions. En effet, le blocage de la voie fractalkine/Cx3CR1 par ablation génétique du récepteur dans les microglies retarde la mise en place et la maturation des synapses glutamatergiques (Hoshiko et al., 2012). Enfin, l'étude de la dynamique des contacts entre microglie et épines dendritiques dans des tranches organotypiques d'hippocampe suggère que cette interaction favorise la formation de filopodes à partir de la tête des épines dendritiques (Weinhard et al., 2018).

Élagage synaptique

Les microglies ont également été impliquées dans le processus d'élagage synaptique. Un modèle expérimental propice pour étudier ce phénomène est le système rétinotopique dans le corps géniculé dorso-latéral (dLGN) (Chen and Regehr, 2000; Jaubert-Miazza et al., 2005). Chez la souris adulte, les neurones ganglionnaires de la rétine projettent leur axone dans des territoires bien précis du dLGN, sans chevauchement entre les axones provenant de chaque œil. Cependant, au cours du développement

postnatal précoce, les axones des deux yeux projettent initialement dans des zones chevauchantes. Un important raffinement synaptique se produit chez le souriceau avec un pic environ 5 jours après la naissance, ayant pour effet de supprimer les synapses formées par les projections de l'œil contralatéral dans la zone centrale du dLGN. L'injection dans la rétine de traceurs antérogrades comme la sous-unité β de la toxine du choléra (CTB), couplée à des fluorophores différents pour chaque œil, permet de suivre les projections rétiniennes dans le dLGN. Des reconstructions de microglies à partir d'images confocales en trois dimensions suggèrent que la phagocytose d'éléments présynaptiques par les microglies contribue à cet élagage synaptique (Schafer et al., 2012). En effet, la présence d'inclusion de CTB marquée par fluorescence a été observée au sein des microglies au pic de l'élagage synaptique dans le dLGN. Cet élagage synaptique est dépendant de l'interaction entre le récepteur C3R du système du complément, uniquement exprimé par les microglies dans le cerveau, et d'autres molécules du complément dont le rôle sera détaillé plus loin dans l'introduction. Ainsi, l'ablation génétique de CR3 ou de son ligand C3 est suffisante pour provoquer un défaut de ségrégation des axones rétiniens dans le dLGN (**Figure 14**) (Schafer et al., 2012).

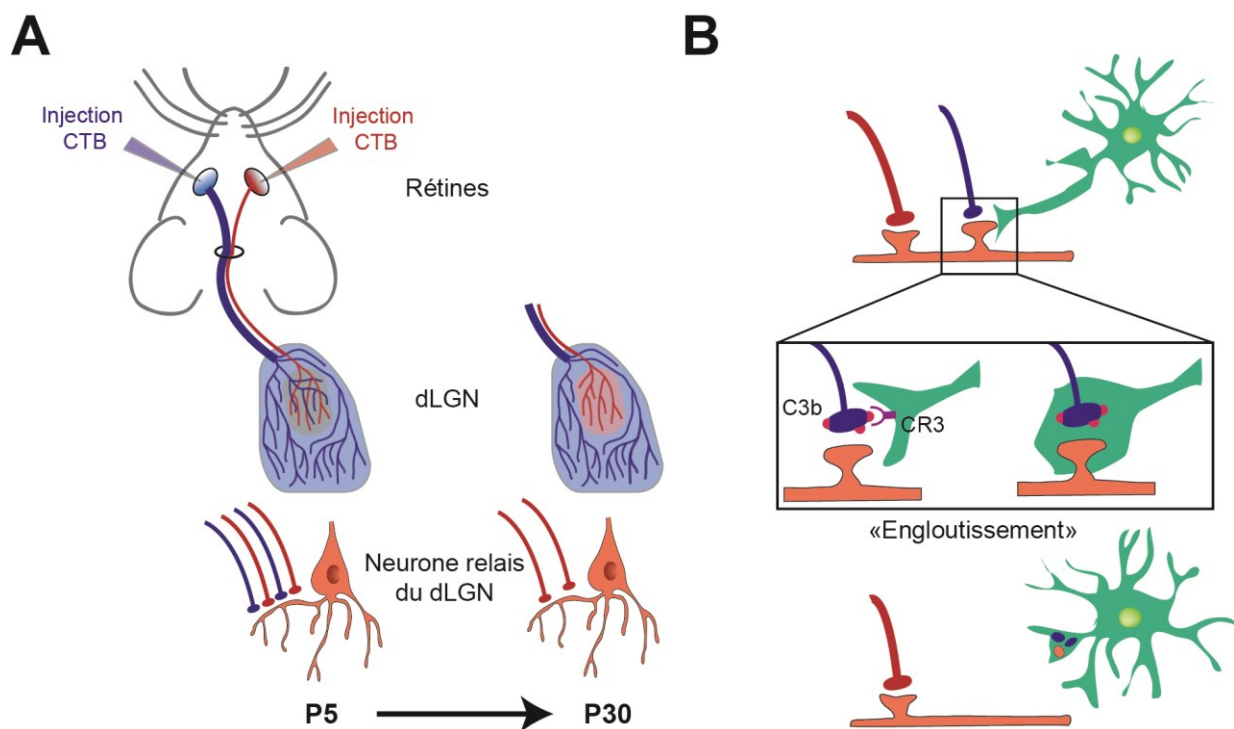


FIGURE 14 : ELAGAGE SYNAPTIQUE DEPENDANT DE LA MICROGLIE DANS LE DLGN

A) Au stade prénatal précoce, les afférences axonales provenant des rétines se chevauchent dans le dLGN et les neurones reçoivent des afférences en provenance des deux yeux. Au cours du développement, un raffinement synaptique s'opère et les afférences ipsi- et contralatérales sont éliminées de la zone centrale du dLGN. **B)** Cet élagage synaptique est dépendant de l'expression de la protéine C3 du complément, dont le produit de protéolyse C3b marque les synapses à éliminer, et du récepteur à C3b CR3 exprimé par les microglies.

L'implication des microglies dans l'élagage synaptique développemental a également été retrouvé dans d'autres régions telles que l'hippocampe (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014) et le cortex (Tremblay et al., 2010). L'ablation du gène codant pour Cx3CR1, le récepteur à la fractalkine uniquement exprimé dans les microglies, engendre des défauts de maturation synaptique glutamatergique (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014) mais également une augmentation du nombre de synapses dans l'hippocampe associée à des défauts comportementaux chez les souris (Zhan et al., 2014). L'utilisation de la microscopie électronique en trois dimensions, ainsi que de l'imagerie bi-photonique, a pu montrer la présence de matériel synaptique dans les microglies, ce qui soutenait l'hypothèse de « l'engloutissement » (*engulfment*) de matériel synaptique par les microglies (Paolicelli et al., 2011; Tremblay et al., 2010). Cependant la combinaison de la microscopie à feuillet de lumière en temps réel et de reconstructions morphologiques à partir de microscopie électronique 3D sur des tranches organotypiques d'hippocampe immature a remis en cause l'hypothèse d'une phagocytose totale des synapses par les microglies. En effet, en utilisant ces techniques, Weinhard et al. ont montré que seule la partie présynaptique de la synapse était en contact avec les microglies, sans être complètement phagocytée, tandis que les épines dendritiques ne sont pas contactées (Weinhard et al., 2018). Ce phénomène rappelle la « trogocytose », qui a été décrite dans le système immunitaire comme un mécanisme non apoptotique pour la capture rapide des composants membranaires et diffère de la phagocytose, qui implique l'engloutissement et l'élimination de structures cellulaires plus importantes de taille supérieure au micron. L'ensemble de ces résultats suggèrent que différents mécanismes sont impliqués dans l'élagage synaptique en fonction des régions ou du stade de développement avec un engloutissement total ou partiel des synapses (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Sipe et al., 2016; Tremblay et al., 2010; Weinhard et al., 2018). A l'appui de cette hypothèse, des résultats récents montrent que la lésion des vibrisses chez le souriceau âgé de quatre jours induit une élimination synaptique dépendante des microglies dans le cortex en tonneau. Cette élimination synaptique dépend de la signalisation fractalkine/CX3CR1, mais pas du récepteur du complément CR3, contrairement à l'élagage synaptique dans le dLGN (Gunner et al., 2019).

2. Le système du complément, un acteur majeur dans la construction du SNC

Le système du complément est un acteur majeur du système immunitaire inné, impliqué dans la défense de l'hôte contre les infections (Ricklin et al., 2010). Si les cascades d'activation du système du complément ont été très étudiées dans le système immunitaire, leurs fonctions et leurs mécanismes d'action dans le cerveau restent encore énigmatiques. Plusieurs études récentes ont notamment révélé le rôle du complément dans le développement du SNC. Une revue détaillée sur le rôle du complément dans le SNC et son association avec des maladies psychiatriques se trouve en annexe (Druart and Le Magueresse, 2019).

A. Cascades du système du complément

Le système du complément comporte plus de 30 protéines circulantes présentes dans le sang et à la surface des cellules, qui interagissent entre elles par l'intermédiaire de cascades d'activation et d'inhibition enzymatiques conduisant *in fine* à l'élimination de pathogènes. Ces protéines sont majoritairement produites par les cellules hépatiques, mais peuvent également être synthétisées localement par des cellules immunitaires (Li et al., 2007).

Le système du complément peut être activé par trois voies différentes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative. L'ensemble de ces voies convergent vers le clivage du peptide C3 en C3a qui est une anaphylatoxine libérée dans la circulation sanguine, et en C3b qui est un composé actif capable de se fixer sur les cellules cibles pour favoriser leur élimination par phagocytose. C3b peut également s'associer avec le complexe C4b2b3b, formant ainsi la C5 convertase. Cette enzyme contribue à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (« *Membranaire Attack Complex* » ou MAC) sur la membrane des pathogènes provoquant leur lyse (**Figure 15**) (Druart and Le Magueresse, 2019).

- La voie classique commence par l'activation du complexe C1, composé des protéases C1s et C1r qui s'activent en réponse à leur liaison avec l'élément C1q responsable de la reconnaissance des antigènes. Les protéases C1s activées clivent C4 en C4a et C4b, ainsi que C2 en C2a et C2b, permettant la formation d'un complexe C4b2b, aussi appelé C3 convertase, qui est doté d'une activité enzymatique et clive C3.
- La voie des lectines est activée par la liaison entre une protéine globulaire appartenant à la famille des collectines, la *Mannose Binding Lectin* (MBL), qui interagit avec les résidus mannose présents à la surface des microorganismes. Sa structure est homologue à celle de C1q. Sa fixation sur les mannoses en surface des bactéries active deux sérine-protéases de la famille des MASP

(MASP1 et MASP2) qui clivent et activent C4 et C2. Il s'ensuit la formation de la C3 convertase, qui comme pour la voie classique active C3.

- La voie alternative, contrairement aux deux autres, n'est pas initiée par la reconnaissance d'antigènes. L'hydrolyse spontanée de molécules C3 provoque la formation de molécules réactives C3(H2O) et C3b. La liaison de ces molécules avec des surfaces de micro-organismes provoque la formation d'une C3 convertase stabilisée par la présence du facteur D du complément, ce qui engendre une boucle d'amplification conduisant à la production d'un grand nombre de molécules C3a et C3b.

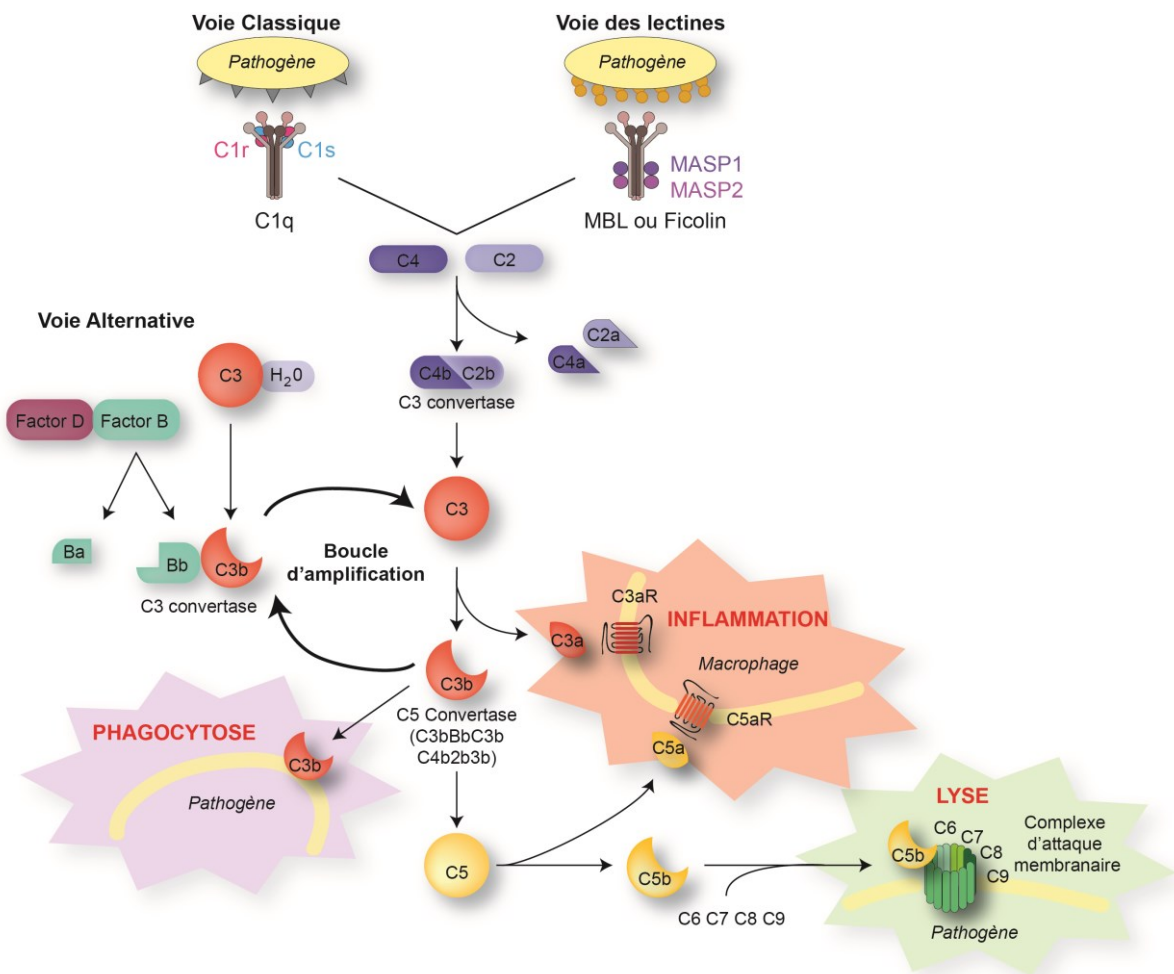


FIGURE 15 : CASCADE DU COMPLEMENT

Schéma représentant les 3 voies du système du complément : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative. L'ensemble de ces voies convergent vers le clivage du peptide C3 en C3b et C3a, menant à la phagocytose de pathogènes, l'inflammation locale ou la lyse de cellulaire (Adapté de Druart and Le Magueresse, 2019).

B. *Le complément dans le SNC*

Le SNC étant isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique qui empêche l'entrée de macromolécules dans le parenchyme, l'action du complément dans le cerveau est permise par la synthèse locale de molécules du complément par les cellules résidentes du SNC. L'expression de nombreuses molécules du complément a été observée dans des cultures primaires d'astrocytes, de microglies, d'oligodendrocytes et de neurones (Lévi-Strauss and Mallat, 1987; Thomas et al., 2000; Veerhuis et al., 1999; Walker and McGeer, 1993) ainsi que retrouvée par hybridation *in situ* sur des tissus humains (Veerhuis et al., 1998) et chez le rongeur (Johnson et al., 1994). Cette expression est régulée en fonction de l'état d'inflammation des tissus. En effet, bien que les protéines du complément soient produites par les cellules du SNC en condition non-pathologique, leur profil d'expression est modifié en réponse à une infection. Par exemple, l'inoculation de la bactérie *Listeria monocytogenes meningitis* chez la souris provoque une augmentation drastique de la concentration de C3 et du facteur B dans le liquide céphalorachidien (Stahel et al., 1997). L'étude par hybridation *in situ* sur des tranches de cerveau a pu montrer une augmentation des ARNm de ces gènes dans les cellules pyramidales de différentes régions dont le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Stahel et al., 1997). La régulation des cascades d'activation du complément dans le cerveau passe également par des changements d'expression des récepteurs aux molécules du complément par les cellules du SNC. Une augmentation du nombre de récepteurs C3aR et C5aR, qui sont les récepteurs des protéines C3a et C5a, a été observée dans des modèles d'ischémie chez la souris (Van Beek et al., 2000). La régulation des composants du système du complément se fait de manière spécifique dans chaque type cellulaire. Par exemple, il a été montré que suite à une ischémie transitoire, l'expression de C1q augmente fortement dans les microglies, mais pas dans les neurones (Schäfer et al., 2000).

L'expression des composants du système du complément change aussi dans certaines pathologies neuro-développementales et neuro-dégénératives (Druart and Le Magueresse, 2019). L'expression des molécules du complément est fortement associée à la maladie d'Alzheimer ; les protéines C1q, C3, C4 sont ainsi retrouvées au niveau des plaques amyloïdes béta (A β) sur du tissu *post-mortem* de patients (Rogers et al., 1992). Une hypothèse est que l'accumulation de C1q aux synapses contribuerait à l'élimination synaptique trop importante par les microglies dans la pathologie. De façon intéressante, des modèles murins de la maladie d'Alzheimer déficients en C1q ont des microglies moins réactives et moins de perte synaptique (Fonseca, 2004; Hong et al., 2016). De surcroît, de nombreux travaux récents ont permis d'associer les niveaux d'expression de certaines molécules du complément avec la schizophrénie (Prasad et al., 2018; Sekar, et al., 2016). Les mécanismes impliqués seront décrits dans la dernière partie de cette introduction.

C. Implication dans le développement du SNC

L'expression du complément commence tôt au cours du développement embryonnaire et est régulée sélectivement en fonction des régions et du stade de développement (Stephan et al., 2013). Cette régulation fine a suscité l'exploration de son rôle dans le développement du SNC. Le système du complément a notamment été impliqué dans la neurogenèse chez la larve de xénope (Mclain et al., 2008) et chez la souris (Bénard et al., 2008; Coulthard et al., 2017) à travers l'expression de C5a et de son récepteur C5aR. D'autres études ont montré le rôle crucial de la signalisation C3a-C3aR dans la bonne migration des neurones (Carmona-Fontaine et al., 2011; Gorelik et al., 2017). Enfin, la cascade du complément, et notamment la voie classique, contrôle l'élagage synaptique au cours du développement (Stevens et al., 2007).

Système du complément et élagage synaptique

Le rôle du complément dans l'élagage synaptique a été fortement étudié dans le dLGN. Chez la souris, la zone de projection chevauchante disparaît à P30 (Stevens et al., 2007). Les souris n'exprimant pas les gènes du complément C1q, C3 et C4 présentent des défauts d'élagage synaptique aboutissant à une mauvaise ségrégation des projections rétino-géniculées qui persiste à l'âge adulte (Stevens et al. ; Sekar 2016). L'utilisation d'un marquage VGlut2 (*vesicular-glutamate transporter 2*) sur des tranches de cerveau chez la souris a permis d'identifier la localisation des protéines C1q et C3 au niveau des terminaisons axonales des cellules ganglionnaires dans le dLGN (Bialas and Stevens, 2013; Stevens et al., 2007). L'expression de C1q et C3 est plus élevée au début du développement postnatal qu'à l'âge adulte (Schafer et al., 2012; Stephan et al., 2013; Stevens et al., 2007). L'expression élevée de C1q par les cellules ganglionnaires de la rétine au stade néonatal est sous le contrôle du facteur TGF- β , dont l'expression culmine à P5, puis diminue drastiquement dans les jours qui suivent (Bialas and Stevens, 2013). La phagocytose des éléments présynaptiques par les microglies dans le dLGN immature met en jeu la détection des synapses marquées par C3b grâce à son récepteur CR3 exprimé exclusivement par les microglies (Schafer et al., 2012). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de marquage par C1q et C3 des synapses à éliminer à des stades précis du développement, via un processus dépendant de la détection des molécules du complément par des récepteurs portés par les microglies.

Le rôle de la voie classique du complément dans l'élagage synaptique développemental a également été démontré dans le néocortex : l'ablation génétique du gène *C1q* est associée à une augmentation du nombre de synapses excitatrices sur les neurones pyramidaux de la couche V du cortex somato-sensoriel à l'âge adulte, ainsi qu'un phénotype épileptique (Chu et al., 2010).

3. La schizophrénie, une pathologie du neuro-développement

A. Caractéristiques cliniques de la pathologie

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique qui est aujourd'hui définie comme une psychose délirante chronique, caractérisée par des atteintes de la cognition, de la vie émotionnelle et du rapport au monde extérieur. Cette pathologie a une forte prévalence, touchant entre 0,5 et 1% de la population mondiale (Messias et al., 2007). La schizophrénie est une pathologie complexe, et peut se manifester par un large éventail de symptômes. Ces symptômes sont généralement subdivisés en trois catégories :

- Les symptômes positifs sont des modifications de la perception. Cette catégorie regroupe hallucinations, délires, troubles de la pensée et du langage, ainsi que troubles psychomoteurs.
- Les symptômes négatifs sont caractérisés par une perte de réponse émotionnelle adaptée. Cette catégorie inclut apathie et retrait social.
- Les symptômes cognitifs regroupent des dysfonctions de l'attention et de la concentration, ainsi que des troubles de la mémoire de travail.

Le diagnostic de la maladie est généralement établi à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Il est souvent posé après une crise psychotique aiguë engendrant une rupture complète avec l'environnement (Weinberger, 1987; Tandon, 2014). Cependant, il est en général établi tardivement dans l'évolution de la maladie : des symptômes prodromaux négatifs et cognitifs précèdent parfois de plusieurs années le diagnostic définitif.

B. Une pathologie neuro-développementale

L'hypothèse d'une origine neuro-développementale de la schizophrénie est ancienne. Dès le début du 20^e siècle, Kraepelin a proposé que certains cas de schizophrénie pourraient être causés par des traumatismes cérébraux précoces. Elle constitue la théorie explicative dominante depuis les années 1980. Dans sa forme la plus simple, ce modèle postule que la schizophrénie est le résultat comportemental d'une dysfonction des processus neuro-développementaux qui commence bien avant l'apparition des symptômes cliniques et est causée par une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques. Dans un article influent publié en 1987, Daniel Weinberger a ainsi suggéré qu'« une "lésion" fixée dès le début de la vie interagit avec des événements normaux de maturation du cerveau qui se produisent beaucoup plus tard. » (Weinberger, 1987). Cette hypothèse est à l'heure actuelle soutenue par de nombreuses études épidémiologiques, neuro-pathologiques et génétiques (Fatemi and Folsom, 2009). Le lien entre facteurs environnementaux intervenant au cours du développement embryonnaire du SNC et schizophrénie est bien établi. La corrélation entre infection virale ou bactérienne chez la mère au cours des 1^{er} et 2^{ème} trimestres de grossesse et le risque augmenté de développer la maladie chez la descendance

indiquent que l'étape de développement embryonnaire précoce est une fenêtre de vulnérabilité (Brown et al., 2004b; Brown, 2012). De nombreuses études d'histologie *post-mortem* et d'imagerie cérébrale montrent des défauts de lamination dans le cortex, un accroissement de la taille des ventricules cérébraux, et une diminution du volume du néocortex et de l'hippocampe chez les patients schizophrènes, ce qui suggère que la trajectoire neuro-développementale est altérée dans la pathologie (Fatemi and Folsom, 2009). De plus, certains gènes impliqués dans l'étiologie de la maladie participent aux processus de développement prénatal. C'est le cas notamment du gène *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)* qui est impliqué dans le renouvellement des progéniteurs neuronaux et dont l'association avec la schizophrénie a été démontré dans des études de familles porteuses de mutations de ce gène (Mao et al 2009). Par ailleurs, certains variants de gènes associés à la schizophrénie dans des études d'association (« *Genome-wide association studies* » ou *GWAS*), comme le polymorphisme rs1344706 du gène ZNF804A, sont responsables de changements d'expression du gène dans le cerveau fœtal, mais pas au cours du développement postnatal (Hill and Bray, 2012). Des études récentes d'épigénétique confirment le lien entre période prénatale et prédisposition à la schizophrénie. Les variants génétiques communes qui confèrent un risque de schizophrénie sont associées à une altération de la méthylation de l'ADN dans le cerveau humain fœtal, mais pas dans le cerveau humain à des stades ultérieurs de développement (Hannon et al., 2016).

C. Marqueurs anatomiques et moléculaires dans le cortex préfrontal de patients schizophrènes

Les troubles du comportement associés à la schizophrénie sont corrélés à des altérations anatomiques, cellulaires et moléculaires dans le cerveau des patients. Si, historiquement, l'augmentation du volume des ventricules a longtemps été l'altération pathologique la plus rapportée, le développement de l'imagerie de résonance magnétique, ainsi que des examens neuropathologiques poussés sur des tissus *post-mortem* ont pu montrer des anomalies à la fois de la matière blanche et de la matière grise (**Figure 16**) (Canu et al., 2015). L'analyse de larges cohortes de patients a permis d'identifier des régions affectées de façon systématique dans la pathologie (DeLisi et al., 2006) et de poser des hypothèses sur des potentiels mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la pathologie. Les altérations du cortex préfrontal dans la schizophrénie ont en particulier été impliquées dans les symptômes cognitifs et négatifs, qui sont particulièrement résistants aux antipsychotiques (Elvevåg and Goldberg, 2000; Wible et al., 2001).

Dans le cadre de cette introduction, je me focaliserai plus particulièrement sur certains des marqueurs identifiés dans le cortex préfrontal de patients, car mon étude expérimentale sur le lien entre complément et phénotypes associés à la schizophrénie a été conduite dans le cortex préfrontal d'un modèle murin.

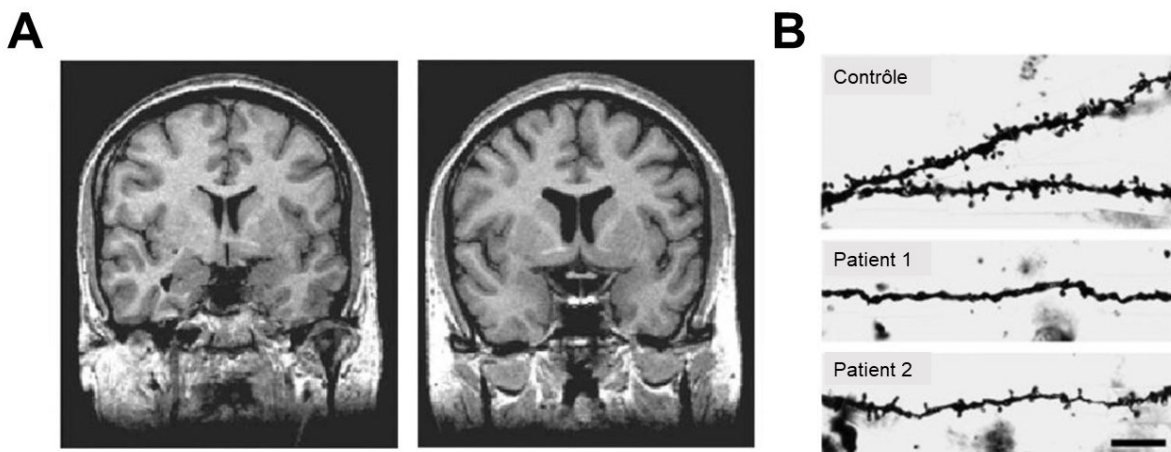


FIGURE 16 : MARQUEURS ANATOMIQUES RETROUVES DANS LE CERVEAU DE PATIENTS SCHIZOPHRENES

A) IRM d'un sujet sain (gauche) et d'un individu atteint (droite). Un fort élargissement des ventricules ainsi qu'une perte de matière grise sont observés chez le patient. B) Dendrites de cellules pyramidales de la couche III du cortex préfrontal après marquage de Golgi réalisé sur des coupes de cerveau post-mortem chez un individu contrôle et chez deux patients atteints de schizophrénie. Une perte d'épines dendritiques caractéristique se retrouve chez les patients (Adaptée de Glantz and Lewis, 2000; Howes et al., 2004).

Perte de synapses excitatrices

Suite à la démonstration que la densité d'épines dendritiques dans le néocortex décroît à l'adolescence (Huttenlocher, 1979), c'est-à-dire à l'âge auquel la schizophrénie est en général diagnostiquée, Irvin Feinberg a proposé en 1982 que la pathologie pourrait résulter d'une altération de l'élimination des synapses au cours de la période postnatale (Feinberg, 1982). Des observations expérimentales sont venues depuis conforter cette hypothèse. L'épaisseur du cortex, en particulier du cortex préfrontal, est diminuée chez les patients, ce qui est dû à une diminution de connectivité entre les neurones plutôt qu'à une perte cellulaire (Honea et al., 2005). Cette diminution de volume est corrélée à une diminution de la densité des épines dendritiques observée *post-mortem* dans la couche III du cortex de patients, et à une diminution de la densité du neuropil dans les couches supérieures du cortex mesurée dans des études d'imagerie cérébrale (**Figure 16**) (Glausier and Lewis, 2013; Konopaske et al., 2014; Prasad et al., 2018). Cependant, la diminution de la densité des épines dendritiques n'est pas uniforme : celle des épines de petite taille semble être plus prononcée que celle des épines de taille plus importante. Comme les épines les plus petites sont les plus récentes et les moins stables, ces résultats pourraient indiquer que la formation et la stabilisation des synapses, plutôt que leur élimination, est affectée dans la pathologie (MacDonald et al., 2017). Il est à noter que la diminution de la densité synaptique n'est pas restreinte au

néocortex, et touche d'autres régions cérébrales, telles que l'hippocampe et le thalamus (Osimo et al., 2019).

Hypofonction des récepteurs NMDA

Des études de pharmacologie, de génétique et de biochimie soutiennent l'hypothèse d'une hypofonction des récepteurs NMDA dans la schizophrénie (Mohn et al., 1999). Tout d'abord, l'administration de bloqueurs des canaux NMDAR (kétamine, phencyclidine ou PCP) chez le sujet sain provoque des symptômes et des déficits cognitifs qui ressemblent à ceux de patients schizophrènes (Javitt and Zukin, 1991; Krystal, 1994). De plus, des études ont révélé une sensibilité accrue à la kétamine chez des patients schizophrènes stabilisés (Lahti, 2001). Plus récemment, une méta-analyse réalisée à partir de tissu *post-mortem* a révélé une diminution significative de l'expression de l'ARNm et de la protéine GluN1, une sous-unité constitutive des récepteurs NMDA, dans le cortex préfrontal de sujets atteints de schizophrénie (Catts et al., 2016). Il est intéressant de noter que le rôle de cette sous-unité GluN1 dans la schizophrénie est également suggéré par l'étude de maladies auto-immunes. Les patients atteints d'encéphalite auto-immune, produisant des anticorps contre les épitopes extra-cellulaires de la sous-unité GluN1 (IgG GluN1), présentent initialement des symptômes psychiatriques similaires à ceux de la schizophrénie (Dalmau et al., 2008). L'internalisation des NMDARs reconnus par ces anticorps entraînerait une diminution de la transmission glutamatergique (Dalmau et al., 2011). Enfin, des modèles animaux ont démontré que la réduction de l'activité des récepteurs NMDA pouvait entraîner des changements cérébraux et comportementaux similaires à ceux observés dans la schizophrénie. Par exemple, des études ont été menées sur des souris dépourvues de l'enzyme sérine racémase, responsable de la synthèse de la D-sérine, ce qui induit une hypofonction des récepteurs NMDA (Basu et al., 2009). Les souris knock-out pour la sérine racémase présentent une diminution de la densité des épines dendritiques dans les neurones excitateurs du cortex et de l'hippocampe, ainsi qu'une augmentation du volume ventriculaire (Balu et al., 2013; Balu and Coyle, 2012). Ces souris présentent également des déficits d'apprentissage et des déficits cognitifs dépendants de l'hippocampe et du cortex préfrontal (Balu et al., 2013; DeVito et al., 2011). Les souris déficientes pour le gène codant pour la reelin ont permis de collecter d'autres résultats pertinents sur le lien possible entre schizophrénie et hypofonction des récepteurs NMDA. La reelin est synthétisée par les interneurons GABAergiques (Alcántara et al., 1998; Campo et al., 2009) et est un composant essentiel de la matrice extracellulaire. La reelin est notamment impliquée dans un grand nombre de fonctions au cours du développement du SNC et chez l'adulte (Qiu et al., 2006; Tissir and Goffinet, 2003), et associée à la schizophrénie (Knuesel, 2010). La reelin pourrait être impliquée dans l'étiologie de la schizophrénie notamment par son rôle dans la composition en sous-unité des récepteurs NMDA. En effet, il a été montré que la reelin est nécessaire pour la maturation des récepteurs NMDA (Campo et al., 2009; Groc et al., 2007; Sinagra, 2005). La suppression d'un allèle de reelin chez la souris provoque une diminution drastique de la densité d'épines dendritiques dans le cortex

préfrontal, ainsi que des défauts de plasticité à long terme dépendante des récepteurs NMDA dans l'hippocampe. De plus, ces deux phénotypes sont corrigés par l'administration de kétamine, un agoniste des récepteurs NMDA (Iafrazi et al., 2014).

Rôle de l'inhibition

Les altérations de la transmission GABAergique pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de la schizophrénie. Des études *post-mortem* ont révélé des déficits d'expression de l'ARNm de GAD67 dans le cortex préfrontal de patients schizophrènes (Akbarian, 1995; Hashimoto et al., 2003; Torrey et al., 2005). GAD67 est l'une des enzymes nécessaires à la synthèse du GABA ; la diminution de son expression suggère donc une baisse de production de GABA dans le cerveau des patients. De façon intéressante, les déficits n'affectent pas toutes les sous-classes d'interneurones uniformément. Les interneurones PV sont particulièrement affectés par la baisse d'expression de GAD67 (Hashimoto et al., 2003; Volk et al., 2000). Étant donné que ces neurones sont fortement impliqués dans la régulation des oscillations corticales, des altérations de leur libération de GABA peuvent fortement affecter la production d'oscillations synchronisées cruciales pour de nombreuses fonctions cognitives (Uhlhaas and Singer, 2010). De plus, certaines études sur du tissu *post-mortem* ont également rapporté des diminutions d'expression du transporteur au GABA, GAT-1. Ce transporteur est présent dans la région pré-synaptique où il a pour fonction de recapter le GABA présent dans la fente synaptique. Enfin, des modifications post-synaptiques de la transmission GABAergique ont également été décrites, en particulier une augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ des récepteurs GABA_A (Benes et al., 1992, 1996; Volk et al., 2000). Cette diminution d'expression de GAT-1 et la modification des sous-unités GABA_A pourraient servir de mécanismes de compensation homéostatique pour pallier à la diminution de libération de GABA par les interneurones et rétablir une balance excitation-inhibition physiologique dans le cortex préfrontal (Gonzalez-Burgos et al., 2015). Cependant, l'étude des rythmes corticaux dans la schizophrénie a révélé des perturbations des oscillations, notamment dans le domaine de fréquence gamma, ce qui suggère une modification de la balance excitation-inhibition (E-I) imparfaitement compensée par les éventuelles modifications homéostatiques aux synapses GABAergiques (Gonzalez-Burgos et al., 2015).

D. Etiopathologie de la schizophrénie : implication génétique et environnementale

Influence génétique

L'étude de la transmission familiale de la schizophrénie a démontré le rôle de l'hérédité dans la pathologie. Par exemple, le jumeau monozygote d'une personne atteinte a 48% de risque d'être lui aussi schizophrène, alors que la prévalence de la schizophrénie est de moins de 1% dans la population générale. L'héritabilité de la schizophrénie, qui est définie par la proportion de variation entre individus dans une population qui est influencée par des facteurs génétiques, et non par le degré de détermination génétique du risque individuel, se situe entre 64 et 81% (Bergen and Petryshen, 2012). Un grand nombre d'études s'est porté sur les causes génétiques en étudiant l'ADN de familles chez lesquelles la prévalence de la pathologie est forte, ce qui a permis d'identifier des gènes ou des régions géniques impliqués dans la schizophrénie (**Figure 17**).

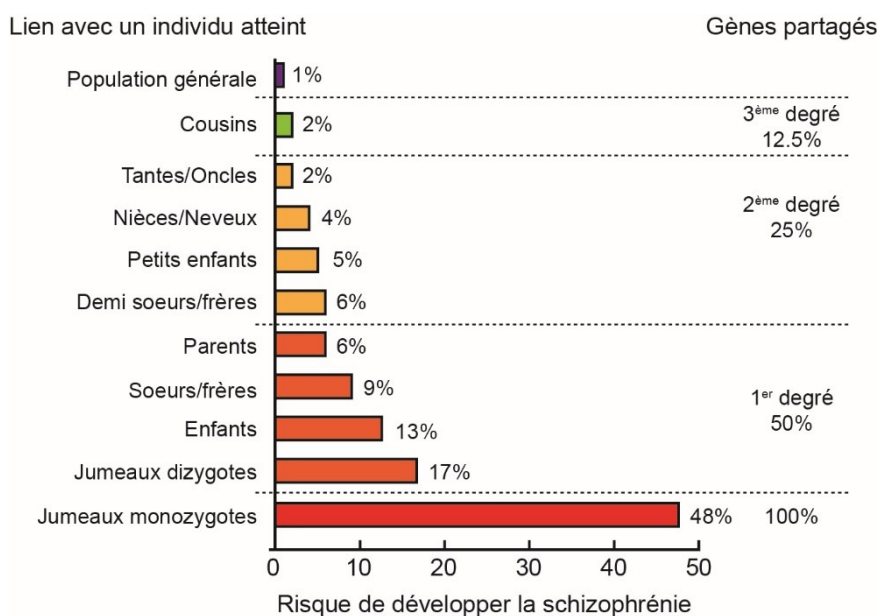


FIGURE 17 : RISQUE DE DEVELOPPER LA SCHIZOPHRENIE CHEZ LES APPARENTES DE PATIENTS SCHIZOPHRENES (ADAPTE DE GOTTESMAN, 1991)

La première cause monogénique de la schizophrénie à avoir été identifiée est une translocation de *DISC1*, codant pour la protéine DISC1. Ce gène a été découvert dans une large famille écossaise présentant un fort taux de maladies psychiatriques dont la schizophrénie. Cette protéine est impliquée dans un grand nombre de fonctions au cours du développement embryonnaire telles que la formation et la différenciation des neurones (Johnstone et al., 2011). Des translocations de la région génique de *DISC1*

ont été observées chez les patients atteints de la pathologie. Ce gène étant conservé au cours de l'évolution, des modèles murins ont pu être développés (Hikida et al., 2007). Les souris dominantes-négatives pour DISC1 présentent des phénotypes anatomiques et comportementaux associés à la schizophrénie tels qu'une augmentation de la taille des ventricules, une diminution du nombre d'interneurones PV dans le cortex préfrontal (Hikida et al., 2007) et des défauts de comportement social (Kaminitz et al., 2014).

Le plus fort facteur de risque génétique connu pour la schizophrénie est la présence de microdélétions dans la région chromosomique 22q11.2. (Bassett et al., 2000). Près de 30% des personnes présentant cette mutation développent la maladie. Afin de mimer l'impact de ces délétions, des souris génétiquement modifiées ont été générées (souris Df(16)A^{+/-}), portant des délétions synthétiques des loci homologues à la région 22q11.2. Ces souris présentent des phénotypes associés à la schizophrénie, comprenant une diminution de cellules PV identifiables dans le cortex et l'hippocampe (Fenelon et al., 2013; Piskorowski et al., 2016), une augmentation de l'élimination synaptique corticale, ainsi que des perturbations de plasticité synaptique (Fenelon et al., 2013; Piskorowski et al., 2016) et de mémoire de travail (Sigurdsson et al., 2010).

Les études d'association génique à grande échelle (*GWAS*) ont permis d'identifier de nombreuses régions géniques associées à la pathologie. A l'inverse des mutations rares mais à forte pénétrance, c'est-à-dire qui ont une forte probabilité de causer la pathologie, les variants identifiés dans les *GWAS* sont communs et de faible pénétrance. La plus grande étude menée sur la schizophrénie réalisée en 2014 a comparé le génome de 36 989 patients et 113 075 individus sains. Dans le cadre de cette étude, les auteurs ont pu identifier 108 loci associés à la schizophrénie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Une région correspondant au complexe majeur d'histocompatibilité située sur le chromosome 6 est de très loin la plus fortement associée à la schizophrénie dans les *GWAS* ($P < 10^{-40}$ dans les études les plus récentes). Une analyse détaillée de ce locus a montré une forte relation entre la partie de la région codant pour le gène du complément *C4* et la schizophrénie (Sekar, et al., 2016). Ce résultat implique donc le système immunitaire, et notamment, le système du complément dans la schizophrénie. Les mécanismes d'action pouvant être impliqués seront détaillés par la suite.

Influence de l'environnement

De nombreuses études épidémiologiques indiquent que des facteurs environnementaux au cours de la période prénatale et périnatale, en particulier liés à l'inflammation et aux infections, contribuent activement au risque de développer la maladie. Les infections prénatales survenant au cours des 1^{er} et 2^{ème} trimestres de grossesse sont associées à des risques plus élevés de schizophrénie (Brown et al., 2004a). Ces études suggèrent un lien entre le développement du cerveau et l'activation immunitaire à

des moments bien précis du développement embryonnaire. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont qu'imparfaitement caractérisés. Des études ont tenté de déterminer le lien entre l'activation de la réponse immunitaire systémique et la réponse immunitaire au niveau du SNC, qui pourrait passer par une activation persistante de la microglie dès les stades précoces du développement. En effet, certaines études *post-mortem* sur des cerveaux humains ont révélé une activation de la microglie chez les patients souffrant de troubles neurologiques et notamment de schizophrénie (de Baumont et al., 2015; Fillman et al., 2013). Cependant, les données d'imagerie de tomographie par émission de positrons (PET-Scan), qui permettent de quantifier l'activation de la microglie, n'ont pas permis de confirmer de manière probante que la microglie est activée dans le cerveau des patients. Il est possible que l'activation microgliale dans la schizophrénie soit faible et indétectable par les méthodes de PET-Scan plus adaptées à la détection d'une activation « canonique » des microglies à la suite d'une activation immunitaire massive du tissu cérébral, ou que l'activation de la microglie ne concerne qu'une sous-population de patients (De Picker and Morrens, 2020). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'administration de minocycline, un antibiotique utilisé pour traiter l'acné à l'adolescence et qui diminue par ailleurs l'activité microgliale, a un effet protecteur sur la pathologie : les adolescent traités longtemps à la minocycline (> 90 jours) sont statistiquement moins susceptibles de souffrir de schizophrénie que ceux ayant été traités moins longtemps (Sellgren et al., 2019). Le lien entre activation microgliale et schizophrénie chez les patients étant seulement corrélatif, seule l'utilisation de modèles animaux présentant des activations ou des suppressions de l'activité des microglies a permis de tester des hypothèses causales sur les mécanismes impliqués. Les modèles d'activation immunitaire maternelle (*MIA* pour *maternal immune activation*) par injection prénatale de lipopolysaccharide ou de Poly I : C, molécules qui miment respectivement une infection bactérienne et virale chez la mère, sont des outils pertinents. La progéniture de souris *MIA* présente des modifications de comportement qui peuvent être rapprochées de la symptomatologie cognitive et négative dans la schizophrénie (Fatemi and Folsom, 2009; Wolff et al., 2011). Plusieurs phénotypes cellulaires associés à la schizophrénie, tels que la perte d'épines dendritiques, l'augmentation du ratio AMPA/NMDA, et de nombreuses altérations des circuits GABAergiques, ont aussi été observés dans les modèles *MIA* (Bergdolt and Dunaevsky, 2019; Canetta et al., 2016; Roumier et al., 2008; Vasistha et al., 2019). Des études rapportent aussi la présence de marqueurs d'inflammation et d'activation microgliale persistante dans le cerveau adulte (Mattei et al., 2014, 2017). De plus, l'administration de minocycline au cours du développement postnatal restaure certains phénotypes cellulaires causés par l'activation immunitaire maternelle couplée à une diminution d'expression du gène *Disc1*, en particulier la perte d'épines dendritiques dans le cortex (Chini et al., 2020). Ces résultats suggèrent un rôle causal de l'activation des microglies dans certains des phénotypes cellulaires et comportementaux dans les modèles *MIA*. Ainsi, l'activation microgliale persistante pourrait constituer le lien entre phénomènes inflammatoires précoces au cours du développement prénatal, et perte de matière grise et de synapses excitatrices à l'adolescence.

L'exposition à un stress majeur pendant les phases de développement précoce est aussi un facteur de prédisposition à la schizophrénie (Weinstock, 2001). Des expériences chez l'animal ont confirmé que le stress maternel peut avoir des effets profonds sur la mise en place des réseaux neuronaux qui affectent les fonctions cérébrales à l'âge adulte. L'utilisation de protocoles de stress chez le rongeur augmente la libération d'hormones liées au stress telles que le cortisol chez la mère, ce qui aboutit des concentrations de cortisol plus élevées chez les embryons (Charil et al., 2010). Les modèles animaux de stress prénatal consistent généralement à administrer des glucocorticoïdes ou à maintenir les femelles gestantes en contention. Par exemple, un des mécanismes observés lors de l'induction de stress chez la ratte gestante est une diminution de l'expression de la reelin (Palacios-García et al., 2015), dont l'implication dans la schizophrénie a été décrite précédemment.

E. Système du complément et schizophrénie

Bien que le rôle du complément dans la schizophrénie ait commencé à être étudié il y a plus de trente ans, ce n'est que récemment que l'hypothèse d'une implication du complément dans la schizophrénie a fait consensus. En effet, des études initiales menées sur des cohortes de patients ont rapporté des résultats contradictoires sur l'augmentation de l'expression de certaines protéines du complément dans le sérum de patients atteint de schizophrénie par rapport à des sujets témoins (Mayilyan et al., 2008; Spivak et al., 1993). L'avènement des études génétiques d'association sur de larges populations de patients et de témoins (*GWAS*) a permis de montrer l'association avec la pathologie de plusieurs loci qui contiennent des gènes du complément. Les *GWAS* ont démontré une forte association de la schizophrénie avec le locus du CMH présent sur le chromosome 6 dans lequel se trouve la région codant pour le gène C4 du complément (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014), mais également avec une région contenant le gène CSMD1 (« *CUB and Sushi multiple domains 1* ») qui code pour une protéine régulatrice de l'expression de C3 et C4 (Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP) et al., 2009). De façon intéressante, CSMD1 inhibe l'expression C4b et C3b (Escudero-Esparza et al., 2013), et sa délétion chez la souris provoque un phénotype comportemental qui peut être rapproché des symptômes négatifs de la schizophrénie : les souris knock-out pour *Csmd1* montrent des réponses émotionnelles émoussées et une anxiété accrue (Steen et al., 2013).

L'implication de C4 dans la pathologie a été mise en évidence par une étude détaillée de la région du CMH associée à la schizophrénie sur le chromosome 6. Cette étude a mis en évidence l'hétérogénéité des variants du gène C4, qui se présentent sous la forme de répétitions de deux motifs génétiques codant pour deux formes légèrement différentes de la protéine C4, C4A et C4B. Étant donné que chaque motif correspond à une protéine exprimée, le nombre de motifs concaténés est directement corrélé à l'expression totale des protéines C4. La génétique du locus de C4 est rendue plus complexe encore par l'insertion d'éléments rétroviraux humains (HERV) dans certains motifs C4A ou C4B. Ces formes dites

dendritiques dans le cortex, et une diminution de la fréquence des courants miniatures excitateurs dans les cellules pyramidales. Cette étude montre aussi que l'expression augmentée de C4 augmente l'inclusion de matériel présynaptique au sein des microglies du cortex (Comer et al., 2020). Cependant, le lien entre expression élevée de C4 et turnover synaptique augmenté, qui permettrait de valider l'hypothèse d'un excès d'élimination de synapses à l'adolescence, n'a pas été établi directement. De plus, la manière dont l'expression élevée de C4 pourrait affecter d'autres phénotypes cellulaires associés à la schizophrénie, tels que l'hypofonction des récepteurs NMDA et les nombreuses altérations du système GABAergique, reste inconnues.

Bien que l'étiologie de la schizophrénie ne soit pas bien comprise, dépendante à la fois du patrimoine génétique de l'individu et de son exposition à des perturbations environnementales au cours du développement, les processus immuno-inflammatoires et certains gènes de l'immunité apparaissent comme des facteurs majeurs de prédisposition. Ainsi, l'étude des interactions entre système immunitaire et cerveau pourrait fournir de nouvelles clés de compréhension des mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent cette pathologie.

OBJECTIF DE LA THESE

Comme je l'ai montré dans cette introduction, la mise en place du néocortex dépend d'une suite de processus finement régulés au cours du développement embryonnaire et post-natal. Après la prolifération cellulaire et la migration des neurones et cellules gliales, les connexions entre les neurones s'établissent, se renforcent et se raffinent pour former des réseaux adultes matures et fonctionnels. Ces étapes dépendent de facteurs génétiques et environnementaux ainsi que de l'activité neuronale.

Les altérations de l'environnement pendant des étapes bien délimitées du développement postnatal peuvent avoir des effets durables sur le fonctionnement du cerveau adulte. Ces fenêtres temporelles de sensibilité accrue, appelées périodes critiques, existent pour l'ensemble des modalités sensorielles, motrices et cognitives. Le développement des différentes aires corticales n'étant pas homogène, l'apparition de périodes critiques dépend de la région concernée. De plus, les mécanismes génétiques, moléculaires et cellulaires qui régissent ces périodes diffèrent d'un cortex à l'autre. J'ai décidé d'étudier deux périodes critiques de développement chez la souris : celle d'une modalité sensorielle dépendante de l'activité dans le cortex visuel, et une seconde liée à l'élagage synaptique dans le cortex préfrontal qui est le siège de fonctions cognitives élaborées et impliquées dans la schizophrénie. Mes travaux sont organisés en deux études distinctes.

La première étude menée durant ma thèse concerne la période critique « canonique » que constitue la période critique du cortex visuel. Chez les mammifères, le système visuel est un système privilégié pour l'étude des phénomènes de plasticité dépendante de l'activité car il est facile de moduler l'arrivée d'informations sensorielles. Des expériences de déprivation visuelle ont été réalisées d'abord chez le chat puis chez d'autres mammifères depuis les années 70, et ont permis de caractériser en détail la période critique de dominance oculaire. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la survenue et la fermeture de cette période critique, et notamment le rôle crucial des interneurons PV. En dépit d'un nombre considérable de travaux sur le sujet, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués sont encore incomplètement connus. Plusieurs études récentes ont montré que des changements importants se produisent au niveau des afférences excitatrices sur les interneurons PV pendant la période critique en réponse à une déprivation monoculaire, et suggèrent que ces modifications pourraient avoir un rôle causal dans l'ouverture de la période critique. Nous avons donc décidé d'étudier les changements se produisant au niveau des synapses excitatrices sur les interneurons PV au cours du développement postnatal chez la souris. Sur la base d'observations qui montraient des changements transitoires de composition des récepteurs AMPA dans les interneurons PV du cortex préfrontal chez le rat juvénile,

nous avons décidé de cibler notre étude sur l'évolution de la composition en sous-unités de ces récepteurs pendant la période critique et sur les modifications de la plasticité synaptique qui en découlent.

Dans un second projet, je me suis intéressée au développement du cortex préfrontal afin d'étudier le lien entre le système immunitaire et la schizophrénie. Étant donné que le gène du complément C4 a été fortement associé à la schizophrénie dans les études génétiques, il m'a semblé pertinent d'aborder les liens immunité-cerveau dans la schizophrénie en modélisant chez la souris l'effet d'une expression élevée du gène C4 dans le cortex. Ce sera l'objet du deuxième article présenté dans la partie expérimentale de ce manuscrit de thèse. Mon hypothèse de travail était qu'une augmentation d'expression du gène C4 pourrait augmenter de façon pathologique l'élagage synaptique dans le cortex préfrontal, ce qui pourrait à son tour engendrer d'autres phénotypes associés à la schizophrénie. L'un des enjeux de la recherche sur les modèles animaux de la schizophrénie est en effet de parvenir à relier certains phénotypes distincts observés chez les patients, mais dont les liens causaux ne sont pas établis. Le travail expérimental entrepris ici avait notamment pour but d'essayer d'établir un lien entre immunogénétique (expression de C4), turnover des synapses excitatrices, hypofonction des récepteurs NMDA, et altérations GABAergiques.

Nous avons donc développé un modèle murin de sur-expression de C4 dans le cortex préfrontal en utilisant la technique d'électroporation *in utero* afin d'étudier les conséquences fonctionnelles d'une expression élevée de C4. Nous nous sommes focalisés sur les cellules pyramidales des couches II/III du cortex préfrontal car il s'agit de la région la plus touchée par la perte d'épines dendritiques chez les patients. Ce nouveau modèle de souris nous a permis d'étudier l'effet d'une expression accrue de C4 dans les cellules pyramidales et les interneurons PV environnants à plusieurs stades de développement, ainsi que sur le comportement de la souris adulte.

Ces deux axes de recherche portant sur des périodes critiques de développement corticales font l'objet de deux articles scientifiques présentés dans la partie « résultats » de cette thèse. Ils seront brièvement remis dans leur contexte et les résultats et hypothèses seront discutés dans la dernière partie de ce manuscrit.

En parallèle de ces travaux sur les périodes critiques, j'ai également été impliquée dans un projet de recherche portant sur les conséquences sur la fonction neuronale d'une mutation du gène *FOXP2* dans le cortex auditif. Les résultats de cette étude font l'objet d'un article dont je suis première auteure qui est présenté ici en annexe (actuellement en révision, en attente de resoumission, dans le *Journal of Neuroscience*).

Le gène *FOXP2* code pour la protéine Forkhead-P2. Une mutation de *FOXP2* a été la première cause monogénique identifiée dans une pathologie du langage, grâce à l'étude d'une famille anglaise, connue sous le nom de famille KE, chez laquelle la moitié des membres souffrent d'un trouble de la prononciation (dyspraxie), mais aussi d'atteintes spécifiques du langage (Lai et al., 2001; Vargha-Khadem et al., 2005). FoxP2 est un facteur de transcription exprimé dans le cerveau très tôt au cours du développement embryonnaire chez la souris comme chez l'homme. Chez l'adulte, cette protéine est exprimée dans différentes régions du SNC dont les couches profondes du cortex (Ferland et al., 2003). Les souris porteuses d'une mutation ponctuelle identique à celle observée dans la famille KE présentent notamment des déficits moteurs ainsi que de vocalisation, et des défauts de plasticité synaptique dans le striatum où Foxp2 est fortement exprimé (Chen et al., 2016; Groszer et al., 2008; van Rhijn et al., 2018). Cependant, les conséquences de cette mutation sur les propriétés physiologiques des neurones étaient encore à élucider. Nous avons donc étudié l'impact fonctionnel de cette mutation sur les neurones exprimant FoxP2 de la couche VI du cortex auditif chez la souris. Nous avons montré que la morphologie de l'arborisation dendritique de ces cellules est altérée, et que la mutation de *Foxp2* induit aussi une diminution des entrées excitatrices vers les neurones pyramidaux du cortex auditif qui expriment Foxp2. Ayant décelé des défauts d'excitabilité neuronale dans les neurones des souris mutantes, nous avons étudié la voie des récepteurs GABA_B couplés aux canaux potassiques de type GIRK, et montré que cette voie est suractivée en présence de la mutation de *Foxp2*. Nous avons enfin démontré que cette suractivation de la voie GABA_B/GIRK est responsable des changements d'excitabilité observés dans les neurones mutants. Ce travail étant plus difficile à relier à mes deux autres études, j'ai fait le choix de ne pas le discuter dans le cadre de ce manuscrit de thèse.

CHAPITRE 2 :

RESULTATS

ARTICLE 1 : ALTERATION DE LA RECTIFICATION DES COURANTS AMPA ET DE LA PLASTICITE HOMEOSTATIQUE DANS LES INTERNEURONES PV AU COURS DE LA PERIODE CRITIQUE DU CORTEX VISUEL CHEZ LA SOURIS

Objectif de l'étude

Au cours du développement cortical, des périodes de forte plasticité dépendante de l'activité permettent la reconfiguration des réseaux neuronaux en réponse à des altérations environnementales. Une période critique a été particulièrement étudiée dans le cortex visuel chez la souris en réponse à des déprivations visuelles de quelques jours. Cette perte d'activité neuronale pendant la période critique modifie la dominance oculaire dans le cortex binoculaire, c'est-à-dire induit la perte persistante des réponses neuronales aux afférences excitatrices en provenance de l'œil fermé (contra-latéral par rapport au cortex visuel enregistré) au bénéfice des afférences provenant de l'œil resté ouvert (ipsi-latéral). Les travaux pionniers de Takao Hensch et de son équipe ont montré que l'inhibition GABAergique médiée par les interneurones « fast-spiking » qui expriment la parvalbumine (neurones PV) détermine l'ouverture et la fermeture de la période critique dans le cortex visuel (Hensch, 2005). Des études récentes suggèrent que les altérations de l'inhibition GABAergique fournie par les neurones PV pendant la période critique pourrait dépendre en grande partie de la maturation des afférences glutamatergiques vers les neurones PV. En particulier, une étude a montré une diminution des réponses excitatrices dans les interneurones PV en réponse à une courte déprivation visuelle pendant la période critique, mais pas en dehors de la période critique (Kuhlman et al., 2013). Cependant les mécanismes moléculaires et synaptiques sous-jacents se produisant à ces synapses restent inconnus.

La majorité de l'excitation rapide dans le cortex est dépendante des récepteurs AMPA. La composition de ces récepteurs détermine les propriétés des récepteurs et régissent les phénomènes de plasticité synaptique. La présence de la sous-unité GluA2 dans ces récepteurs dépend de la protéine GRIP1 qui achemine et stabilise GluA2 à la synapse. Or des travaux ont montré que la composition des récepteurs AMPA dans les neurones PV varie au cours du développement (Wang and Gao, 2010), et que l'expression de GRIP1 dans les neurones PV du cortex diminue à P25, c'est-à-dire non loin du pic de la période critique dans le cortex visuel (Okaty et al., 2009).

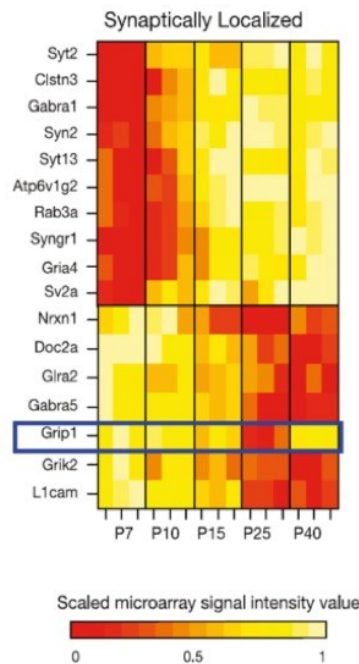


FIGURE 0 : ÉTUDE TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES LIÉS À LA FONCTION SYNAPTIQUE DANS LA MATURATION DES INTERNEURONES PV CORTICAUX (ADAPTE DE OKATY ET AL., 2009)

Cette étude a pour but d’explorer les changements aux synapses excitatrices sur les interneurons PV de la couche IV du cortex visuel au cours du développement. Nous avons donc étudié :

- La composition en sous-unités des récepteurs AMPA à cette synapse ;
- La plasticité synaptique homéostatique en réponse à une déprivation visuelle de 3 jours ;
- Le rôle de l’expression de GRIP1 dans la composition en sous-unités des récepteurs AMPA dans les interneurons PV, ainsi que son implication dans la plasticité synaptique homéostatique observée.

Méthodes utilisées

Afin de déterminer la composition en sous-unités des récepteurs AMPA aux synapses, nous avons réalisé des enregistrements en patch-clamp sur des tranches de cortex visuel chez la souris à 4 stades de développement : avant l’ouverture des yeux (P8-P11), avant la période critique (P14-P18), durant la période critique (P24-P28) et après cette période critique (P40-P55). Deux lignées génétiques ont été utilisées pour identifier les interneurons PV sur les tranches : les souris G42 exprimant la GFP dès la naissance dans les interneurons PV, et des souris PVCre ; RCE exprimant la GFP à partir du stade P16. Afin de supprimer l’expression de GRIP1 spécifiquement dans les interneurons PV, nous avons croisé des souris exprimant une séquence floxée de GRIP1 avec des souris PVCre ; RCE qui expriment la GFP dans les interneurons PV. Des déprivations visuelles de trois jours ont été réalisées afin d’étudier la plasticité dépendante de l’activité.

Résultats

Les expériences d'électrophysiologie réalisées nous ont permis d'observer que :

- Une augmentation de la rectification des courants synaptiques portés par les récepteurs AMPA se produit spécifiquement au moment de la période critique dans les interneurons PV, ce qui suggère que des récepteurs AMPA dotés de la sous-unité GluA2 disparaissent spécifiquement pendant la période critique ;
- Une plasticité homéostatique synaptique est présente en dehors de la période critique à ces synapses en réponse à une déprivation visuelle, mais pas pendant la période critique. De manière surprenante, cette forme de plasticité se manifeste par une augmentation de la fréquence des courants miniatures, et non de l'amplitude des courants miniatures comme c'est le cas dans les cellules pyramidales du cortex visuel en réponse à une fermeture d'un œil ;
- La présence de la protéine GRIP1 est nécessaire pour la présence de GluA2 dans les récepteurs AMPA, ainsi que pour la présence d'une plasticité synaptique homéostatique en dehors de la période critique.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'une diminution transitoire de la présence de GluA2 dans les récepteurs AMPA aux synapses excitatrices des interneurons PV se produit durant la période critique, ce qui est corrélé à une perte de plasticité homéostatique à cette synapse. En dehors de cette période, la sous-unité GluA2 est présente et une déprivation visuelle engendre un phénomène de plasticité homéostatique. La rectification des récepteurs AMPA et la plasticité homéostatique sont déterminées par l'expression de GRIP1, ce qui suggère que la perte de GRIP1 spécifiquement pendant la période critique pourrait modifier substantiellement les propriétés de plasticité des afférences excitatrices vers les neurones PV, et donc la plasticité de dominance oculaire du cortex visuel.

A synaptic switch gates developmentally-regulated homeostatic plasticity in parvalbumin interneurons of the visual cortex

M. Druart^{1,2,3}, M. Soiza-Reilly⁴, I. Moutkine^{1,2,3}, C. Le Magueresse^{1,2,3,#}

¹INSERM UMR-S 1270, 75005 Paris, France

²Sorbonne Université, 75005 Paris, France

³Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

⁴IFIBYNE (UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina

Correspondence: corentin.le-magueresse@inserm.fr

Abstract

Sensory-evoked brain plasticity peaks during critical periods (CP) of development. Several lines of evidence implicate glutamatergic inputs onto parvalbumin-expressing (PV) interneurons in the onset of the CP for ocular dominance (OD) plasticity in visual cortex, but the underlying molecular mechanisms remain unclear. We studied the development of the glutamatergic input onto PV neurons and pyramidal cells (PCs) in mouse visual cortex. Our results revealed a transient decrease in the AMPA-receptor (AMPA) rectification index during CP in PV neurons but not in PCs, suggesting a transient loss of AMPAR subunit GluA2 selectively at excitatory synapses onto PV interneurons. The expression of GRIP1, a protein involved in GluA2 trafficking and homeostatic synaptic plasticity, was previously shown to be transiently downregulated in cortical PV interneurons from juvenile mice. We assessed homeostatic plasticity induced by monocular deprivation at excitatory synapses onto PV neurons and found that it was absent specifically during CP. We hypothesized that the downregulation of GRIP1 during CP prevents the trafficking of the GluA2 subunit to the synapse and homeostatic plasticity in PV interneurons during CP. To test this hypothesis, we generated mice in which GRIP1 is ablated specifically in PV interneurons (PV^{GRIP1 KO}). The rectification index of AMPAR in PV neurons was decreased in post-CP PV^{GRIP1 KO} mice. In addition, homeostatic plasticity consecutive to monocular deprivation was abolished in post-CP PV^{GRIP1 KO} mice, demonstrating that GRIP1 is necessary for homeostatic synaptic plasticity in PV neurons. Our results identify CP-specific synaptic alterations in PV neurons with potential implications for OD plasticity.

Introduction

Critical periods (CPs) of postnatal development are characterized by heightened brain plasticity and allow sensory experience to exert a lasting influence on cortical circuits (Hensch, 2005). Experience-dependent neural development has been extensively studied in the mammalian primary visual cortex (V1). Following a period of monocular deprivation in juvenile animals, V1 binocular neurons lose their responsiveness to the deprived eye and become more responsive to the non-deprived eye, a process termed ocular dominance plasticity. Ocular dominance plasticity is largely restricted to a CP in early postnatal life, with a peak around postnatal days 25-30 (P25-P30) in mice (Espinosa and Stryker, 2012; Levelt and Hubener, 2012).

The key role of GABAergic innervation in the onset and closure of the CP in visual cortex has been amply documented (Hensch et al., 1998; Huang et al., 1999; Fagiolini and Hensch, 2000; Hensch, 2005). Genetic or pharmacological interventions that augment GABAergic output at synapses made by parvalbumin-expressing (PV) basket cells onto pyramidal cells enable ocular dominance plasticity in pre-CP mice (Huang et al., 1999; Fagiolini and Hensch, 2000; Di Cristo et al., 2007). Conversely, decreasing PV neuron output can reinstate ocular dominance plasticity in post-CP mice (Kuhlman et al., 2013). However, ocular dominance plasticity persists to a large extent after P35 in mice (Sawtell et al., 2003; Fischer et al., 2007; Lehmann and Lowel, 2008), while the maturation of perisomatic inhibition reaches adult levels around P35 in the mouse visual cortex (Huang et al., 1999; Di Cristo et al., 2007; Jiang et al., 2010). This disconnection between the maturation of inhibitory output and the termination of the CP in visual cortex fostered the hypothesis that the regulation of PV neurons during CP lies upstream of inhibitory output (Gu et al., 2013; Gu et al., 2016). Several lines of evidence hint at the possible role of excitatory synaptic inputs to PV neurons in the opening of CP in visual cortex: 1) monocular deprivation during CP, but not after CP, reduces the strength of excitatory synaptic responses in PV neurons without affecting intrinsic neuronal excitability (Kuhlman et al., 2013); 2) chondroitinase ABC, an enzyme that disrupts PV neuron-ensheathing perineuronal nets and was shown to extend the critical period for ocular dominance plasticity (Pizzorusso et al., 2002), attenuates the recruitment of PV neurons through their excitatory input following monocular deprivation in post-CP mice (Faini et al., 2018); 3) knocking out NARP, a pentraxin specifically enriched at excitatory inputs to PV cells, abolishes critical period plasticity in visual cortex (Gu et al., 2013); 4) Monocular deprivation during the critical period downregulates neuregulin-1(NRG1)/ErbB4 signaling in PV neurons, causing reduction of excitatory inputs to PV neurons; conversely, injections of NRG1 enhance the strength of excitatory synapses onto PV neurons, and inhibit ocular dominance plasticity during CP (Gu et al., 2016; Sun et al., 2016). However, the molecular and synaptic mechanisms driving changes at excitatory synapses onto PV neurons during CP remain unclear.

In neocortex, fast excitatory synaptic transmission is mediated by AMPA receptors (AMPA) which are heterodimers composed of the GluA1-4 subunits (Henley and Wilkinson, 2016). In general,

principal neurons operate with GluA2-containing AMPARs, although GluA2-lacking AMPARs were shown to be transiently incorporated at postsynaptic sites after long-term potentiation (Plant et al., 2006; Guire et al., 2008). In contrast, GluA2 is a minor AMPAR constituent in GABAergic interneurons (Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995). GluA2-lacking and GluA2-containing AMPARs exhibit considerably different functional properties. GluA2-containing AMPARs have a higher single-channel conductance and an arginine residue lining the pore of the channel in GluA2-containing AMPARs makes them impermeable to calcium, thereby influencing hebbian synaptic plasticity (Lamsa et al., 2007; Henley and Wilkinson, 2016). GluA2 also controls homeostatic synaptic plasticity. Synaptic scaling up in response to action potential blockade is mediated by the synaptic accumulation of GluA1- and GluA2-containing AMPARs (O'Brien et al., 1998; Iyata et al., 2008; Gainey et al., 2009; Diering et al., 2014) and requires the C-terminal domain of the GluA2 subunit (Gainey et al., 2009). The presence of an arginine residue in the pore of GluA2-containing AMPARs also makes them permeable to intracellular polyamines which in GluA2-lacking AMPARs block the pore of the channel at depolarized membrane potentials. As a consequence, current-voltage (i-v) curves display higher rectification for GluA2-lacking than for GluA2-containing AMPARs. Intriguingly, i-v curve rectification of AMPARs in PV neurons was shown to undergo transient reduction in the prefrontal cortex of juvenile rats (Wang and Gao, 2010). Similarly, i-v curve rectification of AMPAR-mediated responses to local excitatory inputs in PV neurons of the mouse visual cortex increases from P17-P19 to P32-P34 (Lu et al., 2014). These results suggest that the GluA2 content of synaptic AMPARs is developmentally regulated in PV neurons.

Glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1) is a seven-PDZ domain scaffolding protein that interacts with GluA2 through its fourth and fifth PDZ domains (Dong et al., 1997). GRIP1 is involved in trafficking and synapse accumulation of GluA2 (Osten et al., 2000) as well as the regulation of AMPAR movement between intracellular recycling compartments and the cell surface (Steiner et al., 2005; Mao et al., 2010). The interaction between GRIP1 and the C-terminal domain of GluA2 is necessary for homeostatic synaptic plasticity. Indeed decreasing GRIP1 expression or perturbing the interactions between GRIP1 and the C-terminal domain of GluA2 blocks the accumulation of AMPARs at synapses in response to decreased neuronal activity (Gainey et al., 2015; Tan et al., 2015). A transcriptomics study of gene expression in cortical PV neurons throughout postnatal mouse development showed that GRIP1 expression diminishes from P12 to P25, before increasing again from P25 to P40 (Okaty et al., 2009). Interestingly, GRIP1 is the only synaptic gene to show this pattern of transient downregulation around P25 in cortical PV neurons. Thus, similar to the rectification index of AMPARs, GRIP1 expression transiently decreases in PV neurons during postnatal development. The functional consequences of this transient decrease in GRIP1 expression are unknown.

We studied excitatory synaptic transmission to PV neurons at different stages of development in mouse V1. We found that AMPAR rectification transiently decreases during the CP in V1 PV neurons,

but not in V1 pyramidal cells, suggesting a CP-specific and PV neuron-specific downregulation of synaptic GluA2. Furthermore, monocular deprivation-elicited homeostatic synaptic plasticity in PV neurons was abolished during the CP. Using mice with a specific ablation of GRIP1 in PV neurons we demonstrated that knocking out GRIP1 reinstates AMPAR rectification and lack of synaptic homeostatic plasticity in post-CP mice. Our results identify PV neuron-specific molecular and synaptic alterations during the CP and suggest that developmental changes in GRIP1-mediated synapse targeting of GluA2 may play a role in the control of ocular dominance plasticity.

Materials and methods

Animals

Experimental procedures followed local and international regulation for the use of experimental animals. The G42 (GAD1-EGFP) mouse line was used to visually identify PV interneurons in acute brain slices throughout postnatal development (Chattopadhyaya et al., 2004). To ablate *Grip1* specifically in PV neurons, we crossed *Grip1* conditional (floxed) KO mice (B6.129(SJL)*Grip1*^{tm1Rlh}/J; JAX 024414; henceforth referred to as GRIP1-loxP or *Grip1*^{loxP/loxP}) (Takamiya et al., 2008) with PV-Cre mice (B6.Cg-Pvalb^{tm1.1(cre)Aibs}/J; JAX 012358; henceforth referred to as PV-Cre) (Hippenmeyer et al., 2005). To allow for the visual identification of PV neurons in brain slices, we crossed PV-Cre::*GRIP1*^{loxP/loxP} mice with RCE-LoxP reporter mice (Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mmjax; JAX 010701) expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the endogenous Gt(ROSA)26Sor promoter/enhancer regions and the CAG promoter (Sousa et al., 2009). All mice were on a C57Bl/6J background. Females and males were used indifferently for experiments. Mice were housed in temperature-controlled rooms with a 12-h light/dark cycle and had free access to water and standard mouse chow.

Monocular deprivation

Mice were anesthetized with a mix of Ketamine (120mg/kg)/ Xylazine (8mg/kg). The lid margins of the eye contralateral to the recorded hemisphere were trimmed and closed with two mattress sutures using 7-0 or 5-0 ethilon (Ethicon). Mice were inspected daily for general good health, signs of discomfort, and suture integrity.

Acute slice preparation

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold (0–4°C) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) solution containing (in mM): 110 Choline chloride, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 11.6 L-ascorbic acid and 3.1 sodium pyruvate. The brain was extracted and acute 250 μm coronal slices were cut in the same ice-cold solution using a vibroslicer (HM 650 V, Microm), then stored in artificial cerebrospinal fluid (ACSF)

containing the following (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, and 1 MgCl₂, continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂. Slices were incubated in ACSF at 32°C for 20 minutes and then at room temperature (20-25°C). For patch-clamp recordings, slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with ACSF (30-32°C).

Electrophysiology

All recorded neurons (PV interneurons and pyramidal cells) were located in layer IV of the visual cortex. Patch-clamp pipettes (4–6 M Ω resistance) were prepared from *borosilicate* glass (BF150-86-10; Harvard Apparatus) using a DMZ *pipette* puller (Zeitz). Voltage-clamp experiments were performed using the following intracellular solution (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 Hepes, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Na₂, 3 QX 314 (pH 7.25, adjusted with CsOH).

To study the rectification of AMPA-mediated currents, PV interneurons and pyramidal cells were recorded in the presence of GABA_Azine (10 μ M) and D-APV (50 μ M). Spermine (10 μ M) was added to the intracellular solution. The rectification index was defined as the peak amplitude of synaptic currents measured at a holding potential of +55 mV (+40 mV after correcting for junction potential) multiplied by 2 and divided by the peak amplitude of synaptic currents measured at a holding potential of -65mV (-80 mV after correcting for junction potential).

Miniature excitatory post synaptic currents (mEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV in the presence of tetrodotoxin (TTX, 0.5 μ M, Hello Bio) and Gabazine (10 μ M). At least 290 mEPSCs were recorded for each neuron.

Evoked excitatory post synaptic currents (eEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV and triggered at a frequency of 0.1 Hz in the presence of GABA_Azine (10 μ M) with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator (Iso-Flex, A.M.P.I.), positioned in layer IV at a distance of approximately 100 μ m from the recorded neuron. At least 12 consecutive sweeps were acquired for each recording and averaged. The paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the ratio of the peak amplitude of the averaged current response evoked by the second stimulation to the peak amplitude of the averaged current response evoked by the first stimulation.

Neuronal input resistance and capacitance were determined by measuring the response to a step in command potential from -65 to -75 mV.

Current clamp recordings were performed using the following intracellular solution (in mM): 105 K-gluconate, 10 HEPES, 10 phosphocreatine-Na, 0.3 Na₃GTP, 4 ATP-Na₂, 30 KCl (pH 7.25, adjusted with KOH). Intrinsic excitability was studied in the presence of the following synaptic blockers: SR95531 hydrobromide (Gabazine, 10 μ M, Hello Bio), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M, Hello Bio) and D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV, 50 μ M, Hello Bio). Spike frequency-depolarization curves were generated by injecting series of 500 ms depolarizing current steps increasing by 20 pA.

Immunoblotting

To analyze GRIP1 expression in WT (PV-Cre; GRIP1^{+/+}; RCE^{-LoxP/LoxP}) heterozygous (PV-Cre; GRIP1^{LoxP/+}; RCE^{-LoxP/LoxP}) and KO (PV-Cre; GRIP1^{LoxP/LoxP}; RCE^{LoxP/LoxP}) mice, cerebellar neurons and cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 µl/ml NP-40, 5 µg/ml sodium deoxycholate, 1 µg/ml SDS) containing Complete protease inhibitors (Roche). Equal amounts of proteins were loaded on NuPAGE 8–12% Bis-Tris gels (Thermo Fisher Scientific) and transferred to a 0.45 µm Nitrocellulose membrane in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 192 mM glycine and 200 ml/l ethanol. Membranes were blocked with 50 g/l non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS; 0.25 M Tris/0.5 M NaCl, pH 7.5)-Tween 1 ml/l (TBST) for 1 h at room temperature, incubated with primary antibodies in the same buffer for 2 h and then 1 h with IR Dye-conjugated secondary antibodies, and imaged and quantified using Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences). Primary antibodies were: rabbit anti-GRIP1 (1:200; Abcam), rabbit anti-Parvalbumin (PV27, 1:1000, Swant) and chicken anti-GAPDH (1:5000, Millipore). Secondary antibodies were: goat anti rabbit 800 (1:10000, Advansta) and goat anti-chicken 700 (1:10000, Jackson Immuno Research).

Data acquisition and analysis

Stimulus delivery and data acquisition were performed using Patchmaster software (Heka Elektronik). Signals were sampled at 20 kHz and filtered at 4 kHz. Offline analysis was performed using Clampfit (Molecular Devices) and Igor Pro (Wavemetrics). For mEPSCs analysis, recordings were filtered offline at 2 kHz and analyzed using MiniAnalysis (Synaptosoft). Data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Prism (Graphpad). The normality of data distribution was tested using Shapiro-Wilk's test. Unpaired two-tailed t-tests (for normally distributed datasets) or Mann-Whitney tests (for non-normally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons we used two-way ANOVA followed by Sidak's test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

PV neuron- and CP-specific increase in AMPAR rectification

We first set out to study the i-v curve rectification of AMPAR-mediated currents, a proxy for AMPAR GluA2 content, in layer IV PV neurons and pyramidal neurons of the visual cortex at different stages of postnatal development. Due to the relatively late expression of PV in visual cortex, reporter mice expressing GFP under the control of the PV promoter (PV-Cre; RCE-loxP mice) allow to faithfully identify PV neurons *ex vivo* only from P16 onwards. To study the full developmental trajectory of AMPAR rectification, including the late neonatal period before eye opening that takes place at P13, we used mice of the G42 line which already express GFP in a subset of PV basket cells from birth onwards (Chattopadhyaya, 2004). We performed *ex vivo* whole-cell patch clamp recordings from GFP-expressing PV interneurons (Chattopadhyaya, 2004) at 4 developmental stages: before eye opening (P7-P12), in

juvenile mice shortly before the opening of the CP (P14-P18), during CP (P24-P28) and in post-CP mice (P39-P55). To investigate i-v curve rectification, we voltage-clamped PV interneurons at -65mV and +55mV and recorded AMPAR-mediated post-synaptic excitatory currents (EPSCs) evoked by electrical stimulation of glutamatergic inputs in the presence of APV and Gabazine (SR 95531) in the bath to block NMDA and GABA_A-mediated currents, respectively (**Fig.1A**). We calculated the ratio of evoked EPSC amplitudes at -65 and +55mV to compute a rectification index (see Methods). We observed that the rectification index transiently decreases during CP, before returning to pre-CP values (P7-P12: 0.56 ± 0.04 ; P14-P18: 0.47 ± 0.03 ; P24-P28: 0.29 ± 0.03 ; P39-P55: 0.55 ± 0.06 ; One-way ANOVA; $P < 0.0001$; **Fig.1B-C**). These results suggest that the proportion of GluA2-lacking AMPARs at postsynaptic sites in PV neurons increases during the CP (McBain, 1998).

To assess whether this transient change in AMPAR rectification also occurs in principal cells, we measured i-v curves of AMPARs-mediated eEPSCs in layer IV pyramidal cells at the same developmental stages (**Fig.1D**). We observed a similarly high rectification index in the four age groups, suggesting the continuous presence of GluA2-containing Ca-impermeable AMPARs at excitatory synapses onto pyramidal cells past the early neonatal period (P7-P12: 1.28 ± 0.07 ; P14-P18: 1.28 ± 0.08 ; P24-P28: 1.22 ± 0.07 ; P39-P55: 1.20 ± 0.05 ; One-way ANOVA; $P = 0.718$; **Fig.1E-F**). These results are in line with results indicating that synaptic GluA2-lacking AMPARs in pyramidal cells are present only in neonatal rodents (Pellegrini-Giampietro et al., 1992; Pickard et al., 2000).

Paired-pulse ratio throughout postnatal development in PV neurons and pyramidal cells

GluA2-lacking AMPARs have been shown to display a moderate polyamine-dependent short-term facilitation, due to the use-dependent relief of the ion channel block by intracellular polyamines (McBain, 1998; Rozov et al., 1998). Short-term synaptic plasticity is also dependent on the probability of neurotransmitter release. We studied the paired-pulse ratio (PPR), a quantification of the postsynaptic response facilitation that is observed for the second of two stimulation pulses applied in close succession. The PPR of EPSCs evoked by two consecutive stimulations at 20Hz did not significantly change in PV neurons during the stages of development investigated (P7-P12: 0.87 ± 0.06 ; P14-P18: 0.84 ± 0.1 ; P24-P28: 0.91 ± 0.05 ; P39-P55: 0.87 ± 0.05 ; One-way ANOVA; $P = 0.915$; **Fig.2A-B**). It also remained comparable in pyramidal cells across the same development stages (P7-P12: 1.01 ± 0.07 ; P14-P18: 1.12 ± 0.04 ; P24-P28: 0.99 ± 0.05 ; P39-P55: 0.97 ± 0.04 ; One-way ANOVA; $P = 0.149$; **Fig.2C-D**).

Loss of homeostatic plasticity at excitatory synapses onto PV interneurons during CP

Increased i-v curve rectification of AMPAR-mediated currents in PV neurons from P24-P28 mice is concomitant with the transient loss of GRIP1 expression that was observed in cortical PV neurons from P25 mice using transcriptomics (Okaty et al., 2009). Since GRIP1 interacts with GluA2 to promote synaptic delivery of GluA2, we hypothesized that the transient downregulation of GRIP1 expression may

contribute to the removal of GluA2-containing AMPARs from postsynaptic sites in PV neurons during the CP. GRIP1 contributes to homeostatic synaptic plasticity through its interaction with the C-terminal domain of GluA2. Thus, a prediction of our hypothesis is that reduced GRIP1-GluA2 interactions during the CP should result in decreased homeostatic plasticity at excitatory synapses onto PV neurons. We set out to test homeostatic synaptic plasticity in PV neurons using monocular deprivation, a procedure that was shown to decrease visually-driven excitatory inputs to both pyramidal and PV neurons in the visual cortex (Kuhlman et al., 2013).

We first recorded AMPA-mediated miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSC) at three developmental stages (Pre-CP: P18; CP: P28; Post-CP: P40-P55), in the presence of tetrodotoxin (500 nM) to block action potential-mediated synaptic transmission (**Fig.3A**). mEPSC frequency and amplitude did not differ significantly across the three developmental stages considered, although we noticed trend towards decreased mEPSC amplitude in more mature mice (Frequency: P18: 18.19 ± 2.79 , P28: 16.19 ± 1.8 , P40-P55: 14.89 ± 2.05 ; One-way ANOVA $p > 0.05$; Amplitude: P18: 17.31 ± 1.81 , P28: 14.51 ± 0.81 , P45-P47: 14.91 ± 2.05 ; One-way ANOVA $p = 0.094$; **Fig.3B-E**). The rise time and decay time of mEPSC significantly declined with age (Tau: P18: 0.99 ± 0.05 , P28: 0.91 ± 0.05 , P45-P47: 0.80 ± 0.05 ; One-way ANOVA $p = 0.03$; Rise Time: P18: 0.78 ± 0.01 , P28: 0.74 ± 0.02 , P40-P55: 0.71 ± 0.02 ; One-way ANOVA $p = 0.05$; **Fig.3C-G**), in line with the gradual expression of the GluA4 subunit which confers faster kinetics to AMPARs in PV neurons (Geiger et al., 1995; Okaty et al., 2009).

Next we examined the effect of a 3-day monocular deprivation on excitatory inputs onto PV interneurons at the same developmental stages. We sutured one eye before (P14), during (P24) or after CP ($> P37$) and recorded mEPSC in layer IV PV interneurons three days later in the contralateral visual cortex *ex vivo* (**Fig.4A**). We then compared mEPSC frequencies and amplitude in the absence or presence of monocular deprivation. Intriguingly, monocular deprivation caused a robust increase in mEPSC frequency before and after but not during CP (before CP: control: 18.19 ± 2.79 ; MD: 30.41 ± 2.29 , % of control: 167.2 ± 12.60 ; ## $P = 0.0046$; CP: control: 16.19 ± 1.81 , $n = 15$ cells from 4 mice; MD: 12.10 ± 1.88 , % of control : 74.44 ± 11.58 ; after CP: control: 14.89 ± 2.05 ; MD: 23.15 ± 1.93 , % of control : 155.5 ± 12.92 , ## $P = 0.0074$; One-way ANOVA, $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; **Fig.4B-C**) while mEPSC amplitudes were unchanged by monocular deprivation in all three age groups (before CP: control: 17.31 ± 1.30 ; MD: 17.15 ± 1.27 , % of control : 99.01 ± 7.34 ; CP: control: 14.51 ± 0.81 ; MD: 14.23 ± 0.73 , % of control : 98.09 ± 5.06 ; after CP: control: 14.95 ± 0.50 ; MD: 14.55 ± 0.36 , % of control : 97.30 ± 2.44 ; One-way ANOVA, $P > 0.05$) ; **Fig.4D**). These results indicate that in the presence of reduced visual input, excitatory synapses onto PV neurons undergo a form of homeostatic synaptic plasticity that disappears during CP concomitantly with the increased rectification of AMPAR-mediated currents. This form of synaptic plasticity was unexpected. Homeostatic synaptic plasticity in pyramidal cells either in culture in response to action potential blockade, or in visual cortex following

monocular deprivation, is characterized by an increase in quantal size due to the insertion of AMPARs at postsynaptic sites, rather than an increase in mEPSC frequency. Here, increased mEPSC frequency in response to MD may reflect an increase in the number of synaptic release sites, i.e. in the number of synapses formed by glutamatergic axons onto PV neurons, or increased probability of glutamate release from existing presynaptic release site.

Generation and characterization of PV-specific GRIP1-knockout mice

To substantiate the role of GRIP1 in the AMPAR subunit composition and homeostatic synaptic plasticity in PV interneurons, we generated mice with a specific ablation of GRIP1 in PV neurons by crossing PV-Cre mice with GRIP1 floxed mice (Takamiya et al., 2008) (**Fig.5A**). To make possible to identify PV neurons in brain slices using fluorescence microscopy, we further crossed PV-Cre ; GRIP1-loxP mice with RCE-loxP mice that express EGFP under the control of the CRE recombinase, resulting in the generation of triple transgenic PV-Cre; GRIP1-loxP; RCE-loxP mice. These mice were viable, fertile and did not exhibit developmental abnormalities. In these mice Cre expression is under the control of the parvalbumin promoter which is not active during early postnatal development. As a result, GRIP1 ablation and EGFP expression did not begin until the third postnatal week as shown by the expression of EGFP only from P16 in the visual cortex, thereby preventing the adverse effects of GRIP1 ablation in PV neurons during early brain development.

The lack of appropriate GRIP1 antibodies did not allow us to verify the absence of GRIP1 expression in PV neurons from PV-Cre; GRIP1-loxP; RCE-loxP mice using immunohistochemistry. For this reason, we assessed GRIP1 expression using western blot in cerebellar tissue from wild-type (PV-Cre; GRIP1^{+/+}; RCE-loxP), heterozygous (PV-Cre; GRIP1^{lox/+}; RCE-loxP), and homozygous knock-out (PV-Cre; GRIP1^{lox/lox}; RCE-loxP) mice aged P50 (**Fig.5B**). Cerebellar tissue was chosen over cortical or whole-brain tissue because 1) GRIP1 is highly expressed in neocortical pyramidal cells (Dong et al., 1999a, 1999b) which would have masked the PV neuron-specific decrease in GRIP1 expression in neocortex; and 2) the cerebellum contains numerous PV-expressing neurons. Indeed PV is expressed by Purkinje cells and molecular layer interneurons (Schwaller et al., 2002). Western blot analysis showed that GRIP1 expression was strongly reduced in homozygous knock-out mice and moderately in heterozygous mice, in comparison to WT controls (**Fig.5B**), confirming proper deletion of *GRIP1* in PV neurons. The residual cerebellar expression of GRIP1 in knock-out mice is likely due to GRIP1 expression in cerebellar neurons that do not express PV.

Next, we investigated the consequences of the deletion of GRIP1 on the intrinsic properties of PV neurons. Whole-cell current-clamp recordings were performed from PV interneurons in PV^{GRIP1 WT} and PV^{GRIP1 KO} mice at P50 in the presence of synaptic blockers (APV, CNQX and Gabazine). Resting membrane potential, input resistance (Resting membrane potential: PV^{GRIP1 WT}: -68 ± 0.58 ; PV^{GRIP1 KO}:

-68.48 ± 0.64 ; Mann-Whitney test, $P > 0.05$; input resistance: PV^{GRIP1 WT} : 139.8 ± 9.63 ; PV^{GRIP1 KO}: 124.6 ± 7.58 ; Mann-Whitney test, $P > 0.05$; **Fig.5D**) and action potential firing evoked by increasing current were comparable in PV^{GRIP1 WT} and PV^{GRIP1 KO} mice (Firing frequencies: Two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,15)} = 0.037$; $P < 0.05$; **Fig.5E**).

Increased AMPAR rectification in PV interneurons in post-CP PV-Cre::GRIP1loxP mice

Since GRIP1 is necessary for the presence of GluA2 at postsynaptic sites (Mao et al., 2010) and downregulated in cortical PV neurons around the peak of the CP, we hypothesized that PV neuron-specific GRIP1 ablation in post-CP mice would recapitulate synaptic alterations observed during the CP. We examined the rectification of AMPAR-mediated currents in the visual cortex of post-CP mice. We observed that the rectification of AMPAR currents was significantly more pronounced in PV neurons from PV^{GRIP1 KO} mice than in PV neurons from PV^{GRIP1 WT} mice (PV^{GRIP1 WT}: 0.50 ± 0.03 ; PV^{GRIP1 KO} : 0.30 ± 0.02 ; T-test, $P < 0.0001$; **Fig6A-B**). Notably, the rectification index of AMPAR currents was similar in PV neurons from post-CP (~P50) PV^{GRIP1 KO} mice and from WT mice at the peak of the CP (P24-P28) (**Fig.1C**). These results indicate that GRIP1 controls the rectification of synaptic AMPAR currents in PV interneurons, in line with the established role of GRIP1 in the synaptic trafficking of GluA2. They further suggest that the absence of GRIP1 may have a causal role in the increased rectification of AMPAR currents at the peak of the CP. The paired-pulse ratio of evoked EPSCs was not modified in PV^{GRIP1 KO} mice (PV^{GRIP1 WT}: 0.835 ± 0.05 ; PV^{GRIP1 KO} : 0.937 ± 0.07 ; Mann-Whitney test, $P = 0.474$; **Fig.6C-D**).

Loss of homeostatic synaptic plasticity in PV interneurons in post-CP PV^{GRIP1 KO} mice

Since GluA2-GRIP1 interactions are involved in homeostatic synaptic scaling up, we investigated the consequence of ablating *GRIP1* in PV neurons on visual deprivation-induced synaptic plasticity. We recorded mEPSCs in PV interneurons in the contralateral visual cortex of post-CP (>P37) control PV^{GRIP1 WT} and PV^{GRIP1 KO} mice in the presence or absence of 3 day-monocular deprivation. mEPSC amplitude did not change in response to monocular deprivation in either genotype (PV^{GRIP1 WT}: control: 15.09 ± 0.46; MD: 15.51 ± 0.74, % of control : 102.8 ± 6.59 ; PV^{GRIP1 KO}: control: 14.74 ± 0.49 ; MD: 14.70 ± 0.66, % of control : 99.78 ± 4.50; Mann-Whitney test, $P = 0.661$; **Fig.6E-G**). In line with our results obtained in GFP+ interneurons from post-CP G42 mice, monocular deprivation significantly increased mEPSC frequency in PV^{GRIP1 WT} mice. In contrast, mEPSC frequency was unaltered by monocular deprivation in PV^{GRIP1 KO} mice (PV^{GRIP1 WT}: control: 15.65 ± 0.83 ; MD: 19.84 ± 1.32, % of control : 126.7 ± 8.46, T-Test, $P = 0.0076$; PV^{GRIP1 KO}: control: 17.81 ± 1.27 ; MD: 17.37 ± 1.35, % of control : 97.55 ± 7.59, Mann-Whitney test, $P = 0.40$; Comparison PV^{GRIP1 WT} and PV^{GRIP1 KO} : Mann-Whitney test, $P = 0.011$), demonstrating that GRIP1 is necessary for this form of homeostatic plasticity.

Discussion

We report an increased rectification of AMPAR currents at excitatory synapses onto PV neurons in mouse V1 during the CP for OD plasticity. This is concomitant with decreased GRIP1 expression in cortical PV neurons and strongly suggest that GluA2-containing AMPARs are transiently replaced with GluA2-lacking AMPARs at postsynaptic sites during the CP. Furthermore, we uncovered a new form of homeostatic plasticity in PV neurons which is characterized by increased mEPSC frequency in response to the lack of visual input, rather than increased quantal amplitude as previously described in V1 pyramidal cells. Remarkably, this form of homeostatic plasticity was present in pre-CP and post-CP mice, but absent during the critical period. Using mice with a specific ablation of *GRIP1* in PV neurons, we demonstrate that GRIP1 is necessary for homeostatic plasticity at excitatory synapses onto PV neurons. Altogether, these results suggest that diminished GRIP1 expression during the critical period prevents synaptic trafficking of the GluA2 subunit during the CP for OD plasticity, and considerably alters plastic properties at excitatory synapses. GRIP1 expression in PV neuron might therefore play a role in the opening and/or closure of the CP for OD plasticity.

Most of the gene expression trajectories in cortical PV neurons during postnatal development appear to be monotonic. This is in contrast to periods of embryonic development in which sets of genes are often transiently upregulated and then downregulated to achieve critical developmental functions (Wonders and Anderson, 2006; Nowakowski et al., 2017). The postnatal development of PV neurons is in general not exempt from this rule. Indeed the vast majority of genes that were shown to be either up- or downregulated in PV neurons from the postnatal mouse somatosensory cortex never revert back to their previous expression levels (Okaty et al., 2009). This reflects the continuous physiological maturation of PV neurons that undergo gradual changes in their morphological, intrinsic, and synaptic properties during the first four postnatal weeks to become “fast signaling devices” (Doischer et al., 2008; Okaty et al., 2009). The transient nature of the critical period for OD plasticity, which critically depends on PV neuron maturation, has been difficult to reconcile with experimental observations of the monotonic trajectories of GABAergic neuron development. In this context, it is noteworthy that grafting embryonic, medial ganglionic eminence-derived interneurons into the postnatal visual cortex reopens a CP for OD plasticity in host mice exactly at the stage of maturation that the grafted neurons should have reached at the peak of CP in donor mice (Southwell et al., 2010). A CP can be reopened even when immature interneurons are grafted in a fully mature brain (Davis et al., 2015), demonstrating that the transitory aspects of CP are critically dependent on the development of selective subtypes of GABAergic interneurons, including PV neurons. The downregulation of GRIP1 expression is the only transient change that has been observed around P25 in all synaptic genes examined in PV neurons using a transcriptomics analysis (Okaty et al., 2009). Our observations that this phenomenon is concomitant with a transitory change in AMPAR subunit composition and accompanies drastic changes in the rules of homeostatic synaptic plasticity suggest that the control of GRIP1 expression might have a role in the

opening and/or closure of CP. Interestingly, another transitory change in PV neurons has been observed at the peak of CP in V1. NRG1 is a cell adhesion molecule that is highly expressed in PV neurons especially during the critical period, after which its expression decreases. NRG1 is essential for the normal development of the nervous system, and signaling through its tyrosine kinase receptor ErbB4 has been implicated in the development of excitatory inputs onto PV neurons (Rico and Marin, 2011). A brief monocular deprivation during CP downregulates NRG1/ErbB4 signaling in PV neurons, causing retraction of excitatory inputs to PV neurons (Sun et al., 2016). Conversely, NRG1 treatment during CP induces a precocious termination of the critical period (Gu et al., 2016). Thus NRG1/ErbB4 signaling impacts CP plasticity through a mechanism that, like GRIP1 expression, changes the plasticity of excitatory inputs onto PV neurons. Whether NRG1 and GRIP1 expression in PV neurons might be under the control of similar sets of genes during CP is unknown. The recent development of single-cell RNA seq along with weighted gene co-expression network analysis in defined neuronal populations (Tasic et al., 2016; Nowakowski et al., 2017) might help identify critical gene networks that control GRIP1 expression and hence AMPAR subunit composition in PV neurons during CP.

An intriguing finding is that mEPSC frequency is increased in PV neurons from pre-CP and post-CP mice as a consequence of monocular deprivation, in the absence of change in mEPSC amplitude. While increased mEPSC frequency may result from purely presynaptic alterations, such as increased probability of glutamate release, our observation that homeostatic synaptic plasticity is absent in PV neurons from post-CP PV^{GRIP1 KO} mice indicates that postsynaptic, GRIP1-dependent mechanisms contribute to this type of plasticity. This form of homeostatic synaptic plasticity differs from the well-described homeostatic synaptic scaling in pyramidal cells. A prolonged blockade of action potential firing in cultured pyramidal neurons is typically accompanied by an insertion of AMPARs at all postsynaptic sites, leading to synaptic scaling, i.e. increased mEPSC amplitudes (Turrigiano, 2008). Synaptic scaling also takes place in pyramidal cells of the visual cortex *in vivo* in juvenile and adult mice, following visual deprivation by dark exposure, intraocular TTX injections, binocular enucleation or retinal lesions (Desai et al., 2002; Goel et al., 2006; Goel and Lee, 2007; He et al., 2012; Keck et al., 2013). However, excitatory synaptic contacts onto pyramidal cells are formed on dendritic spines while synaptic contacts onto PV neurons are made mainly on their dendritic shafts and only rarely on dendritic spines (Sancho and Bloodgood, 2018). These structural differences may entail distinct mechanisms of homeostatic synaptic plasticity in the two neuronal types. A homeostatic increase in mEPSC frequency in PV neurons might result, for instance, from the formation of additional release sites after a transient period of GRIP1-dependent synaptic upscaling. Further examinations of the synaptic ultrastructure in PV neurons after visual deprivation will be needed to resolve this issue.

How may the lack of GRIP1-dependent homeostatic synaptic plasticity in PV neurons contribute to promote ocular dominance plasticity during the critical period? The maturation of inhibition plays an

important role in the regulation of the opening of the critical period. Mice lacking the synaptic isoform of the GABA synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD65 knockout mice) have reduced GABA release, never experience a critical period and their visual cortex remains in a juvenile state. An infusion of diazepam, which potentiates GABAergic postsynaptic responses, reinstates a CP for OD plasticity in these mice. Similarly, diazepam infusion before the normal onset of CP in wild-type mice accelerates CP onset (Hensch et al., 1998; Fagiolini and Hensch, 2000). However, once established, cortical inhibition appears to prevent competitive plasticity of excitatory inputs to pyramidal cells in binocular visual cortex (Sale et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008; Harauzov et al., 2010). Indeed during CP the loss of cortical responsiveness to the deprived eye requires a rapid decrease in inhibition from PV neurons (Kuhlman et al., 2013). A recent study shows that increased engagement of somatostatin expressing interneurons during CP also contributes to V1 plasticity by 1) inhibiting pyramidal cell dendrites thereby promoting branch-specific dendritic responses and 2) inhibiting PV neurons, which in turn disinhibits the cell bodies of pyramidal cells and promotes action potential firing (Yaeger et al., 2019). These results are consistent with general plasticity rules in the adult neocortex, where plasticity is favored by disinhibition of pyramidal cell bodies (Froemke et al., 2007; Letzkus et al., 2011), and by dendritic potentiation, including localized dendritic spiking (Cichon and Gan, 2015). Reduced GRIP1-dependent homeostatic plasticity of excitatory inputs to PV neurons would thus reinforce a necessary condition for plasticity of the active input to pyramidal cells at the expense of the deprived input, by promoting the disinhibition of pyramidal cells.

Acknowledgements

MD was the recipient of fellowships from the Doctoral School Brain-Cognition-Behavior (ED3C, Sorbonne University) and from the Fondation pour la Recherche Médicale/Venite Cantemus (FDT20190400802). The project was supported by the Emergence program of Sorbonne University to CLM.

Figures and legends

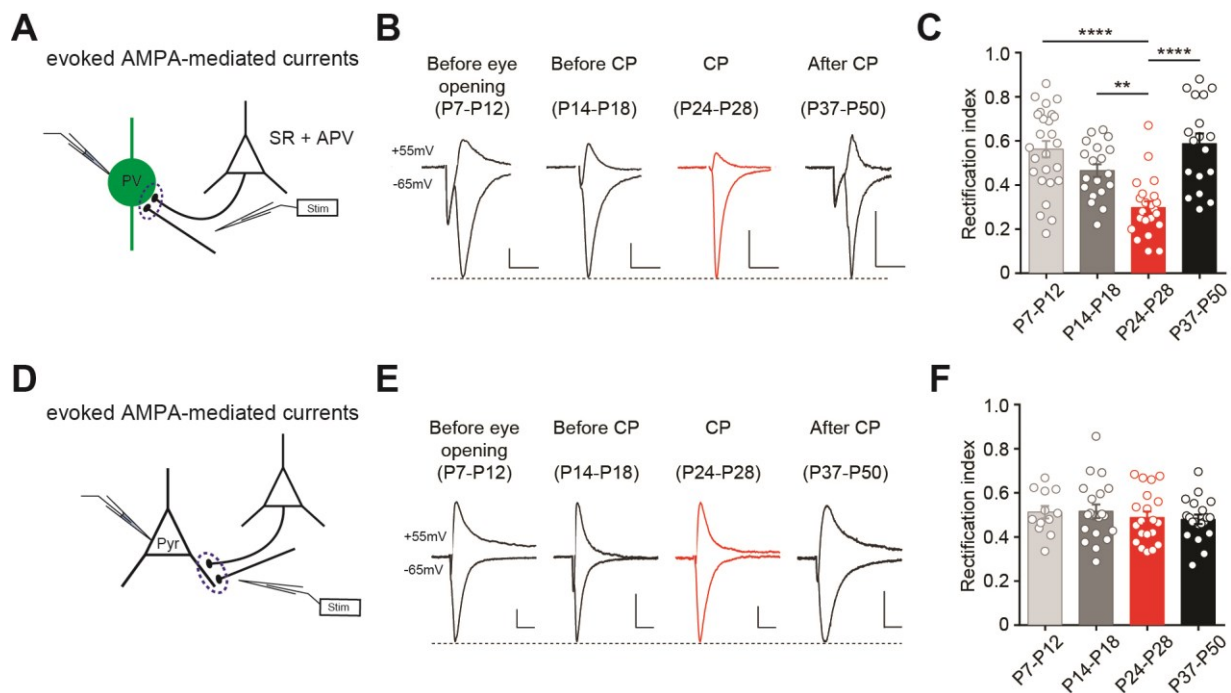


Figure 1. Different developmental trajectories of AMPAR rectification at excitatory synapses on PV neurons and pyramidal cells

A, Schematic drawing of the experimental settings. Layer IV GFP+ PV neurons were voltage-clamped in primary visual cortex (V1) slices from G42 mice in the presence of Gabazine (10 μ M) and D-APV (50 μ M) while excitatory inputs were stimulated using a monopolar electrode located in layer IV.

B, Sample trace of evoked AMPA-mediated currents recorded in PV interneurons at -65mV and +55mV at four developmental stages: in the late neonatal period before eye opening (P7-P12), before CP (P14-P18), during CP (P24-P28) and after CP (P37-P50); scale bar: 50pA/10ms.

C, The rectification index of AMPAR-mediated currents was transiently decreased during CP in PV interneurons (P7-P12, $n = 25$ cells from 6 mice; P14-P18, $n = 19$ cells from 6 mice; P24-P28, $n = 25$ cells from 8 mice; P39-P55, $n = 13$ cells from 5 mice; One-way ANOVA, $P < 0.0001$; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$).

D, Layer IV V1 pyramidal cells were voltage-clamped in the presence of Gabazine (10 μ M) and D-APV (50 μ M) while excitatory inputs were stimulated using a monopolar electrode located in layer IV

E, Sample trace of evoked AMPA-mediated currents recorded in pyramidal cells at -65mV and +55mV at the same four developmental stages. Scale bar: 50pA/10ms.

F, The RI was stable across development in pyramidal cells (P7-P12, $n = 25$ cells from 6 mice; P14-P18, $n = 19$ cells from 6 mice; P24-P28, $n = 25$ cells from 8 mice; P39-P55, $n = 13$ cells from 5 mice; One-way ANOVA, $P = 0.718$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents one recorded cell.

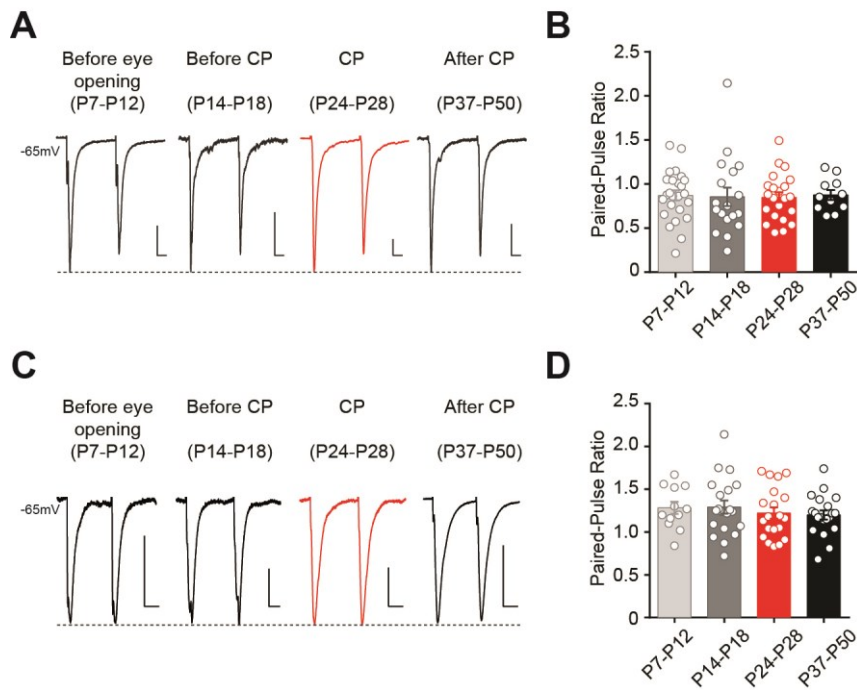


Figure 2. Short-term plasticity of excitatory synapses onto PV neurons and pyramidal cells across postnatal development in visual cortex

A, Representative examples of AMPA-mediated currents evoked in PV neurons by paired-pulse stimulation with 50ms interpulse interval at the same developmental stages as in Fig.1. Scale bar: 50pA/10ms.

B, Histograms of paired-pulse ratios (PPR) at excitatory synapses onto layer IV PV neurons in V1 across postnatal development (P7-P12, $n = 25$ cells from 6 mice; P14-P18, $n = 19$ cells from 6 mice; P24-P28, $n = 27$ cells from 8 mice; P39-P55, $n = 15$ cells from 5 mice; One-way ANOVA, $P > 0.05$).

C, AMPA-mediated currents evoked in layer IV V1 pyramidal cells by paired-pulse stimulation with 50ms interpulse interval at the same developmental stages as in Fig.1. Scale bar: 50pA/10ms.

D, Paired-pulse ratios (PPR) at excitatory synapses onto pyramidal cells across postnatal development (P7-P12, $n = 25$ cells from 6 mice; P14-P18, $n = 19$ cells from 6 mice; P24-P28, $n = 27$ cells from 8 mice; P39-P55, $n = 15$ cells from 5 mice; One-way ANOVA, $P > 0.05$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents one recorded cell.

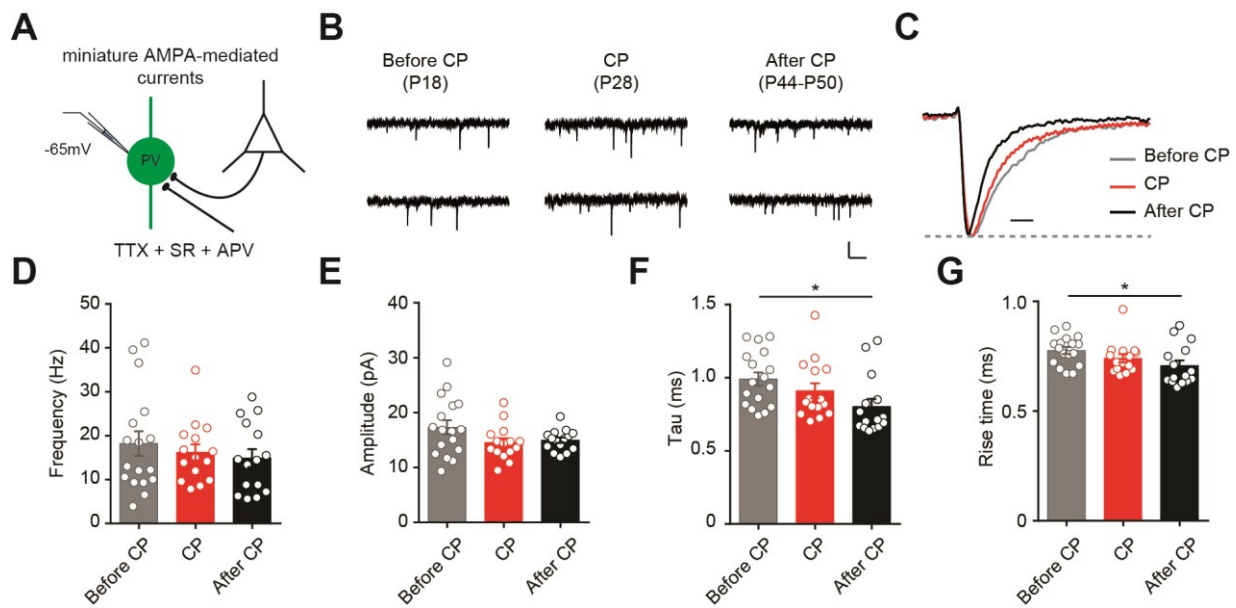


Figure 3. AMPA-mediated excitatory currents in PV neurons across postnatal development in visual cortex

A, Schematic drawing of the experimental settings. Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in layer IV GFP+ PV neurons were recorded from G42 mice in the presence of Gabazine, D-APV and TTX (500 nM) at three developmental stages.

B, Sample traces of mEPSCs recorded in PV interneurons at -65mV before CP (P18), during CP (P28) and after CP (>P40) in G42 mice. Scale bar: 50pA/200ms.

C, Sample traces of mEPSCs time course at the same at three developmental stages. Scale bar: 1ms

D, Histograms of mEPSCs frequency in PV neurons in V1 across postnatal development (P14-P18, n = 17 cells from 4 mice; P24-P28, n = 15 cells from 4 mice; P39-P55, n = 15 cells from 3 mice; One-way ANOVA, $P > 0.05$).

E, Histograms of mEPSCs amplitude in PV neurons in V1 across postnatal development (P14-P18, n = 17 cells from 4 mice; P24-P28, n = 15 cells from 4 mice; P39-P55, n = 15 cells from 3 mice; One-way ANOVA, $P > 0.05$).

F, Histograms of mEPSCs decay time constant (tau) in PV neurons in V1 across postnatal development (P14-P18, n = 17 cells from 4 mice; P24-P28, n = 15 cells from 4 mice; P39-P55, n = 15 cells from 3 mice; One-way ANOVA, $P = 0.05$).

G, Histograms of mEPSCs rise time in PV neurons in V1 across postnatal development (P14-P18, n = 17 cells from 4 mice; P24-P28, n = 15 cells from 4 mice; P39-P55, n = 15 cells from 3 mice; One-way ANOVA, $P = 0.03$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents one recorded cell.

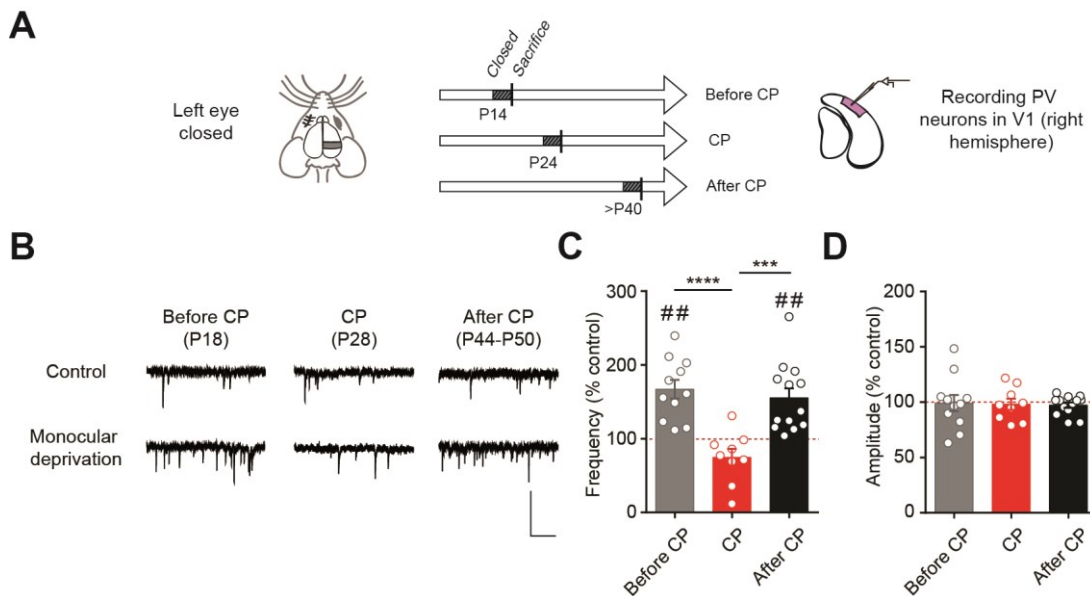


Figure 4. Homeostatic plasticity at excitatory synapses onto PV interneurons from the visual cortex before, during and after the critical period

A, Schematic drawing illustrating the experimental procedure: an eye was closed using eyelid suture either before (P14), during (P24) or after (> P40) CP. After three days of monocular deprivation (MD), the mouse was sacrificed and miniature excitatory postsynaptic currents were recorded in PV interneurons from the contralateral visual cortex *ex vivo*. In control mice the eye was left open.

B, Sample traces of mEPSCs recorded in PV interneurons at -65mV before CP (P18), during CP (P28) and after CP (>P40) in control (upper traces) and eye-deprived mice (bottom traces). Scale bar: 20pA/200ms.

C, Histograms showing increased mEPSC frequency following MD before and after CP but not during CP (before CP: control, n = 17 cells from 4 mice; MD, n = 11 cells from 3 mice; CP: control, n = 15 cells from 4 mice; MD, n = 9 cells from 3 mice; after CP: control, n = 15 cells from 3 mice; MD: n = 13 cells from 3 mice; One-way ANOVA, $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; T-test, before CP ## $P = 0.0046$, after CP ## $P = 0.0074$).

D, Histograms showing stable mEPSC amplitudes following MD at the three developmental stages examined (before CP: control, n = 17 cells from 4 mice; MD, n = 11 cells from 3 mice; CP: control, n = 15 cells from 4 mice; MD, n = 9 cells from 3 mice, after CP: control, n = 15 cells from 3 mice; MD, n = 13 cells from 3 mice; One-way ANOVA, $P > 0.05$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents one recorded cell.

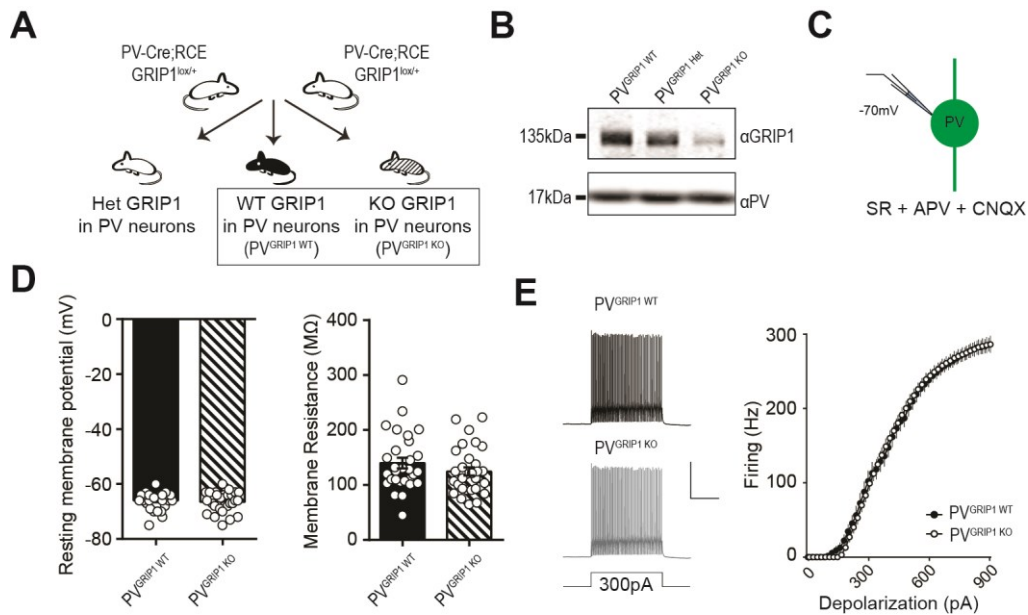


Figure 5. Characterization of mice with PV neuron-specific ablation of *GRIP1*

A, Schematic representation of the strategy used to deplete GRIP1 selectively in PV neurons. Mice expressing Cre recombinase under the promoter of the PV-encoding *Pvalb* gene (PV-Cre mice) were crossed with floxed *GRIP1* mice (*GRIP1*-loxP mice), and with reporter mice conditionally expressing EGFP (RCE-loxP mice), resulting in the generation of PV-Cre; *GRIP1*-loxP; RCE-loxP mice.

B, Western blot analysis of cerebellum lysate from WT ($PV^{GRIP1+/+}$), heterozygous ($PV^{GRIP1+Lox}$), and KO ($PV^{GRIP1Lox/Lox}$) mice aged P50. Decreased GRIP1 expression indicates successful Cre-dependent recombination in PV neurons.

C, PV interneurons were recorded in current-clamp in $PV^{GRIP1 WT}$ and $PV^{GRIP1 KO}$ mice aged P50 in presence of synaptic blockers (APV, SR, CNQX).

D, Resting membrane potential (left) and input resistance (right) were comparable in PV interneurons from $PV^{GRIP1 WT}$ and $PV^{GRIP1 KO}$ mice (Resting membrane potential: $PV^{GRIP1 WT}$, $n = 29$ cells from 3 mice; $PV^{GRIP1 KO}$, $n = 31$ cells from 3 mice; Mann-Whitney test, $P > 0.05$; input resistance: $PV^{GRIP1 WT}$, $n = 29$ cells from 3 mice; $PV^{GRIP1 KO}$, $n = 31$ cells from 3 mice; Mann-Whitney test, $P > 0.05$).

E, Sample spike trains in PV interneurons evoked by a 300 pA somatic current injection in $PV^{GRIP1 WT}$ and $PV^{GRIP1 KO}$ mice. F/I curves were similar in both genotypes ($PV^{GRIP1 WT}$: $n = 16$ cells from 3 mice; $PV^{GRIP1 KO}$: $n = 16$ cells from 3 mice; Two-way RM ANOVA, main effect, $P > 0.05$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents one recorded cell.

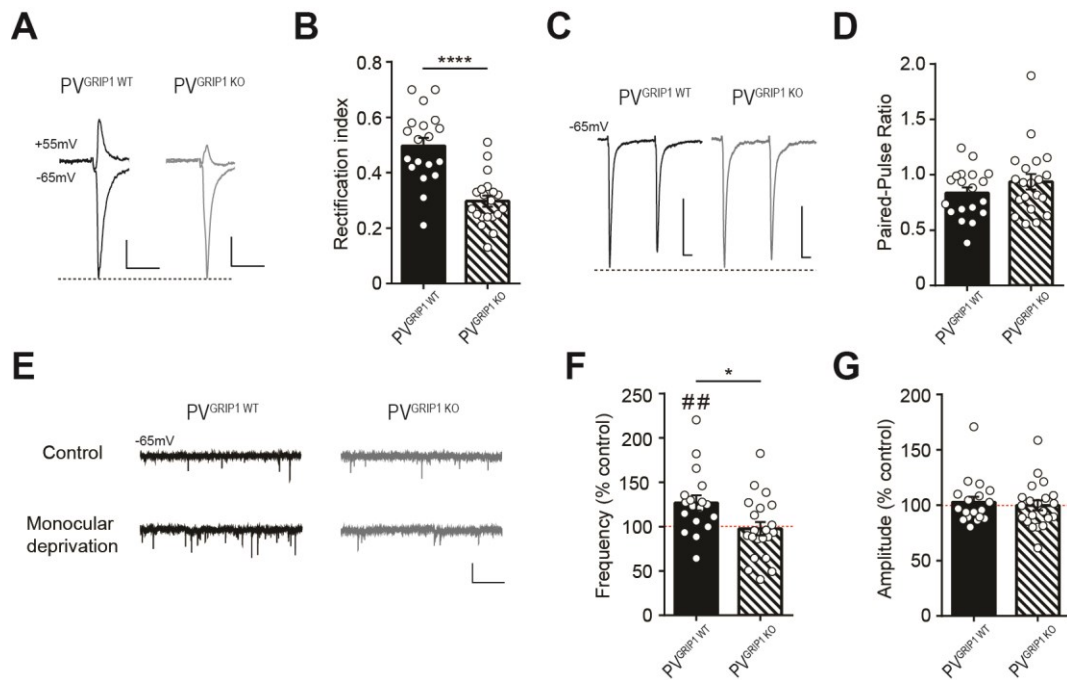


Figure 6. Effect of PV neuron-specific *Grip1* ablation on excitatory synapse properties

A, Sample trace of evoked AMPA-mediated currents recorded in EGFP+ PV interneurons at -65mV and +55mV in PV^{Grip1}WT and PV^{Grip1}KO mice after CP (>P40); scale bar: 50pA/10ms.

B, The rectification index of AMPA-mediated currents in post-CP PV^{Grip1}KO mice was strongly reduced (PV^{Grip1}WT: n = 19 cells from 3 mice; PV^{Grip1}KO: n = 20 cells from 3 mice; T-test, $P < 0.0001$).

C, Sample trace of evoked AMPA-mediated currents by paired-pulse stimulation with 50ms interpulse interval in WT and KO mice; scale bar: 50pA/10ms.

D, Paired-pulse ratios (PPR) at excitatory synapses onto pyramidal cells in post-CP PV^{Grip1}WT and PV^{Grip1}KO mice (PV^{Grip1}WT, n = 19 cells from 3 mice; PV^{Grip1}KO, n = 20 cells from 3 mice; Mann-Whitney test, $P > 0.05$).

E, mEPSCs recorded in PV neurons from post-CP PV^{Grip1}WT and PV^{Grip1}KO mice in the absence (top traces; control) or presence of 3 day-monocular deprivation (bottom traces); scale bar: 50pA/200ms.

F, Histograms showing increased mEPSC frequency as a result of MD in post-CP PV^{Grip1}WT but not in PV^{Grip1}KO mice (PV^{Grip1}WT: control, n = 24 cells from 4 mice; MD, n = 18 cells from 3 mice; PV^{Grip1}KO, n = 27 cells from 4 mice; MD, n = 21 cells from 6 mice; Mann-Whitney test, $P = 0.011$; T-test, ## $P = 0.0076$).

G, mEPSC amplitude remained comparable in response to MD in both PV^{Grip1}WT and PV^{Grip1}KO mice (PV^{Grip1}WT: control, n = 24 cells from 4 mice; MD, n = 18 cells from 3 mice; PV^{Grip1}KO: control, n = 27 cells from 6 mice; MD, n = 21 cells from 6 mice; Mann-Whitney test, $P = 0.661$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents one recorded cells.

References

- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Higashiyama, H., Knott, G. W., Kuhlman, S. J., Welker, E. and Huang, Z. J. (2004) 'Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period', *J Neurosci* 24(43): 9598-611.
- Cichon, J. and Gan, W. B. (2015) 'Branch-specific dendritic Ca(2+) spikes cause persistent synaptic plasticity', *Nature* 520(7546): 180-5.
- Davis, M. F., Figueroa Velez, D. X., Guevarra, R. P., Yang, M. C., Habeeb, M., Carathedathu, M. C. and Gandhi, S. P. (2015) 'Inhibitory Neuron Transplantation into Adult Visual Cortex Creates a New Critical Period that Rescues Impaired Vision', *Neuron* 86(4): 1055-1066.
- Desai, N. S., Cudmore, R. H., Nelson, S. B. and Turrigiano, G. G. (2002) 'Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex', *Nat Neurosci* 5(8): 783-9.
- Di Cristo, G., Chattopadhyaya, B., Kuhlman, S. J., Fu, Y., Belanger, M. C., Wu, C. Z., Rutishauser, U., Maffei, L. and Huang, Z. J. (2007) 'Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity', *Nat Neurosci* 10(12): 1569-77.
- Diering, G. H., Gustina, A. S. and Huganir, R. L. (2014) 'PKA-GluA1 coupling via AKAP5 controls AMPA receptor phosphorylation and cell-surface targeting during bidirectional homeostatic plasticity', *Neuron* 84(4): 790-805.
- Doischer, D., Hosp, J. A., Yanagawa, Y., Obata, K., Jonas, P., Vida, I. and Bartos, M. (2008) 'Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices', *J Neurosci* 28(48): 12956-68.
- Dong, H., O'Brien, R. J., Fung, E. T., Lanahan, A. A., Worley, P. F. and Huganir, R. L. (1997) 'GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors', *Nature* 386(6622): 279-84.
- Espinosa, J. S. and Stryker, M. P. (2012) 'Development and plasticity of the primary visual cortex', *Neuron* 75(2): 230-49.
- Fagiolini, M. and Hensch, T. K. (2000) 'Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex', *Nature* 404(6774): 183-6.
- Faini, G., Aguirre, A., Landi, S., Lamers, D., Pizzorusso, T., Ratto, G. M., Deleuze, C. and Bacci, A. (2018) 'Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons', *Elife* 7.
- Fischer, Q. S., Graves, A., Evans, S., Lickey, M. E. and Pham, T. A. (2007) 'Monocular deprivation in adult mice alters visual acuity and single-unit activity', *Learn Mem* 14(4): 277-86.
- Froemke, R. C., Merzenich, M. M. and Schreiner, C. E. (2007) 'A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity', *Nature* 450(7168): 425-9.
- Gainey, M. A., Hurvitz-Wolff, J. R., Lambo, M. E. and Turrigiano, G. G. (2009) 'Synaptic scaling requires the GluR2 subunit of the AMPA receptor', *J Neurosci* 29(20): 6479-89.
- Gainey, M. A., Tataavarty, V., Nahmani, M., Lin, H. and Turrigiano, G. G. (2015) 'Activity-dependent synaptic GRIP1 accumulation drives synaptic scaling up in response to action potential blockade', *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(27): E3590-9.
- Geiger, J. R., Melcher, T., Koh, D. S., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Jonas, P. and Monyer, H. (1995) 'Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS', *Neuron* 15(1): 193-204.

- Goel, A., Jiang, B., Xu, L. W., Song, L., Kirkwood, A. and Lee, H. K. (2006) 'Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience', *Nat Neurosci* 9(8): 1001-3.
- Goel, A. and Lee, H. K. (2007) 'Persistence of experience-induced homeostatic synaptic plasticity through adulthood in superficial layers of mouse visual cortex', *J Neurosci* 27(25): 6692-700.
- Gu, Y., Huang, S., Chang, M. C., Worley, P., Kirkwood, A. and Quinlan, E. M. (2013) 'Obligatory role for the immediate early gene NARP in critical period plasticity', *Neuron* 79(2): 335-46.
- Gu, Y., Tran, T., Murase, S., Borrell, A., Kirkwood, A. and Quinlan, E. M. (2016) 'Neuregulin-Dependent Regulation of Fast-Spiking Interneuron Excitability Controls the Timing of the Critical Period', *J Neurosci* 36(40): 10285-10295.
- Guire, E. S., Oh, M. C., Soderling, T. R. and Derkach, V. A. (2008) 'Recruitment of calcium-permeable AMPA receptors during synaptic potentiation is regulated by CaM-kinase I', *J Neurosci* 28(23): 6000-9.
- Harauzov, A., Spolidoro, M., DiCristo, G., De Pasquale, R., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Viegi, A., Berardi, N. and Maffei, L. (2010) 'Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity', *J Neurosci* 30(1): 361-71.
- He, K., Petrus, E., Gammon, N. and Lee, H. K. (2012) 'Distinct sensory requirements for unimodal and cross-modal homeostatic synaptic plasticity', *J Neurosci* 32(25): 8469-74.
- Henley, J. M. and Wilkinson, K. A. (2016) 'Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease', *Nat Rev Neurosci* 17(6): 337-50.
- Hensch, T. K. (2005) 'Critical period plasticity in local cortical circuits', *Nat Rev Neurosci* 6(11): 877-88.
- Hensch, T. K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M. P., Baekkeskov, S. and Kash, S. F. (1998) 'Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex', *Science* 282(5393): 1504-8.
- Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D. R. and Arber, S. (2005) 'A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling', *PLoS Biol* 3(5): e159.
- Huang, Z. J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M. F., Maffei, L. and Tonegawa, S. (1999) 'BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex', *Cell* 98(6): 739-55.
- Ibata, K., Sun, Q. and Turrigiano, G. G. (2008) 'Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing', *Neuron* 57(6): 819-26.
- Jiang, B., Huang, S., de Pasquale, R., Millman, D., Song, L., Lee, H. K., Tsumoto, T. and Kirkwood, A. (2010) 'The maturation of GABAergic transmission in visual cortex requires endocannabinoid-mediated LTD of inhibitory inputs during a critical period', *Neuron* 66(2): 248-59.
- Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P. H. and Monyer, H. (1994) 'Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression', *Neuron* 12(6): 1281-9.
- Keck, T., Keller, G. B., Jacobsen, R. I., Eysel, U. T., Bonhoeffer, T. and Hubener, M. (2013) 'Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo', *Neuron* 80(2): 327-34.
- Kuhlman, S. J., Olivas, N. D., Tring, E., Ikrar, T., Xu, X. and Trachtenberg, J. T. (2013) 'A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex', *Nature* 501(7468): 543-6.

- Lamsa, K. P., Heeroma, J. H., Somogyi, P., Rusakov, D. A. and Kullmann, D. M. (2007) 'Anti-Hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit', *Science* 315(5816): 1262-6.
- Lehmann, K. and Lowel, S. (2008) 'Age-dependent ocular dominance plasticity in adult mice', *PLoS One* 3(9): e3120.
- Letzkus, J. J., Wolff, S. B., Meyer, E. M., Tovote, P., Courtin, J., Herry, C. and Luthi, A. (2011) 'A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex', *Nature* 480(7377): 331-5.
- Levelt, C. N. and Hubener, M. (2012) 'Critical-period plasticity in the visual cortex', *Annu Rev Neurosci* 35: 309-30.
- Lu, J., Tucciarone, J., Lin, Y. and Huang, Z. J. (2014) 'Input-specific maturation of synaptic dynamics of parvalbumin interneurons in primary visual cortex', *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(47): 16895-900.
- Mao, L., Takamiya, K., Thomas, G., Lin, D. T. and Huganir, R. L. (2010) 'GRIP1 and 2 regulate activity-dependent AMPA receptor recycling via exocyst complex interactions', *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(44): 19038-43.
- Maya Vetencourt, J. F., Sale, A., Viegi, A., Baroncelli, L., De Pasquale, R., O'Leary, O. F., Castren, E. and Maffei, L. (2008) 'The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex', *Science* 320(5874): 385-8.
- Nowakowski, T. J., Bhaduri, A., Pollen, A. A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Haeussler, M., Sandoval-Espinosa, C., Liu, S. J., Velmeshev, D. et al. (2017) 'Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex', *Science* 358(6368): 1318-1323.
- O'Brien, R. J., Kamboj, S., Ehlers, M. D., Rosen, K. R., Fischbach, G. D. and Huganir, R. L. (1998) 'Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation', *Neuron* 21(5): 1067-78.
- Okaty, B. W., Miller, M. N., Sugino, K., Hempel, C. M. and Nelson, S. B. (2009) 'Transcriptional and electrophysiological maturation of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons', *J Neurosci* 29(21): 7040-52.
- Osten, P., Khatri, L., Perez, J. L., Kohr, G., Giese, G., Daly, C., Schulz, T. W., Wensky, A., Lee, L. M. and Ziff, E. B. (2000) 'Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor', *Neuron* 27(2): 313-25.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. and Zukin, R. S. (1992) 'Are Ca(2+)-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain?', *Neurosci Lett* 144(1-2): 65-9.
- Pickard, L., Noel, J., Henley, J. M., Collingridge, G. L. and Molnar, E. (2000) 'Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons', *J Neurosci* 20(21): 7922-31.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W. and Maffei, L. (2002) 'Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex', *Science* 298(5596): 1248-51.
- Plant, K., Pelkey, K. A., Bortolotto, Z. A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C. J., Collingridge, G. L. and Isaac, J. T. (2006) 'Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation', *Nat Neurosci* 9(5): 602-4.
- Rico, B. and Marin, O. (2011) 'Neuregulin signaling, cortical circuitry development and schizophrenia', *Curr Opin Genet Dev* 21(3): 262-70.
- Sale, A., Maya Vetencourt, J. F., Medini, P., Cenni, M. C., Baroncelli, L., De Pasquale, R. and Maffei, L. (2007) 'Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition', *Nat Neurosci* 10(6): 679-81.

- Sancho, L. and Bloodgood, B. L. (2018) 'Functional Distinctions between Spine and Dendritic Synapses Made onto Parvalbumin-Positive Interneurons in Mouse Cortex', *Cell Rep* 24(8): 2075-2087.
- Sawtell, N. B., Frenkel, M. Y., Philpot, B. D., Nakazawa, K., Tonegawa, S. and Bear, M. F. (2003) 'NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity in adult visual cortex', *Neuron* 38(6): 977-85.
- Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T. and Fishell, G. (2009) 'Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages', *Cereb Cortex* 19 Suppl 1: i1-10.
- Southwell, D. G., Froemke, R. C., Alvarez-Buylla, A., Stryker, M. P. and Gandhi, S. P. (2010) 'Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation', *Science* 327(5969): 1145-8.
- Steiner, P., Alberi, S., Kulangara, K., Yersin, A., Sarria, J. C., Regulier, E., Kasas, S., Dietler, G., Muller, D., Catsicas, S. et al. (2005) 'Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2', *EMBO J* 24(16): 2873-84.
- Sun, Y., Ikrar, T., Davis, M. F., Gong, N., Zheng, X., Luo, Z. D., Lai, C., Mei, L., Holmes, T. C., Gandhi, S. P. et al. (2016) 'Neuregulin-1/ErbB4 Signaling Regulates Visual Cortical Plasticity', *Neuron* 92(1): 160-173.
- Takamiya, K., Mao, L., Huganir, R. L. and Linden, D. J. (2008) 'The glutamate receptor-interacting protein family of GluR2-binding proteins is required for long-term synaptic depression expression in cerebellar Purkinje cells', *J Neurosci* 28(22): 5752-5.
- an, H. L., Queenan, B. N. and Huganir, R. L. (2015) 'GRIP1 is required for homeostatic regulation of AMPAR trafficking', *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(32): 10026-31.
- Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T. N., Kim, T. K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L. T., Sorensen, S. A., Dolbeare, T. et al. (2016) 'Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics', *Nat Neurosci* 19(2): 335-46.
- Turrigiano, G. G. (2008) 'The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses', *Cell* 135(3): 422-35.
- Wang, H. X. and Gao, W. J. (2010) 'Development of calcium-permeable AMPA receptors and their correlation with NMDA receptors in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex', *J Physiol* 588(Pt 15): 2823-38.
- Wonders, C. P. and Anderson, S. A. (2006) 'The origin and specification of cortical interneurons', *Nat Rev Neurosci* 7(9): 687-96.
- Yaeger, C. E., Ringach, D. L. and Trachtenberg, J. T. (2019) 'Neuromodulatory control of localized dendritic spiking in critical period cortex', *Nature* 567(7746): 100-104.

ARTICLE 2 : LA SUR-EXPRESSION DE LA PROTEINE DU COMPLEMENT C4 DANS LE CORTEX PREFRONTAL CHEZ LA SOURIS INDUIT DES ENDOPHENOTYPES ASSOCIES A LA SCHIZOPHRENIE

Objectif de l'étude

La schizophrénie est une pathologie neuro-développementale ayant une forte prévalence dans la population mondiale. Une association épidémiologique entre cette pathologie et le système immunitaire est aujourd'hui bien établie. En effet, les infections bactériennes ou virales chez la mère au cours des premiers mois de grossesse augmentent le risque de développer cette pathologie chez la descendance. De plus, des études génétiques à grande échelle ont permis d'associer des variants de forte expression d'un des gènes du complément, le gène *C4*, avec la schizophrénie. Un nombre de copie élevé du gène *C4*, se traduisant par une expression accrue de la protéine, est un facteur de risque de la pathologie. La cascade d'activation du complément dans lequel *C4* joue un rôle prédominant, a de multiples rôles dans l'immunité innée et acquise et est également impliquée dans l'élagage synaptique au cours du développement postnatal. Cependant, à ce jour les liens entre le système immunitaire et la schizophrénie restent très mal connus.

Cette étude a pour but d'établir un lien mécanistique entre immunogénétique et certains aspects de la physiopathologie de la schizophrénie, par le biais de la surexpression de *C4* dans le cerveau. Pour cela nous avons :

- Généré et caractérisé un nouveau modèle murin de sur-expression de *C4* dans les cellules pyramidales des couches II/III du cortex préfrontal ;
- Étudié l'impact de cette sur-expression sur les circuits glutamatergiques et GABAergiques au cours du développement ;
- Corrélié les modifications moléculaires et cellulaires avec un déficit dans une tâche comportementale de mémoire de travail, dépendante du cortex préfrontal.

Méthodes utilisées

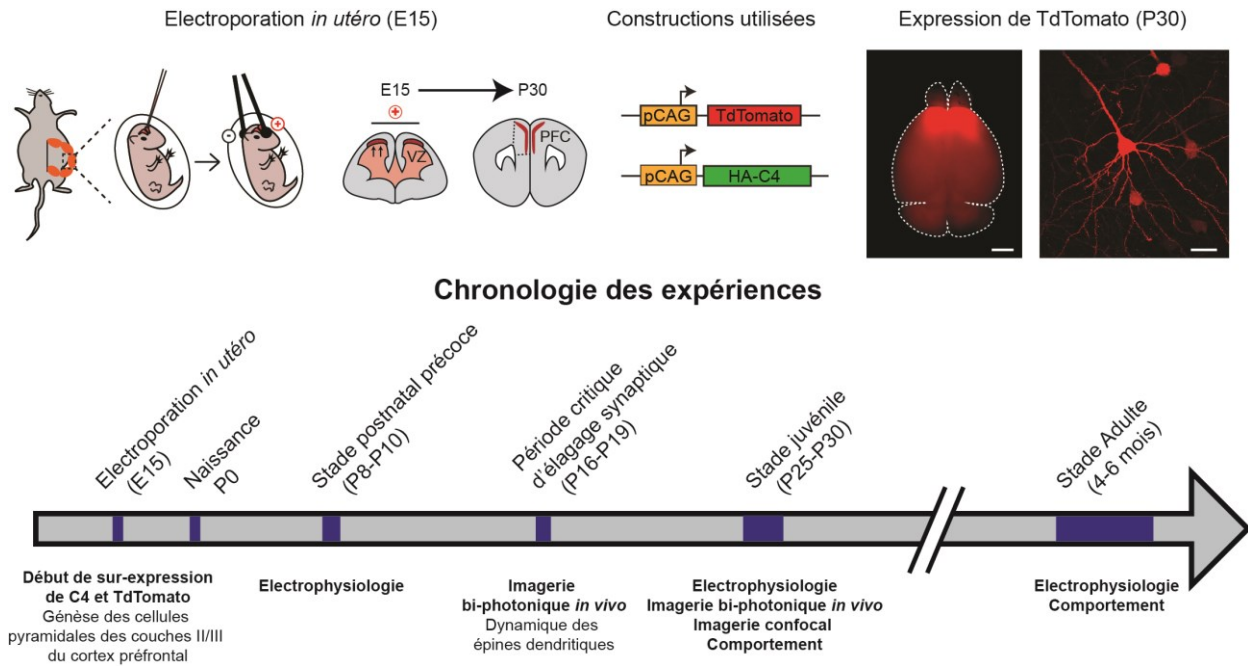


FIGURE 0 : METHODES UTILISEES ET STADES DE DEVELOPPEMENT ETUDIES

Afin de sur-exprimer le gène C4 dans les couches II/III du cortex préfrontal, nous avons utilisé l'électroporation *in utero* au stade E15 chez des souris gestantes. Cette technique nous a permis de cibler spécifiquement les cellules en division à ce stade, et qui formeront plus tard les cellules de la couche II/III du cortex préfrontal. Par la suite, nous avons utilisé des techniques d'électrophysiologie sur des tranches de cortex de souris à 3 stades de développement : post-natal précoce (P8-P10), juvénile (P25-P30) et adulte (entre 4 et 6 mois). Nous avons également utilisé l'imagerie bi-photonique *in vivo* pour suivre la dynamique de formation et d'élimination synaptique au cours du temps chez des souris jeunes dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Martin Fuhrmann au centre allemand de recherche sur les maladies neurodégénératives (DZNE) à Bonn. Nous avons enfin testé la mémoire de travail chez les souris sur-exprimant C4 grâce à des tests comportementaux fondés sur la capacité des souris à reconnaître un nombre croissant d'odeurs différentes pour accéder à une récompense sous forme de nourriture.

Résultats

La surexpression de C4 dans le cortex préfrontal chez la souris a des conséquences importantes et durables sur la physiologie des réseaux neuronaux. Nous avons notamment montré :

- Une diminution de la densité synaptique dans le cortex préfrontal chez la souris juvénile et adulte, mais pas au stade néonatal ;
- Cette perte de synapses est liée à une décroissance du turnover des épines dendritiques (formation et élimination diminuées) dans le cerveau de souris jeunes (P16-P19) ;
- Une hypofonction des récepteurs NMDA dans les cellules pyramidales ;
- Une diminution de l'excitabilité des interneurons PV, ainsi qu'une diminution de la transmission GABAergique médiée par les neurones PV vers les cellules pyramidales ;
- Un déficit de mémoire de travail chez les souris adultes.

Conclusion

En résumé, cette étude montre que la sur-expression de C4 chez la souris induit des phénotypes qui reflètent certaines des altérations corticales les plus communément associées à la schizophrénie. Ces phénotypes cellulaires sont associés à une perte de la mémoire de travail, l'un des marqueurs majeurs des dysfonctions corticales dans la schizophrénie. Ce nouveau modèle pourra donc constituer un outil pour explorer plus finement les dysfonctionnements induits au sein des circuits corticaux et déterminer les mécanismes moléculaires en aval de C4.

Complement C4 overexpression in the mouse prefrontal cortex recapitulates schizophrenia-associated endophenotypes

Mélanie Druart^{1,2,3}, Marika Nosten-Bertrand^{1,2,3*}, Stefanie Poll^{4*}, Sophie Crux^{4*}, Felix Nebeling^{4*}, Célia Delhaye^{1,2,3}, Yaëlle Dubois^{1,2,3}, Marion Leboyer^{5,6}, Ryad Tamouza^{5,6}, Martin Fuhrmann⁴, Corentin Le Magueresse^{1,2,3#}

¹INSERM UMR-S 1270, 75005 Paris, France

²Sorbonne Université, 75005 Paris, France

³Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

⁴Neuroimmunology and Imaging Group, German Center for Neurodegenerative Diseases, 53175 Bonn, Germany

⁵INSERM U955, Neuro-Psychiatrie Translationnelle, Université Paris-Est, Créteil, France.

⁶AP-HP, DMU IMPACT, Département Médical Universitaire de Psychiatrie, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France.

* Equal contribution

Correspondence: corentin.le-magueresse@inserm.fr

Summary

High expression variants of the Complement C4 gene confer susceptibility to schizophrenia. However, the link between C4 and neural endophenotypes of schizophrenia remains largely unknown. We used *in utero* electroporation to overexpress C4 in the mouse prefrontal cortex (PFC). We found reduced glutamatergic input to pyramidal cells of juvenile and adult, but not of newborn C4-overexpressing (C4-OE) mice together with decreased dendritic spine turnover in juvenile C4-OE mice. In juvenile and adult C4-OE mice NMDAR transmission was decreased, which we interpret as impaired formation or maintenance of weak excitatory synapses. Functional GABAergic transmission was reduced in C4-OE mice, in line with diminished GABA release probability from parvalbumin interneurons, lower GAD67 expression and decreased excitability in parvalbumin interneurons. These cellular abnormalities were associated with working memory deficits. Our results substantiate the causal relationship between immunogenetic risk factors and cortical endophenotypes of schizophrenia and provide insight into the underlying cellular mechanisms.

Introduction

Schizophrenia (SZ) is a frequent and severe psychiatric disorder with a life-long course. The symptoms of SZ are generally grouped into three main categories: positive symptoms that include delusions and hallucinations, negative symptoms that refer to impaired motivation and social withdrawal, and cognitive dysfunctions that comprise working memory deficits. Cognitive and negative symptoms of SZ are especially difficult to treat and are thought to reflect cortical dysfunctions in patients (Mouchlianitis et al., 2016).

Several robust neural endophenotypes have been identified in the cortex of schizophrenic patients. Firstly, a loss of dendritic spine density has been observed in upper cortical layers in the postmortem brain of schizophrenic patients and is thought to reflect increased synaptic pruning in adolescence (Glantz and Lewis, 2000). Spine loss is paralleled by excessive grey matter loss in patients which is also attributed to exacerbated neuropil pruning (Prasad et al., 2018; Wright et al., 2000). Second, decreased NMDA receptor (NMDAR)-mediated neurotransmission in SZ has been inferred from at least four lines of evidence (Balu, 2016): i) NMDAR antagonists such as PCP and ketamine induce schizophrenic-like behaviors; ii) the expression of NMDAR subunits is reduced in *post-mortem* brain tissue from schizophrenic patients iii) auto-antibodies against NMDA receptors cause clinical symptoms of SZ; iv) *GRIN2A*, an NMDAR subunit-encoding gene, has been associated with SZ in recent large-scale genome-wide association studies (GWAS). Third, multiple deficits in GABAergic circuits have been identified in SZ. Abnormalities in GABAergic networks include reduced GABA concentration in the brain of schizophrenic patients, decreased expression of GAD67, an enzyme responsible for GABA synthesis, and abnormalities at parvalbumin-expressing (PV) neuron-pyramidal cell synapses (Dienel and Lewis, 2019). What causes these distinct alterations, and how they relate to each other, is poorly understood.

The role of immune processes in SZ has been long suspected. Epidemiological data indicate that both infections and autoimmune diseases are important risk factors of SZ (Benros et al., 2012) and GWAS identified genes involved in immune and in autoimmune processes that are associated with SZ (Purcell et al., 2009; Ripke et al., 2014; Shi et al., 2009; Stefansson et al., 2009).

The major GWAS locus in SZ lies within the major histocompatibility complex (MHC) locus on chromosome 6 (Ripke et al., 2014). This includes the C4 gene which consists of C4A and C4B gene copy number variations and insertion/deletion of the human endogenous retrovirus K (HERVK). A detailed analysis of this locus showed a strong relationship between the genetic diversity of the C4 region and SZ (Sekar et al., 2016). In particular, the presence of several copies of C4A with HERVK insertions correlated with higher C4A expression and increased risk of developing SZ. The complement pathway is a central determinant of synaptic pruning, a developmental process in which the synaptic connections between neurons are eliminated in the brain from childhood until early adulthood (Stevens et al., 2007). Thus, the identification of C4A as a risk factor in SZ established a link between complement-mediated synaptic pruning and synapse loss in SZ, a characteristic feature of the disease which had long been

hypothesized to reflect excessive synapse elimination in adolescence (Feinberg, 1982). The correlation between C4 expression and synaptic pruning is further supported by magnetic resonance spectroscopy in SZ patients stratified according to C4 genetics. Both C4A and C4B gene copy numbers positively correlated with neuropil contraction, which is often considered as a mesoscale correlate of developmental synapse elimination (Prasad et al., 2018). Moreover, C4A gene copy numbers within the human complement component 4 locus are associated with increased neuronal complement deposition and microglial synapse uptake in cocultures of human iPSC-derived neurons and microglial cells (Sellgren et al., 2019).

In mice, the C4 gene presents homology with both the C4A and C4B genetic motifs of the human C4 gene locus. Connectivity between the retina and the visual thalamus is impaired in C4 knock-out mice (Sekar et al., 2016), indicating that the mouse C4 protein participates in synaptic pruning and therefore has a physiological function that encompasses the putative effect of human C4A, and possibly C4B, on synapse remodeling. It has been hypothesized that high C4 expression may result in increased synaptic pruning in upper layers of the neocortex (Sekar et al., 2016), where spine density is decreased in the brain of schizophrenic patients (Glantz and Lewis, 2000). This hypothesis, however, has not been tested experimentally. Furthermore the relationship between C4 and other SZ-associated cortical endophenotypes, such as reduced NMDA receptor-mediated transmission, loss of GAD67 expression and altered GABAergic synapses remains unknown.

Here we set out to overexpress complement C4 in layer II/III pyramidal cells of the mouse prefrontal cortex using *in utero* electroporation. We show that PFC-targeted C4 overexpression recapitulates several key cortical biomarkers of SZ, including decreased number of excitatory synapses and reduced NMDA receptor function in pyramidal cells. Interestingly, dendritic spine loss was accompanied by decreased spine formation. We also report several abnormalities in GABAergic circuits in C4-OE mice which are consistent with the alterations of GABAergic markers seen in the brain of SZ patients. Finally, our results reveal that the selective overexpression of C4 in PFC layer II/III is sufficient to impair working memory, which is reminiscent of SZ-associated cognitive deficits.

Results

Model of C4-overexpressing (C4-OE) mice

C4 is expressed by neurons (Sekar et al., 2016). C4 expression was detected in the embryonic brain of both mice and humans, and persists in adulthood (Allen Brain Atlas; <https://portal.brain-map.org/>) (Miller et al., 2014). To mimic the elevated neuronal expression of C4 starting from neurogenesis in human patients, we selectively overexpressed C4, the mouse homolog of the human C4A and C4B genes, in layer II/III of the prefrontal cortex (PFC) using *in utero* electroporation in C57Bl/6J mice. *In utero* electroporation allows to selectively target progenitor cells in the ventricular zone that will further become layer II/III pyramidal cells

(**Figure 1A**). We chose to target PFC layer II/III because (i) PFC dysfunctions have been repeatedly associated with SZ and (ii) decreased spine density was found to be particularly prominent in layer III of the PFC in SZ patients (Glantz and Lewis, 2000). We used a pCAG promoter to ensure potent and constant C4 expression throughout development. To identify C4-OE neurons using immunohistochemistry, an HA tag was added at the N-terminal end of the C4 construct. In addition, we co-electroporated the C4 construct with a tdTomato-expressing construct, in order to enable the identification of C4-expressing, tdTomato-positive (tdTom⁺) neurons in acute brain slices (**Figure 1B-C**). To ensure that most tdTom⁺ neurons indeed overexpress C4, we co-electroporated the C4 construct and the tdTomato construct with a 4:1 ratio. Immunohistochemistry for HA and TdTomato confirmed that 98.7 ± 1.8 % of tdTom⁺ neurons also express C4 (**Figure 1D-E**). Control mice were electroporated with the tdTomato construct only. We observed no neuronal mispositioning in C4-OE mice, suggesting the absence of major migration defect (**Figure S1**).

Loss of excitatory synapses in C4-OE neurons from juvenile and adult, but not neonatal mice

We first evaluated passive and active cellular properties in tdTom⁺ layer II/III pyramidal cells using whole-cell patch-clamp *ex vivo*. The firing properties, membrane resistance, cell capacitance and resting membrane potential were similar in control and C4-OE neurons (**Figure S2; table S1**).

We next examined excitatory synaptic transmission at three developmental stages. The frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in control tdTom⁺ cells markedly increased from early postnatal development (age P9-P10) to the juvenile stage (P25-P30), consistent with increased synapse generation, before decreasing from the juvenile stage to adulthood (P150-P220), in line with synapse elimination in the maturing cortex (**Figure 2A-B; table S1**). Indeed the paired-pulse ratio of evoked EPSCs, a measure which is sensitive to alterations in presynaptic release probability, did not change significantly in control tdTom⁺ cells throughout development (**Figure 2C-D; table S1**). This confirms that the developmental modulation of mEPSC frequency reflects changes in synapse formation and/or elimination rather than release probability alterations. Interestingly, mEPSC frequency was similar in control and C4-OE mice at P9-P10, but was significantly lower in C4-OE mice in juvenile and adult mice (**Figure 2B**; frequency: two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,105)} = 17.4$, juvenile: Sidak's post-hoc test $P < 0.0001$; adulthood: Sidak's post-hoc test, $P < 0.05$; **table S1**). The paired-pulse ratio of evoked EPSCs did not differ between C4-OE and control mice in any age group (**Figure 2D**; two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,105)} = 0.033$, $P = 0.86$; **table S1**). We also observed a decrease in mEPSC amplitude from early development to the juvenile stage, but this was comparable in control and C4-OE mice (**Figure 2B**; two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,105)} = 0.72$, $P = 0.399$; **table S1**). Taken together, these results indicate that C4 overexpression decreases excitatory synapse formation, or increases synapse elimination, in juvenile and adult but not in neonatal mice.

C4 overexpression results in diminished formation and elimination of spines in juvenile PFC

Dendritic spine loss in layer III pyramidal cells is an endophenotype of SZ (Glausier and Lewis, 2013). To establish whether decreased functional synapse number correlates with reduced spine density, we imaged dendritic spines of tdTom+ pyramidal cells in layer I/II of the prefrontal cortex using *in vivo* 2-photon imaging in juvenile (P30) mice (**Figure 2E**). We found a substantial spine density decrease in C4-OE neurons (**Figure 2F-G**; control: n = 10 mice; C4-OE: n = 7 mice; T-test, $P = 0.002$; **table S2**). These results suggested that the reduction in spine density in C4-OE neurons is due to imbalanced spine dynamics (gain and loss) occurring prior to P30. Therefore, we performed dynamic imaging studies in mice aged P15-P18, which corresponds to a period of heightened structural synaptic plasticity (Coiro et al., 2015; Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005). Here, we imaged dendrites twice at a 4-hour interval (**Figure 3A**) to study fast spine kinetics at this stage of active synaptic reorganization. Similar to the P30 cohort, C4-OE neurons in P15-P18 mice displayed a robust decrease in spine density (**Figure 3B-C**; control: n = 5 mice; C4-OE: n = 7 mice; T-test, $P < 0.0001$; **table S2**). While the overall spine density within the experimental groups did not change over the course of 4 h (**Figure 3D-E**; control: n = 5 mice; C4-OE: n = 7 mice; two-way RM ANOVA, main effect, $F_{(1,10)} = 0.083$, $P = 0.78$; **table S2**), C4 overexpression had a strong effect on the structural plasticity of single spines; first, C4-OE neurons formed fewer stable spines (**Figure 3F**; control: n = 5 mice; C4-OE: n = 7 mice; T-test, $P = 0.0007$; **table S2**). Second, C4-OE neurons showed decreased numbers of both gained and lost spines (**Figure 3G-H**; control: n = 5 mice; C4-OE: n = 7 mice; T-test, gained: $P = 0.0018$; lost: $P < 0.0001$; also see **Figure 3F**) resulting in an overall significantly reduced turnover of dendritic spines (**Figure 3I**; Mann-Whitney test, $P = 0.0039$; **table S2**). Here we show that C4 overexpression results in diminished formation and elimination of spines in juvenile PFC *in vivo*. It is noteworthy that this result is at odds with the prevalent hypothesis of increased synaptic elimination as a result of elevated complement activity in the developing schizophrenic cortex.

NMDAR hypofunction in C4-OE pyramidal cells

Several lines of evidence point to NMDAR hypofunction in SZ (Balu, 2016). To investigate NMDAR-mediated transmission in the cortex of C4-OE mice, we measured the AMPA/NMDA ratio of evoked EPSCs in tdTom+ cells. The AMPA/NMDA ratio was comparable in control and C4-OE neonates, but was significantly increased in juvenile and adult C4-OE mice (**Figure 4A-B**; two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,108)} = 18.95$, $P < 0.0001$; juvenile and adult mice: Sidak's post-hoc test, $P < 0.001$; **table S1**). The amplitude of mEPSCs, which is determined by the number of AMPAR per synapse, was not altered by C4 overexpression at any age examined (**Figure 2B**; **table S1**). Furthermore, the decay time constant of NMDAR-mediated currents, which depends on the subunit composition of NMDA receptors, was similar in control and C4-OE mice of the same age group (**Figure 4C**; two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,108)} = 0.49$, $P = 0.48$; **table S1**). Therefore, the increased AMPA/NMDA ratio in C4-OE neurons results from reduced NMDAR-mediated currents. The development of NMDAR hypofunction in C4-OE mice coincided with functional synapse loss, which suggests that C4 overexpression may selectively

impair the formation or maintenance of “weak” (high NMDAR, low AMPAR) synapses in juvenile mice. Increased AMPA/NMDA ratio has been repeatedly associated with altered synaptic expression of the AMPAR GluA2 subunit (Bellone and Luscher, 2006; Wang and Gao, 2010) that controls the calcium permeability of AMPARs (Geiger et al., 1995; Hollmann et al., 1991). Therefore we tested the rectification index of synaptic AMPAR-mediated currents which is sensitive to the presence of the GluA2 subunit. We found that the rectification index of evoked AMPAR currents was significantly decreased in juvenile and adult C4-OE mice, but not in pups (**Figure 4D-E**; two-way ANOVA, main effect, $F_{(1,112)} = 18.1$, $P < 0.0001$; juvenile: Sidak’s post-hoc test, $P < 0.001$; adulthood: Sidak’s post-hoc test, $P < 0.05$; **table S1**). This suggests that synaptic AMPARs in C4-OE neurons show reduced GluA2 subunit content, likely becoming more calcium-permeable, concomitantly with NMDAR hypofunction.

C4 overexpression results in reduced GABAergic transmission

Abnormalities in GABAergic networks constitute another hallmark of the schizophrenic cortex. They include synaptic abnormalities as well as decreased expression of activity-dependent markers such as GAD67 in parvalbumin-expressing (PV) interneurons. We examined spontaneous inhibitory synaptic transmission in tdTom+ pyramidal cells from juvenile mice using a high chloride intracellular solution to maximize the signal/noise ratio. Both the frequency and amplitude of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) were significantly decreased in C4-OE neurons (**Figure 5A-B**; control: $n = 16$ cells from 4 mice; C4-OE: $n = 16$ cells from 6 mice; frequency: Mann-Whitney test, $P = 0.0004$; amplitude: T-test, $P = 0.0003$; **table S1**). Reduced mIPSC frequency may in part result from decreased release probability from GABAergic terminals, which has been reported in the maternal immune activation (MIA) model of SZ (Canetta et al., 2016). We investigated GABA release probability using a similar protocol. IPSCs were evoked by four consecutive electrical stimuli delivered at 20 Hz while holding voltage-clamped tdTom+ pyramidal cells at a membrane potential of +10 mV (**Figure 5C**). Paired-pulse depression was slightly, though not significantly, reduced in C4-OE neurons (**Figure 5D**; control: $n = 29$ cells from 3 mice; C4-OE: $n = 37$ cells from 3 mice; two-way ANOVA repeated measures, main effect, $F_{(1,64)} = 2.99$, $P = 0.089$; **table S1**). In the MIA model, altered release probability from PV neurons, but not other types of interneurons, has been described. We reasoned that selectively activating the PV neuron-pyramidal cells synapse in C4-OE mice may allow to uncover significant differences in GABA release probability. To test this hypothesis, we selectively expressed Channelrhodopsin2 (ChR2) fused to YFP in PV-expressing interneurons using timed matings between lox-STOP-lox ChR2 mice and PV-Cre mice (**Figure S3A**). Pregnant females were electroporated at embryonic stage E15 either with a tdTomato-encoding plasmid (control group) or with tdTomato + C4 (C4-OE condition). To verify the specificity of ChR2 expression, we patched-clamped ChR2-YFP+ cells in the control group and recorded their firing pattern in response to a 500 ms pulse of blue light (470 nm). All tested ChR2-YFP cells exhibited the characteristic fast-spiking firing pattern of PV interneurons ($n = 3$; **Figure S3B**), in line with previous results demonstrating the specificity of ChR2-YFP expression in PV-Cre:: lox-STOP-lox

Chr2 mice (Canetta et al., 2016; Ortolani et al., 2018). Next we assessed paired-pulse depression of PV neuron IPSCs in pyramidal cells using four consecutive blue light pulses (0.5 ms) delivered at 20 Hz (**Figure 5E**). We found that PV neuron-pyramidal cell synapses in C4-OE mice displayed significantly reduced paired-pulse depression, indicating decreased GABA release probability (**Figure 5F**; control: n = 43 cells from 4 mice; C4-OE: n = 30 cells from 3 mice; two-way ANOVA repeated measures, main effect, $F_{(1,71)} = 6.85$, $P = 0.014$; third pulse/first one: Sidak's post-hoc test, $P < 0.05$; **table S1**). Thus, similar to the MIA model, decreased release probability from PV neurons contributes to diminish GABAergic transmission onto pyramidal cells in C4-OE mice.

C4 overexpression causes reduced input resistance, decreased excitability, and lower GAD67 expression in PV neurons

The availability of presynaptic GABA is one of the factors determining release probability. GAD67 is an enzyme responsible for basal cortical GABA synthesis (Asada et al., 1997), and reduced expression of GAD67, especially in PV cells, has been found in *post-mortem* cortical tissue from schizophrenic patients in multiple studies (Dienel and Lewis, 2019; Hashimoto et al., 2003). In mouse models, reducing GAD67 expression in PV neurons has been shown to decrease both the frequency of spontaneous inhibitory currents in layer 5 PFC pyramidal cells (Brown et al., 2015) and the amplitude of evoked GABAergic currents in hippocampal pyramidal cells (Fujihara et al., 2015). Therefore we measured GAD67 expression in PV interneurons located in the vicinity of control or C4-OE tdTom+ pyramidal cells. As GAD67 is expressed in both presynaptic terminals and in the cell soma, we chose to quantify GAD67 expression in the clearly delineated cell soma (**Figure 6A**) (Canetta et al., 2016). While GAD67 expression varied substantially across PV neurons, we found that the distribution of PV cells was skewed towards lower GAD67 expression in C4-OE mice (**Figure 6B**; Kolmogorov-Smirnov test, $P = 0.0002$; control 950 cells from 6 mice, C4-OE: 949 cells from 6 mice; **table S2**). Moreover GAD67 expression in PV cells was on average significantly lower in C4-OE mice than in control mice (**Figure 6C**; Mann-Whitney test, $P < 0.0001$; control: 950 cells from 6 mice, C4-OE: 949 cells from 6 mice; **table S2**). These results suggest that reduced GABA synthesis may contribute to the deficit in GABAergic transmission at PV neuron – pyramidal cell synapses in C4-OE mice. It has been proposed that reduced expression of activity-dependent biomarkers, including GAD67, in PV neurons, may result from decreased PV neuron activity in the schizophrenic cortex (Dienel and Lewis, 2019). However, this hypothesis has received little experimental support. Therefore we decided to study PV neuron properties in more detail. We first investigated the number and distribution of PV neurons in the cortex of C4-OE juvenile mice and found that they were not altered (**Figure S3**; **table S2**). We then electroporated C4 + tdTomato or tdTomato alone in PV-Cre::RCE mice which express EGFP selectively in PV neurons. We patch-clamped EGFP+ PV neurons located in the vicinity of tdTom+ pyramidal cells, in control and C4-OE mice aged P25-P30 (**Figure 6D**). The intrinsic excitability of PV neurons, which is defined as the propensity to fire action potentials when subjected to an input current in the presence of drugs blocking synaptic transmission,

was significantly diminished in the C4-OE condition (**Figure 6E**; control: $n = 20$ cells from 3 mice; C4-OE: $n = 21$ cells from 4 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,33)} = 6.82$, $P = 0.013$; **table S3**). This was associated with lower input resistance of PV cells, in the absence of significant changes in cell capacitance or resting membrane potential, suggesting that the change in PV neuron intrinsic excitability results from decreased cell resistance (**Figure 6F**; control: $n = 20$ cells from 3 mice; C4-OE: $n = 21$ cells from 4 mice; Input resistance: Mann-Whitney test, $P = 0.0024$; **table S3**). Thus, lower input resistance in PV neurons may cause decreased PV neuron excitability, thereby contributing to lower GAD67 expression.

C4 overexpression results in increased excitatory input on PV neurons

Since synaptic inputs also contribute to the overall excitability of neurons, we recorded miniature excitatory and inhibitory inputs (mEPSCs and mIPSCs) in EGFP+ PV neurons. To our surprise, we observed a significant increase in mEPSC frequency, and a trend towards increased mEPSC amplitude, in the C4-OE condition (**Figure 7A-B**; control: $n = 18$ cells from 5 mice; C4-OE: $n = 16$ cells from 6 mice; frequency: Mann-Whitney test, $P = 0.018$; amplitude: Mann-Whitney test, $P = 0.069$; **table S3**). This was not due to presynaptic alterations, since the paired-pulse ratio of evoked EPSCs in PV neurons remained unchanged, and thus points to an increased number of excitatory synapses onto PV neurons in C4-OE mice (**Figure 7C-D**; control: $n = 24$ cells from 4 mice; C4-OE: 21 cells from 3 mice; T-test, $P = 0.25$; **table S3**). Neither the frequency nor the amplitude of mIPSCs was changed following C4 overexpression in pyramidal cells (**Figure 7E-F**; control: $n = 18$ cells from 4 mice; C4-OE: 13 cells from 4 mice; frequency: T-test, $P = 0.37$; amplitude: T-test, $P = 0.31$, **table S3**). Thus, in contrast to C4-OE pyramidal cells, PV neurons exhibit increased excitatory input and unchanged inhibitory input in C4-OE mice.

C4 overexpression results in working memory deficits

Finally we investigated whether the changes that we observed at the cellular level may result in long-lasting behavioral alterations in C4-OE mice. In SZ, cognitive disturbances are typically present before the onset of psychosis and are the best predictor of long-term functional outcome. In particular, deficits in working memory are central to the cognitive impairments and appear to result, at least in part, from abnormalities in PFC function (Silver and Feldman, 2005; Silver et al., 2003). Therefore we asked whether increased C4 expression in the PFC alters working memory. Since classical working memory tests rely on locomotion, we first verified that control and C4-OE mice showed comparable spontaneous locomotor activity in an actimeter (**Figure 8A**; **Table S4**). Spontaneous activity of C4-OE mice also did not differ from control mice in the open field assay (**Figure 8B**; **Table S4**). We then used two different tests of working memory, namely the odor span test and the spatial span test. C4-OE mice performed as well as control mice during the acquisition of the non-matching to sample task, in which mice learned to associate the presence of a new odor and food reward (**Figure 8C-E**; control: $n = 15$ mice; C4-OE: $n =$

14 mice; two-way RM, main factor: $F_{(1, 135)} = 0.35, P = 0.56$; **table S4**). In the subsequent span tests, however, when mice had to remember an increasing number of odors or positions to obtain the reward, C4-OE mice exhibited reduced working memory capacity compared to control mice (**Figure 8 F-I**; control: $n = 15$ mice; C4-OE : $n = 14$ mice; Odor span: Mann-Whitney test, $P = 0.0022$; Spatial span: Mann-Whitney test, $P = 0.045$; **table S4**). Taken together, these results indicate that working memory is impaired in C4-OE mice, in line with neuronal abnormalities in PFC networks.

Discussion

GWAS have provided unprecedented identification of predisposing genetic risk factors in SZ. High expression variants of the C4 gene account for the strong association between SZ and a genomic region within the MHC locus on Chromosome 6 in GWAS (Ripke et al., 2014; Sekar et al., 2016). Here we show that overexpressing C4 in the mouse PFC recapitulates several cortical biomarkers of SZ, including synapse loss, decreased NMDAR-mediated neurotransmission, impaired function of GABAergic circuits, and deficits in working memory. Furthermore we demonstrate that C4-OE mice can be used to study the neurobiological mechanisms underlying several distinct brain alterations pertaining to SZ.

Complement: an effect on synapse elimination or synapse formation?

We report reduced excitatory neurotransmission and decreased spine density in C4-OE mice. It is generally assumed that synapse loss during postnatal development reflects the pruning of synapses i.e. their elimination by processes that involve microglial and astrocytes (Chung et al., 2013; Schafer et al., 2012), and that excessive synaptic pruning in SZ contributes to reduce spine density in PFC (Feinberg, 1982; Presumey et al., 2017). The role of the complement system in these developmental changes in neuronal connectivity has been amply demonstrated. For example, mice deficient for key components of the classical complement cascade, including C4, exhibit an excess of neuronal connectivity during development (Chu et al., 2010; Sekar et al., 2016). We expected, in line with the hypothesis that complement pathways mediates synapse elimination, to find increased spine elimination in C4-OE neurons using dynamic spine imaging *in vivo*. Yet our results clearly show the opposite, namely that spine loss correlates with both decreased spine formation and decreased spine elimination in C4-OE neurons. These unexpected results point towards an underappreciated role of complement in regulating spine formation, which may be due to the absence of dynamic imaging studies in mice lacking complement genes. It is interesting that recent dynamic imaging results on the ultrastructure of microglia-neuron contacts in developing hippocampal organotypic slices show the induction of postsynaptic spine head filopodia by microglia (Weinhard et al., 2018). While the role of complement in this phenomenon has not been investigated, these together with our results suggest that the role of microglia and complement in spine density decrease at adolescence may be less straightforward than anticipated. It is also noteworthy that functional synapse loss in the C4-OE model is not present at the early stages of

postnatal development, but only appears between P10 and P25, a period of strong synaptic remodeling in the cortex. Thus, the later stages of spine formation and maintenance, but not the initial stages, seem to be particularly sensitive to C4 overexpression. This may be relevant for the pathophysiology of SZ, a disorder in which even the earliest prodromal symptoms occur at a relatively late stage of postnatal development.

Decreased NMDAR-mediated transmission coincides with synapse loss in C4-OE pyramids

While NMDAR-mediated glutamatergic transmission cannot be directly assessed in the brain of schizophrenic patients, several indirect lines of evidence point to NMDAR hypofunction in SZ (Balu, 2016). Here we demonstrate that NMDAR-mediated transmission is reduced in C4-OE pyramidal cells in juvenile and adult mice, but not in younger animals. It is striking that the reduction in NMDAR-mediated transmission is concomitant with the loss of functional excitatory synapses in C4-OE mice. The first stages of neocortical and hippocampal maturation are characterized by the presence of silent synapses, which are endowed with NMDAR but lack AMPAR. In the mouse and rat cortex, silent synapses disappear by the end of the second postnatal week, together with the finely orchestrated increase in distinct AMPAR subunit expression (Busetto et al., 2008; Henley and Wilkinson, 2016). However, the fact that the ratio of NMDAR to AMPAR can be bi-directionally regulated by long-term potentiation and long-term depression protocols (Lissin et al., 1999; Watt et al., 2004) indicates that “weak” synapses, characterized by low AMPAR/high NMDAR content, persist throughout development. It is tempting to speculate that the formation and/or maintenance of “weak” synapses may be specifically perturbed by C4 overexpression in juvenile mice, resulting in a decrease in NMDAR-mediated transmission. The accompanying loss of the GluA2 subunit in synaptic AMPARs, which increases AMPAR calcium permeability, might reflect a homeostatic compensation of the decrease in calcium-permeable NMDAR. The presence of GluA2-lacking, calcium-permeable AMPAR is characteristic of early stages of neuronal development. However, reduced synaptic GluA2 in C4-OE neurons should not be seen as a reversal of synapses towards an immature state, since neonatal excitatory synapses are characterized by a low AMPA/NMDA ratio, and thus rather constitutes a pathological trait (Henley and Wilkinson, 2016). In summary, while decreased spine density and reduced NMDAR function are both considered as robust endophenotypes the schizophrenic cortex, how they relate to each other is currently unknown. We propose that, in the context of elevated C4 expression, decreased NMDAR-mediated neurotransmission may be the consequence of decreased formation or decreased maintenance of weak, low AMPAR/high NMDAR synapses.

GABAergic network abnormalities

We show that C4-OE in pyramidal cells decreases GABA release from PV neurons onto pyramidal cells, consistent with decreased GAD67 expression in PV neurons and reduced PV neuron excitability. The cause of the well-substantiated decrease in GAD67 cortical expression in SZ is unclear. It has been

hypothesized that lower activity of layer II/III pyramidal cells, possibly due to their reduced number of dendritic spines, could result in fewer excitatory inputs onto PV cells (for instance through lower neuronal activity-regulated pentraxin secretion from pyramidal cells), leading to reduced PV neuron excitation and hence decreased activity-dependent GAD67 expression (Dienel and Lewis, 2019; Hoftman et al., 2017). Our results suggest that, at least in the context of elevated C4 expression in pyramidal cells, reduced GAD67 expression may result from reduced PV neuron excitability, rather than reduced synaptic excitatory input onto PV neurons. Indeed, increased mEPSC frequency in PV neurons in C4-OE mice indicates that PV neurons are spared from excitatory synapse loss associated with C4 overexpression in pyramidal cells. Thus, PV neuron dysfunctions in C4-OE mice, especially lower input resistance, may be primarily caused by homeostatic compensations acting on ion channel expression in PV neurons, rather than on synaptic inputs. In this perspective, increased excitatory input onto PV neurons would be a secondary compensation to the decrease in PV neuron excitability. Nevertheless, we cannot formally exclude that C4 differentially impacts excitatory synapses onto pyramidal cells and PV neurons.

Linking neural dysfunctions and cognitive impairment in C4-OE mice

Cognitive dysfunction is a central feature of SZ that is not treated by current pharmacotherapy, and determines the functional outcome of the illness (Kahn and Keefe, 2013). Impaired working memory has been proposed to be central in the cognitive impairments associated with SZ (Silver and Feldman, 2005; Silver et al., 2003). Working memory deficits in SZ are commonly linked to abnormal functioning of the PFC (Manoach, 2003; Perlstein et al., 2001), consistent with a large body of studies suggesting that the PFC contributes to working memory by integrating information and filtering, i.e. promoting sustained activity in the face of interference (Lett et al., 2014; Postle, 2006). Spine loss, reduced NMDAR transmission and PV neuron dysfunction in the PFC may all contribute to impair working memory. For example, decreased cortical connectivity in SZ has repeatedly been associated with working memory deficits (Cao et al., 2016). Decreased synapse density in layer II/III may particularly affect connectivity, since layer II/III pyramidal cells make major contributions to cortico-cortical connections, including callosal connections, and therefore integrate information across cortical areas and hemispheres. Furthermore, blocking NMDA, but not AMPA, receptors during a working memory task abolishes persistent activity in prefrontal neurons (Wang et al., 2013). Finally, PV neurons contribute to the mechanisms underlying working memory (Rossi et al., 2012), in line with the well-established role of PV neurons in the generation of fast, gamma frequency oscillations in neocortex (Cardin et al., 2009; Uhlhaas and Singer, 2010). Our results suggest that these distinct alterations occur together during development as a consequence of elevated C4 expression, making it difficult to attribute cognitive dysfunction to a single one of them. Instead, the combination of reduced connectivity following excitatory synapse loss, decreased NMDAR-mediated transmission and altered PV neuron function might collectively contribute to modify the dynamics of specific attractors, which are thought to be the

substrate for persistent neural activity underlying short-term memory (Brody et al., 2003; Inagaki et al., 2019).

Maternal immune activation and C4 overexpression cause similar neuronal alterations

Maternal immune activation (MIA) during gestation is a significant risk factor for development of SZ in the offspring. Interestingly, several neuronal abnormalities in C4-OE mice resemble those observed in rodent models of MIA. Like C4-OE mice, MIA mice show decreased mEPSC frequency and lower spine density in prefrontal cortex, which is correlated with decreased spine turnover in young (P17) mice (Coiro et al., 2015). Increased AMPA/NMDA ratio was also found in CA1 pyramidal neurons from MIA mice (Roumier et al., 2008), although neocortical neurons were not investigated. PV interneuron deficits in C4-OE mice and MIA mice also share similarities. Thus, GAD67 expression in PV neurons is decreased in MIA offspring, along with decreased probability of GABA release from PV cells onto PFC pyramidal neurons (Canetta et al., 2016). Taken together, these data suggest that high C4 expression and MIA may act on the same cellular pathways in the cortex. Since the cortical expression of complement molecules, including C4, is elevated in the offspring of rodents exposed to MIA (Duchatel et al., 2018; Han et al., 2017), it is possible that pathological mechanisms converge to increase complement activation in the C4-OE and in the MIA model, thus leading to common neuronal alterations. The “multiple hit” hypothesis posits that SZ results from the interaction between several genetic risk variants, or between predisposing genetic risk variants and environmental factors (Bayer et al., 1999). Our results indeed support the hypothesis that a genetic predisposition, such as high C4 gene copy number, may interact with early immune activation to promote SZ-associated endophenotypes through shared cellular mechanisms.

Acknowledgements

MD was the recipient of fellowships from the Doctoral School Brain-Cognition-Behavior (ED3C, Sorbonne Université) and from the Fondation pour la Recherche Médicale/Venite Cantemus (FDT20190400802). The project was supported by funds from the Investissements d’Avenir program managed by the ANR under reference ANR-11-IDEX-0004-02 to CLM and RT, the Emergence program of Sorbonne University to CLM, and from an ERANET Neuron Grant to RT (ANR-18-0008-01), MF (BMBF 01EW1905) and CLM (ANR-18-0008-02). We thank Drs L Maroteaux, P Gaspar and J-C Poncer for critically reading the manuscript.

Figures and legends

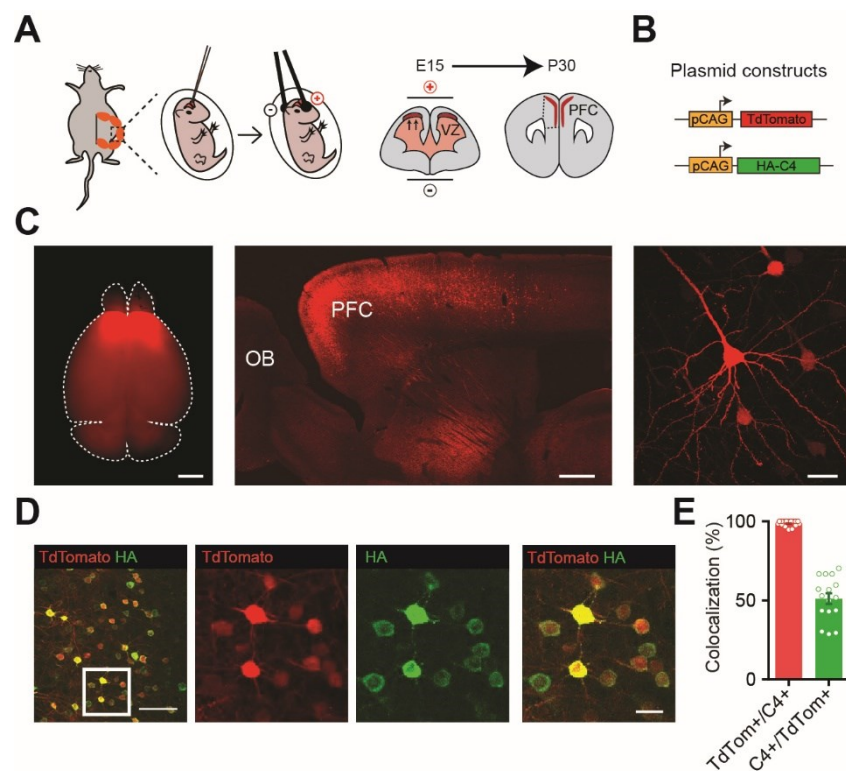


Figure 1. C4 overexpression in prefrontal cortex using in utero electroporation

(A) Schematic drawing illustrating the *in utero* electroporation (IUE) method at embryonic day 15 (E15) for specific targeting of layer II/III PFC pyramidal neurons. VZ: ventricular zone.

(B) Plasmid constructs used for IUE. Embryonic brains were co-electroporated with pCAG-HA-C4 and pCAG-tdTomato for C4 overexpression (C4-OE), or only with pCAG-tdTomato (control). pCAG-HA-C4 and pCAG-tdTomato were co-electroporated with a 4:1 ratio to ensure that most tdTomato⁺ cells overexpressed C4.

(C) Left panel: Electroporated brain at postnatal day 30 (P30) exhibiting TdTomato expression in PFC; scale bar: 5 mm. Middle panel: Sagittal slice showing the distribution of TdTomato positive cells in PCF layer II/III. OB: olfactory bulb; scale bar: 500 μm. Right panel: typical morphology of an electroporated pyramidal cell; scale bar: 30 μm.

(D) Immunostaining for TdTomato (red) and HA (green) in PFC layer II/III at P30. The three panels on the right are enlargements of the boxed area in the left panel. Note that tdTomato⁺ neurons also expressed HA-C4; scale bar: 100 μm; scale bar in magnified image: 20 μm.

(E) Quantification of the results exemplified in (D).

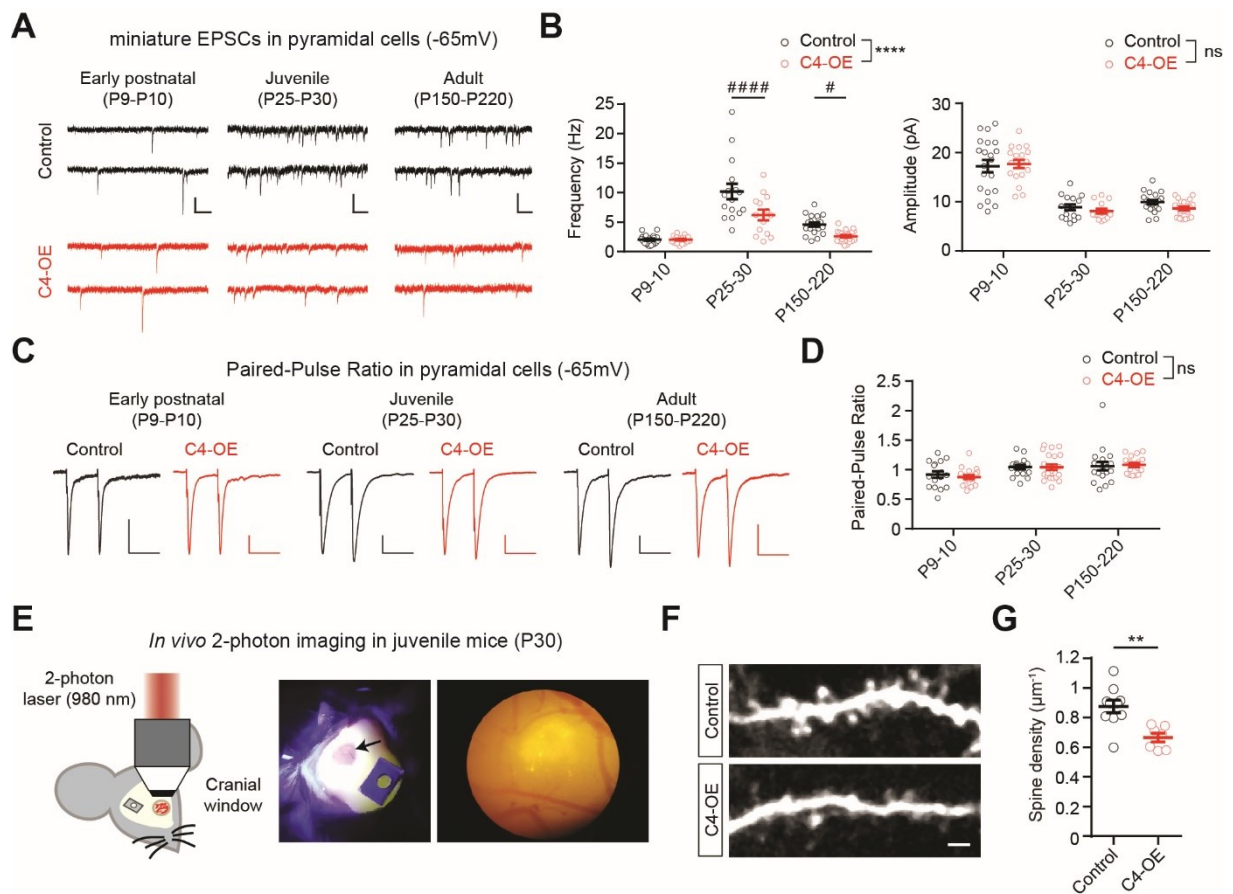


Figure 2. Reduced excitatory input onto C4-OE pyramidal cells

(A) Sample traces of mEPSCs in control and C4-OE pyramidal cells, at 3 developmental stages; scale bars: 20pA/100ms.

(B) mEPSC frequency was affected by C4-OE in juvenile and adult mice, but not in pups (two-way ANOVA, main effect, **** $P < 0.0001$; Sidak's post-hoc test ##### $P < 0.0001$, # $P < 0.05$, n.s. not significant). mEPSC amplitude was not significantly affected.

(C) Average traces of eEPSCs evoked by paired-pulse stimulation with 50 ms interpulse interval, recorded from control and C4-OE pyramidal cells at 3 developmental stages; scale bars: 50 pA/50 ms.

(D) Similar paired-pulse ratio in control and C4-OE pyramidal cells indicating an absence of presynaptic release alterations in C4-OE neurons. (n.s., not significant).

(E) Left, schematic drawing illustrating two-photon *in vivo* imaging in PFC at P30. Right, cranial window.

(G) Examples of apical dendrites from electroporated pyramidal cells in control and C4-OE mice aged P30.

(H) C4-OE decreased dendritic spine density in electroporated pyramidal cells from P30 mice; scale bar: 2 μm . (T-test, ** $P = 0.002$). All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual mouse.

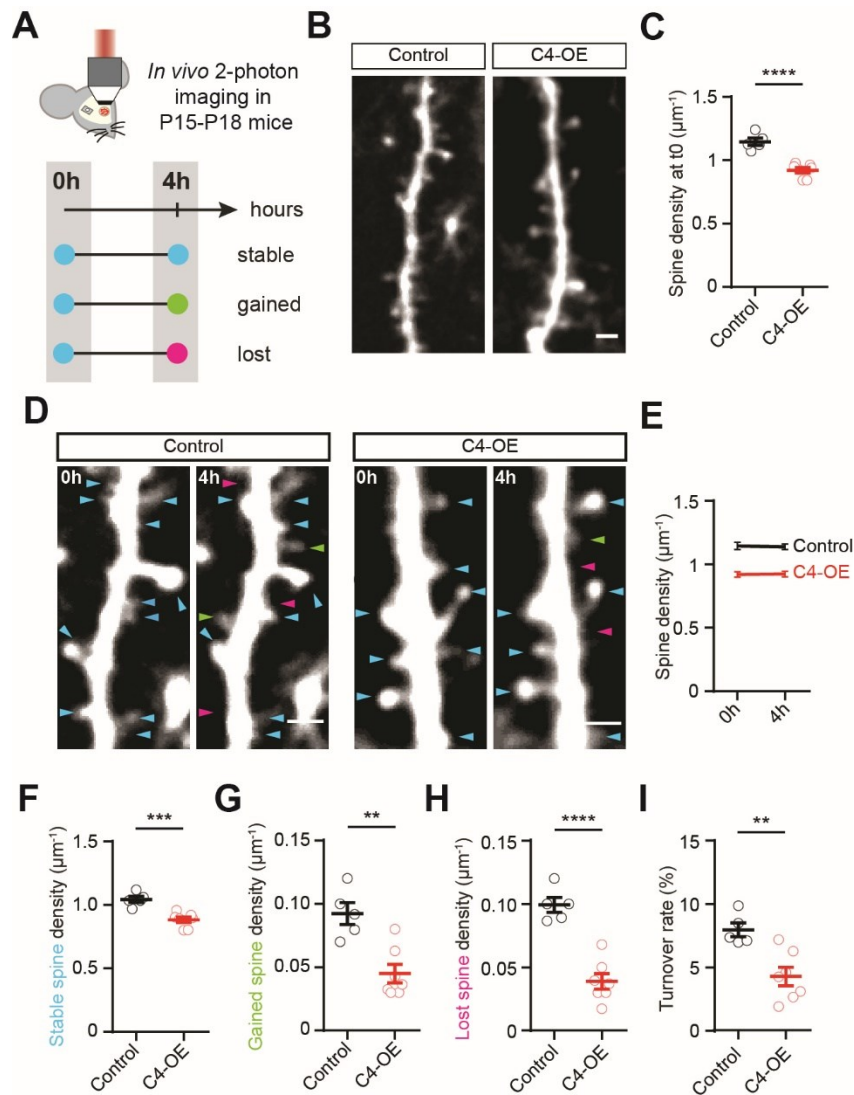


Figure 3. Decreased spine turnover in young (P15-P18) C4-OE mice

(A) Experimental timeline of *in vivo* two-photon imaging to investigate spine formation and elimination in electroporated pyramidal neurons. Spines already present at t_0 are in blue; spines that were stable, gained or lost at $t_0 + 4h$ are in blue, green and magenta, respectively.

(B) Examples of apical dendrites from control and C4-OE electroporated pyramidal neurons imaged at t_0 ; scale bar: 2 μm .

(C) Spine density at t_0 in tdTom+ pyramidal neurons (T-test, **** $P < 0.0001$)

(D) Example images showing spine turnover from t_0 to $t_0 + 4h$ in control and C4-OE pyramidal cells; scale bar: 2 μm .

(E) Evolution of the spine density between t_0 and $t_0 + 4h$ in control and control and C4-OE pyramidal cells.

(F-H) Stable, gained and lost spine density in control and C4-OE neurons. C4-OE caused a significant reduction in the number of both gained and lost spines (T-Test, **** $P < 0.0001$; *** $P = 0.0007$; ** $P = 0.0018$).

(I) Spine turnover in control and C4-OE dendrites. The turnover rate is decreased in C4-OE dendrites (T-Test, ** $P = 0.0018$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual mouse.

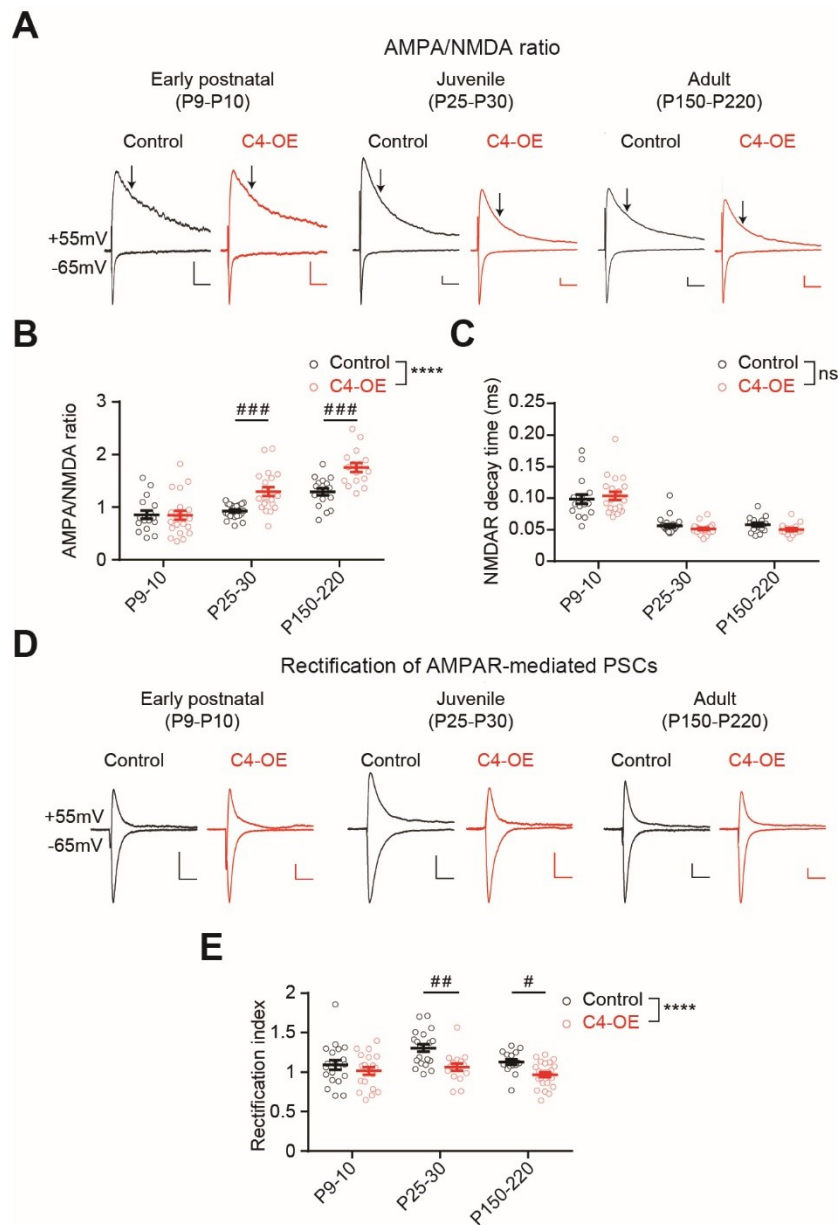


Figure 4. Altered AMPA/NMDA ratio and AMPAR rectification index in C4-OE mice

(A) Sample traces of evoked synaptic AMPA and NMDA currents recorded at -65 mV and +55 mV respectively in the presence of GABA_A in the presence of GABA_A at 3 developmental stages; The NMDAR component was measured 50 ms after stimulation (arrows). The AMPAR component was measured as the peak of the evoked EPSC at -65mV. Scale bars: 50pA/50ms.

(B-C) AMPA/NMDA ratio and NMDA decay time throughout development in control and C4-OE pyramidal cells. The AMPA/NMDA ratio was increased in C4-OE neurons from juvenile and adult mice, but not from pups. The decay time of NMDARs was not affected by C4-OE at any stage of development, indicating that C4-OE does not alter NMDAR subunit composition. This together with unchanged mEPSC amplitude in C4-OE mice (Fig.2B) indicates that the increased AMPA/NMDA ratio can be

interpreted as reduced NMDAR-mediated excitatory transmission in C4-OE pyramidal neurons (two-way ANOVA, main effect, **** $P < 0.0001$, Sidak's post-hoc test ### $P < 0.001$; n.s., not significant).

(D) Sample traces of evoked AMPA-mediated currents recorded at -65mV and $+55\text{mV}$ at 3 developmental stages; scale bars: $50\text{ pA}/50\text{ ms}$.

(E) The rectification index of AMPR-mediated currents was decreased in pyramidal cells from juvenile and adult C4-OE mice, suggesting the insertion of GluA2 subunit-lacking AMPAR at excitatory synapses (two-way ANOVA, **** $P < 0.0001$, Sidak's post-hoc test ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$). All data are represented as mean \pm SEM. Open circles represent single cells.

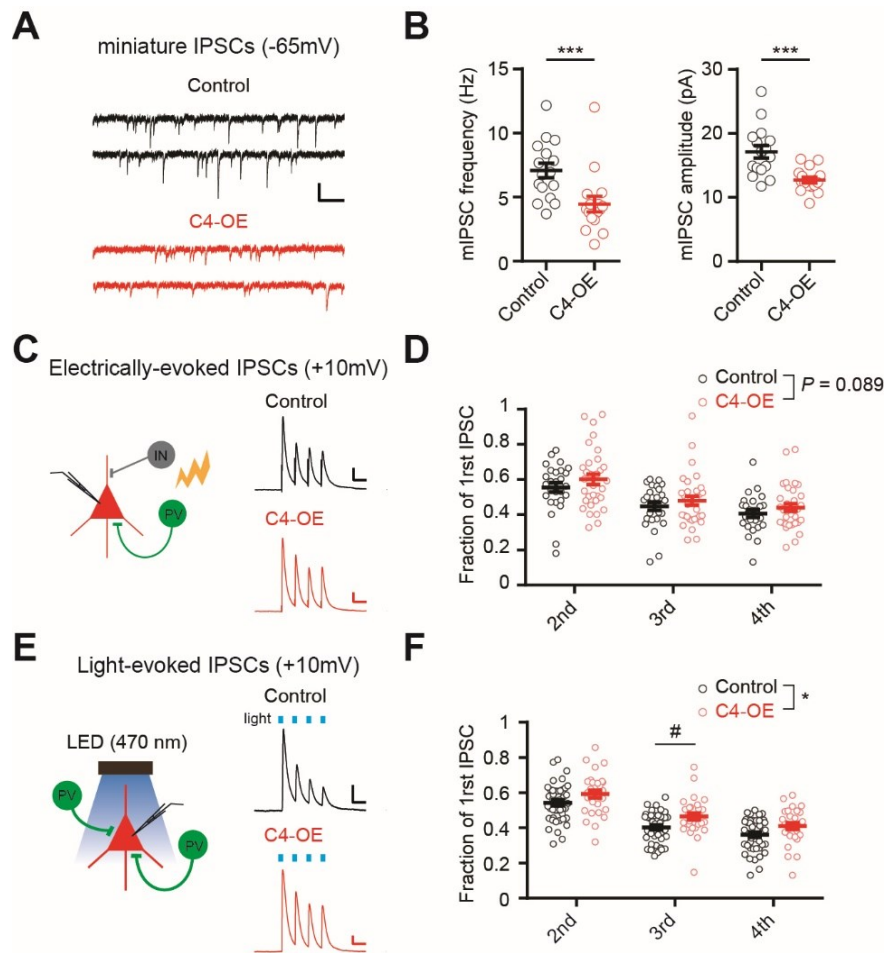


Figure 5. Decreased presynaptic release from PV neurons onto C4-OE pyramidal cells

(A) Sample traces of mIPSCs recordings at a holding potential of -65 mV in control and C4-OE pyramidal cells from juvenile mice (P25-P30); scale bars: 20pA/100ms.

(B) Both mIPSC frequency and amplitude were decreased in C4-OE pyramidal cells (frequency: Mann-Whitney test *** $P = 0.0004$; amplitude: T-Test *** $P = 0.0003$).

(C) Schematic drawing illustrating the electrical stimulation of GABAergic release onto electroporated pyramidal cells (left) and example traces of 4 consecutive eIPSCs evoked with 50ms interpulse intervals, in control and C4-OE pyramidal cells (right); scale bars: 50 pA/50 ms.

(D) Ratios of the second, third and fourth eIPSC peak amplitude to the first eIPSC peak amplitude. The trend towards reduced paired-pulse depression in C4-OE neurons was not significant, but suggested abnormal GABA release by interneurons (two-way RM ANOVA, main effect, $P = 0.089$).

(E) Schematic drawing illustrating the optogenetic activation of PV neuron and resulting IPSC recorded in electroporated pyramidal cells (left); and example traces of 4 consecutive light-evoked IPSCs with 50 ms interpulse intervals in control and C4-OE pyramidal cells (right); scale bars: 50 pA/50 ms.

(F) Ratios of the second, third and fourth light-evoked IPSC peak amplitude to the first IPSC peak amplitude. The increased ratio in C4-OE pyramidal cells indicates reduced presynaptic GABA release at PV neuron-pyramidal cell synapses (two-way RM ANOVA, main effect, * $P = 0.014$, Sidak's post-hoc test # $P < 0.05$). All data are represented as mean \pm SEM. Open circles represent single cells.

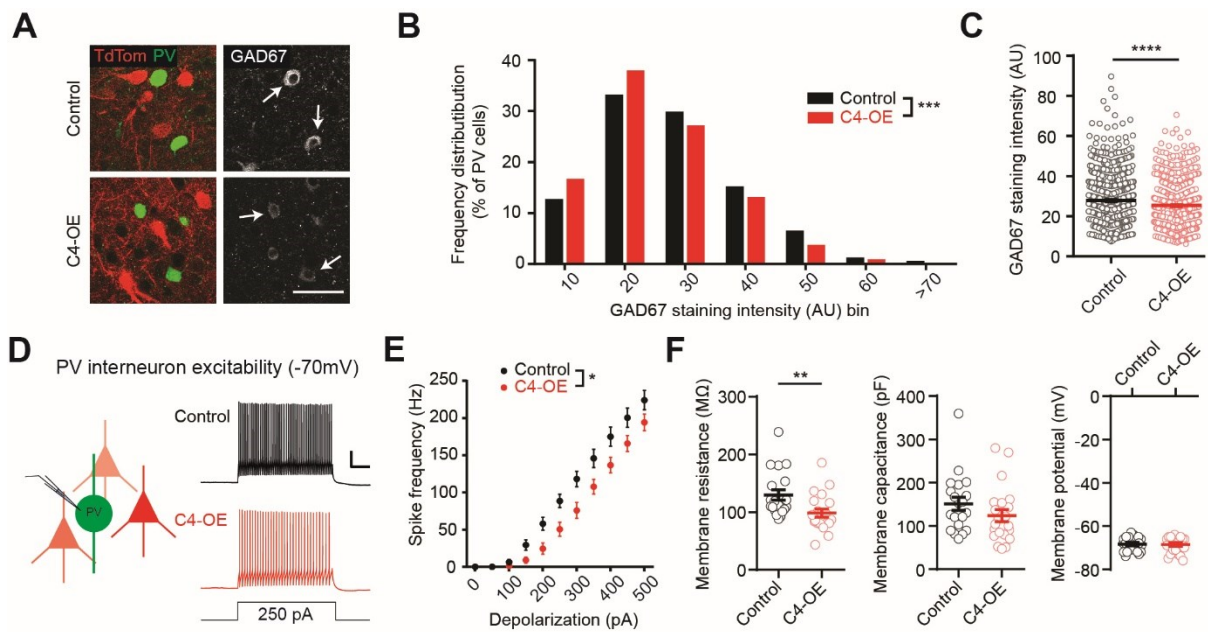


Figure 6. Decreased GAD67 expression and PV neuron excitability in C4-OE mice

(A) Example of immunostainings for tdTomato/PV and GAD67 on PFC slices from control and C4-OE mice. Arrows indicate GAD67-expressing PV cells; scale bar: 20µm.

(B-C) Frequency distribution and mean \pm SEM of GAD67 expression in PV+ cells. GAD67 expression in PV cells was decreased in C4-OE mice (Frequency distribution: Kolmogorov-Smirnov test, *** $P = 0.0002$; Average GAD67 expression: Mann-Whitney test, **** $P < 0.0001$).

(D) Schematic drawing depicting the patch-clamp recording of a PV interneuron located in the vicinity of tdTomato pyramidal cells (left) and sample spike trains in PV interneurons evoked by a 250 pA somatic current injection in control and C4-OE mice in the presence of synaptic blockers (right); scale bars: 20 mV/100 ms.

(E) PV interneurons exhibited reduced intrinsic excitability in C4-OE mice (two-way RM ANOVA, main effect, * $P = 0.013$).

(F) Input resistance (left), cell capacitance (middle) and resting membrane potential (right) in PV interneurons from control and C4-OE mice. The input resistance of PV neurons was significantly decreased in C4-OE mice. (Mann-Whitney test, ** $P = 0.0024$). All data are represented as mean \pm SEM. Open circles represent single cells.

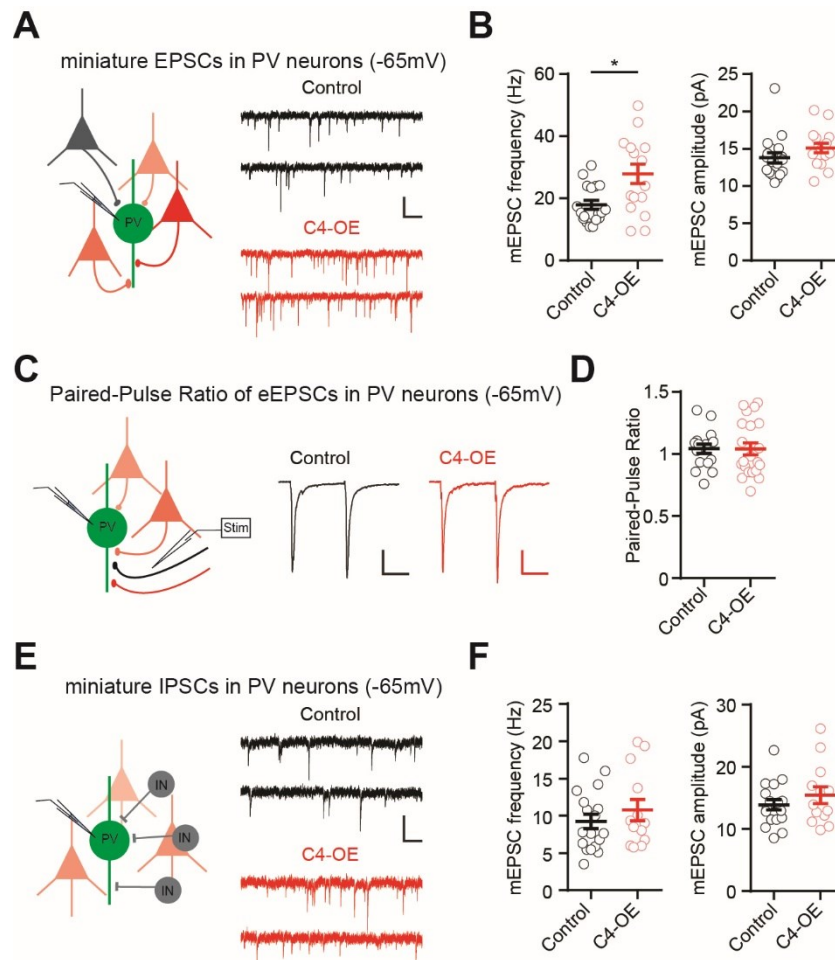


Figure 7. Increased excitatory inputs onto on PV neurons in C4-OE mice

(A) Sample traces of mEPSCs recordings in PV interneurons from control and C4-OE juvenile (P25-P30) mice recorded at -65 mV in the presence of TTX and GABAzine; scale bars: 20 pA/100ms.

(B) mEPSC frequency, but not IPSC amplitude, was lower in C4-OE mice than in control mice (frequency: Mann-Whitney test, * $P = 0.0184$).

(C) Average of 12 consecutive recordings; EPSCs were evoked by paired-pulse stimulation and recorded in PV interneurons from control and C4-OE mice at a holding potential of -65 mV; scale bars: 50 pA/50 ms.

(D) Summary histogram of the paired-pulse ratio in control and C4-OE.

(E) Sample traces of mIPSCs recorded at a holding potential of -65 mV with a high-chloride intracellular solution in PV interneurons from control and C4-OE juvenile (P25-P30) mice, in the presence of TTX, APV and CNQX; scale bar: 20 pA/100 ms.

(F) Mean frequency (left) and amplitude (right) of mIPSC in control and C4-OE neurons.

All data are represented as mean \pm SEM. Open circles represent single cells.

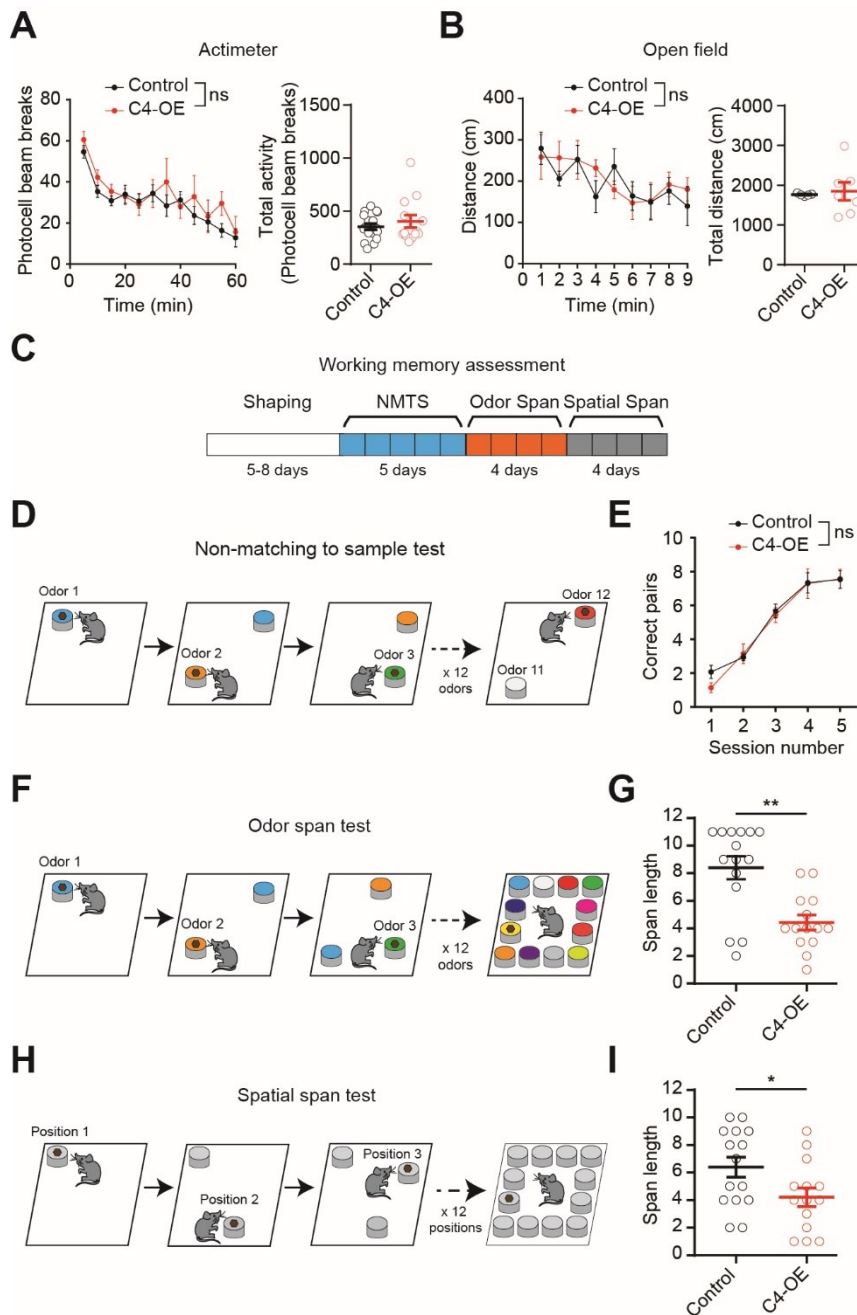


Figure 8. Impaired working memory in C4-OE mice

(A) Locomotor activity measured at weaning in an actimeter, in control and C4-OE male mice. Each dot represents spontaneous activity averaged over a period of 5 minutes.

(B) Locomotor activity measured one week after weaning in the open field, in control and C4-OE mice.

(C) Time line of working memory tests. Animals were first trained to dig into scented sawdust to find a reward pellet (shaping) before being exposed to 5 days of non-matching to sample (NMTS) test, followed by 4 days of odor span test, and 4 days of spatial span test.

(D) NMTS test procedure. Mice were exposed to pairs of odors and learned to associate a new odor with a reward.

(E) Performance in the NMTS odor test was similar in control and C4-OE mice.

(F) Mice were exposed to an increasing number of odors in the odor span test.

(G) Working memory capacity in the odor span test is strongly affected in C4-OE mice (Mann-Whitney test, ** $P = 0.0022$).

(H) Mice were exposed to an increasing number of positions in the spatial span test.

(I) Working memory capacity in the spatial span test is also affected in C4-OE mice (Mann-Whitney test, * $P = 0.0448$).

All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual mouse.

Supplementary figures, tables and legends

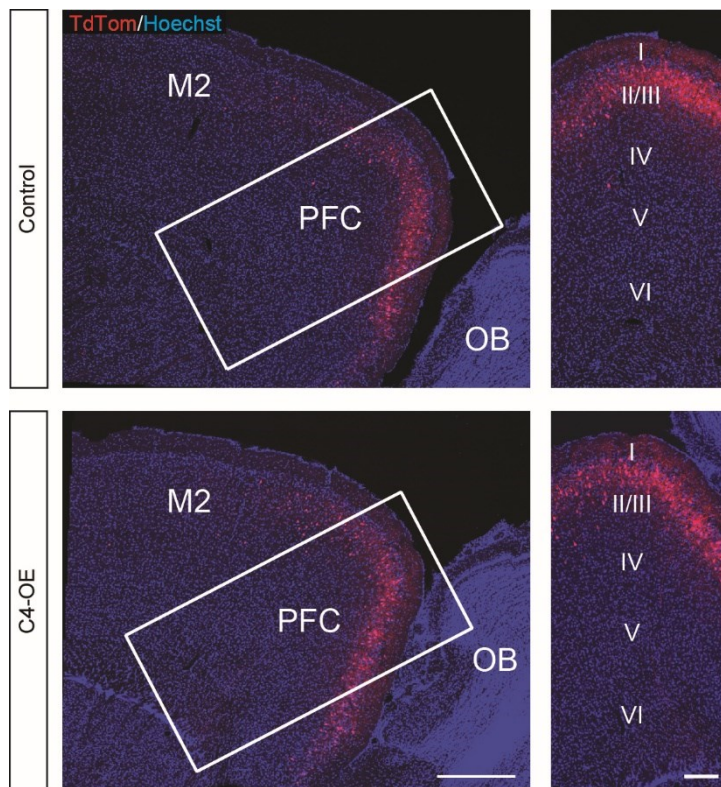


Figure S1. Similar laminar position of electroperated pyramidal cells in control and C4-OE mice
Left: sagittal PFC sections from control and C4-OE mice; scale bar: 300 μ m. Right, enlargements of the boxed area in the left panel showing PFC layers. All tdTomato+ cells are located in PFC layer 3; scale bar: 100 μ m; M2: motor cortex; PFC: prefrontal cortex; OB: olfactory bulb.

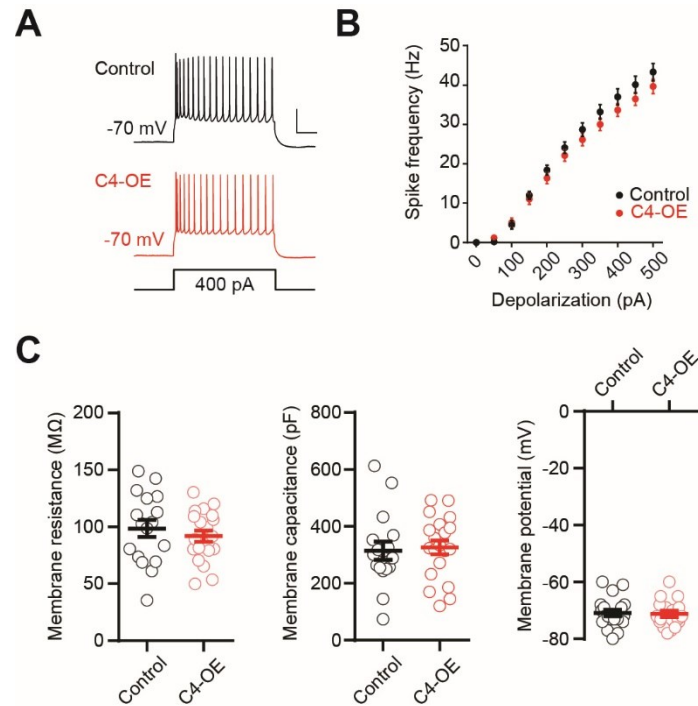


Figure S2. Passive and active neuronal properties in control and C4-OE mice

(A) Sample spike trains evoked by a 400 pA somatic current injection in a control and in a C4-OE pyramidal cell; scale bars: 20 mV/100 ms.

(B) f-i curves for control (n = 20 cells from 3 mice) and C4-OE neurons (n = 17 cells from 3 mice).

(C) Input resistance (left), Cell capacitance (middle) and resting membrane potential (right) in control (n = 20 cells from 3 mice) and C4-OE neurons (n = 17 cells from 3 mice). Neither firing frequency nor intrinsic neuronal properties differed between control and C4-OE pyramidal cells. All data are represented as mean \pm SEM. Each open circle represents an individual neuron.

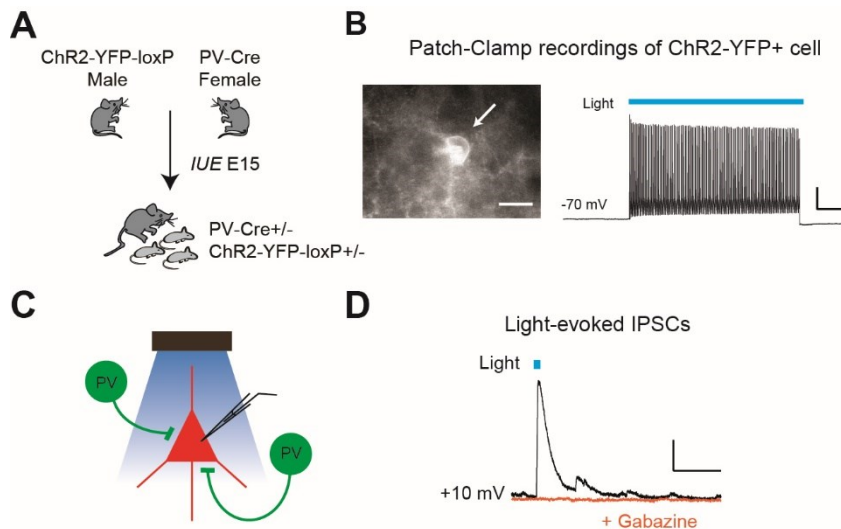


Figure S3. Light-evoked firing of ChR2-expressing PV neurons

(A) Homozygous PV-Cre::RCE females were crossed with homozygous lox-STOP-lox ChR2-YFP males before electroporation of timed-pregnant females with tdTomato or C4 + tdTomato. Electroporated offspring (age P25-P30) were used for ex vivo patch-clamp and optogenetics.

(B) Left, patch-clamped YFP+ cell (left); right, spike train evoked by a 500 ms pulse of blue (470 nm) light. YFP+ cells exhibited the typical fast-spiking pattern of PV neurons (n=3).

(C) Left, light-evoked IPSCs were recorded at a holding potential of +10 mV in electroporated PFC pyramidal cells from control or C4-OE PVCre-RCE::lox-STOP-lox ChR2-YFP mice. Right, light-evoked IPSC blocked by the addition of Gabazine (10 μ M), demonstrating its GABAergic nature; scale bars: 50 pA/ 50ms.

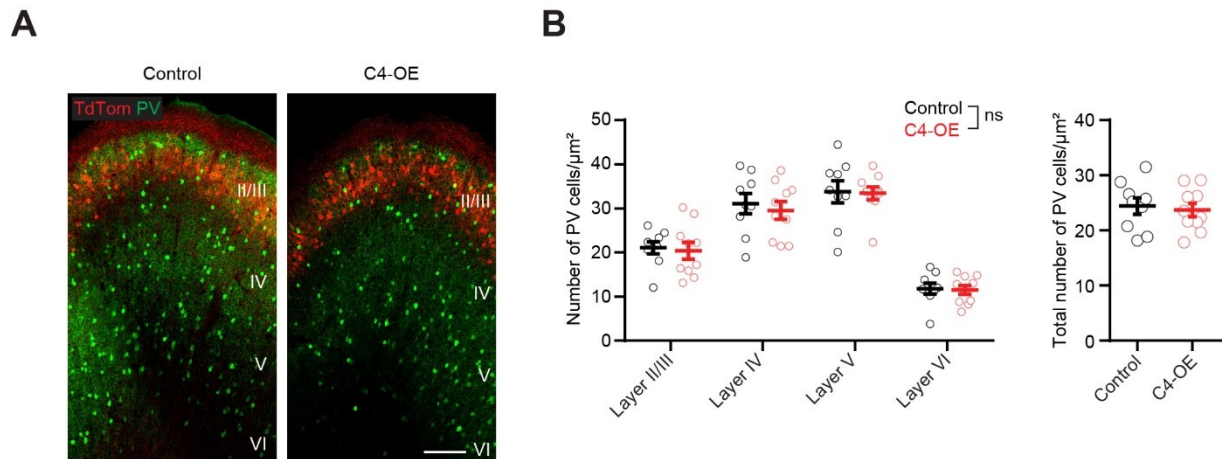


Figure S4. Laminar distribution of PV neurons in control and C4-OE mice

(A) PV staining in PFC sagittal slices from a control and from a C4-OE mouse; scale bar: 100 μm .

(B) The repartition by layer (left) as well as the total number of histologically identified PV (right) is unchanged in C4-OE ($n = 10$ mice) compared to control ($n = 9$ mice) mice. All data are represented as mean \pm SEM.

	Control	n	N	C4-OE	n	N	Test	p value	Significant	F statistic (ANOVA)
Intrinsic properties at P25-P30										
Membrane resistance (M Ω)	91.9 \pm 4.97	20	3	98.6 \pm 7.62	17	3	T-test	0.456	ns	
Resting membrane potential (mV)	-70.9 \pm 1.16	20	3	-71.2 \pm 1.17	17	3	T-test	0.841	ns	
Membrane capacitance (pF)	327 \pm 24.7	20	3	315 \pm 31.6	17	3	T-test	0.773	ns	
Firing		20	4		17	3	Two-way RM ANOVA	0.304	ns	F _(1,35) = 1.09
mEPSC frequency (Hz)							Two-way ANOVA	C4 factor: <0.0001	****	F _(1,105) = 17.4
						Age factor: <0.0001		****	F _(2,105) = 54.4	
						Interaction: 0.0059		**	F _(2,105) = 5.4	
<i>P9-P10</i>	2.03 \pm 0.17	21	3	2.02 \pm 0.15	18	4	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	10.2 \pm 1.31	16	5	6.20 \pm 0.90	14	6	Sidak's post-hoc test		####	
<i>P150-P220</i>	4.58 \pm 0.36	20	6	2.59 \pm 0.21	22	5	Sidak's post-hoc test		#	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		##	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		###	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
mEPSC amplitude (pA)							Two-way ANOVA	C4 factor: 0.399	ns	F _(1,105) = 0.716
						Age factor: <0.0001		****	F _(2,105) = 85.82	
						Interaction: 0.477		ns	F _(2,105) = 0.745	
<i>P9-P10</i>	17.2 \pm 1.241	21	3	17.7 \pm 0.855	18	4	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	8.87 \pm 0.586	16	5	8.10 \pm 0.478	14	6	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P150-P220</i>	9.927 \pm 0.442	20	6	8.637 \pm 0.350	22	5	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	

<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		####	
Excitatory PPR							Two-way ANOVA	C4 factor: 0.809	ns	$F_{(1,105)} = 0.033$
								Age factor: 0.0011	**	$F_{(1,105)} = 7.31$
								Interaction: 0.806	ns	$F_{(1,105)} = 0.213$
<i>P9-P10</i>	0.916 ± 0.056	16	3	0.875 ± 0.031	21	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	1.04 ± 0.04	17	3	1.04 ± 0.05	21	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P150-P220</i>	1.06 ± 0.07	19	5	1.08 ± 0.04	17	4	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		#	
AMPA/NMDA ratio							Two-way ANOVA	C4 factor: <0.0001	****	$F_{(1,108)} = 18.9$
								Age factor: <0.0001	****	$F_{(2,108)} = 40.6$
								Interaction: 0.007	**	$F_{(1,108)} = 5.2$
<i>P9-P10</i>	0.856 ± 0.078	17	3	0.844 ± 0.085	21	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	0.928 ± 0.028	23	4	1.294 ± 0.086	20	5	Sidak's post-hoc test		###	
<i>P150-P220</i>	1.317 ± 0.073	17	4	1.752 ± 0.085	16	4	Sidak's post-hoc test		###	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		ns	

<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		###	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		###	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		###	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		####	
NMDA decay time (ms)							Two-way ANOVA	C4 factor: 0.490	ns	F _(1, 108) = 0.48
								Age factor: <0.0001	****	F _(2, 108) = 73.09
								Interaction: 0.332	ns	F _(1, 108) = 1.12
<i>P9-P10</i>	0.098 ± 0.008	17	3	0.104 ± 0.006	21	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	0.056 ± 0.003	23	4	0.051 ± 0.002	20	5	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P150-P220</i>	0.058 ± 0.003	17	4	0.050 ± 0.002	16	4	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		####	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		####	
Rectification Index							Two-way ANOVA	C4 factor: <0.0001	****	F _(1, 112) = 18.09
								Age factor: 0.0058	**	F _(2, 112) = 5.40
								Interaction: 0.196	ns	F _(2, 112) = 1.65
<i>P9-P10</i>	1.09 ± 0.06	20	3	1.02 ± 0.05	20	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>P25-P30</i>	1.31 ± 0.05	21	3	1.06 ± 0.05	16	3	Sidak's post-hoc test		##	
<i>P150-P220</i>	1.13 ± 0.03	17	4	0.97 ± 0.03	24	3	Sidak's post-hoc test		#	
<i>Control: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		##	
<i>Control: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		#	

<i>Control: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P25-P30</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P25-P30 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
<i>C4-OE: P9-P10 vs P150-P220</i>							Sidak's post-hoc test		ns	
mIPSC Amplitude at P25-P30 (pA)	17.1 ± 0.98	16	4	12.74 ± 0.46	16	6	T-test	0.0003	***	
mIPSC Frequency at P25-P30 (Hz)	7.08 ± 0.57	16	4	4.46 ± 0.61	16	6	Mann-Whitney test	0.0004	***	
Short-term plasticity of evoked IPSCs at P25-P30 (electrical stim)		29	3		37	3	Two-way RM ANOVA	0.089	ns	F _(1,64) = 2.988
<i>Pulse II/ pulse I</i>	0.542 ± 0.028	29	3	0.610 ± 0.027	37	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Pulse III/ pulse I</i>	0.437 ± 0.025	29	3	0.488 ± 0.024	37	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Pulse IV/ pulse I</i>	0.397 ± 0.022	29	3	0.442 ± 0.021	37	3	Sidak's post-hoc test		ns	
Short-term plasticity of evoked IPSCs at P25-P30 (optogenetics)		43	4		30	3	Two-way RM ANOVA	0.014	*	F _(1,71) = 6.85
<i>Pulse II/ pulse I</i>	0.541 ± 0.016	43	4	0.592 ± 0.021	30	3	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Pulse III/ pulse I</i>	0.400 ± 0.013	43	4	0.465 ± 0.019	30	3	Sidak's post-hoc test		#	
<i>Pulse IV/ pulse I</i>	0.357 ± 0.014	43	4	0.411 ± 0.018	30	3	Sidak's post-hoc test		ns	

Table S1. Summary table of patch-clamp results (pyramidal cells)

N refers to the number of mice, n refers to the number of neuronal recordings. All data are presented as mean ± SEM. Sidak's test # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$; #### $P < 0.0001$

	Control	n	N	C4-OE	n	N	Test	p value	Significant	F statistic (ANOVA)
<i>In vivo</i> 2-photon imaging at P30										
Spine density	0.875 ± 0.043		10	0.666 ± 0.030		7	T-test	0.0023	**	
<i>In vivo</i> 2-photon imaging at P15-P18										
Spine density at 0h	1.15 ± 0.03		5	0.921 ± 0.021		7	T-test	< 0.0001	****	
Spine density from 0h to 4h			5			7	Two-way RM ANOVA	C4 factor: < 0.0001	****	F _(1,10) = 44.8
								Time factor: 0.780	ns	F _(1,10) = 0.083
								Time factor: 0.366	ns	F _(1,10) = 0.899
Stable spine density	1.04 ± 0.02		5	0.88 ± 0.02		7	T-test	0.0007	***	
Gained spine density	0.092 ± 0.008		5	0.045 ± 0.007		7	T-test	0.0018	**	
Lost spine density	0.099 ± 0.006		5	0.039 ± 0.006		7	T-test	< 0.0001	****	
Turnover rate (%)	8.77 ± 0.545		5	5.09 ± 0.73		7	T-test	0.0039	**	
GAD 67 expression										
Frequency distribution		950	6		949	6	Kolmogorov-Smirnov test	0.0002	***	
Mean intensity		950	6		940	6	Mann-Whitney test	< 0.0001	****	
PV cell distribution										
PV cell distribution			9			10	Two-way RM ANOVA	0.705	ns	F _(1,17) = 0.148
<i>Layer II/III</i>	21.1 ± 1.4		9	20.4 ± 1.9		10	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Layer IV</i>	31.1 ± 2.3		9	29.5 ± 2.0		10	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Layer V</i>	33.8 ± 2.5		9	33.4 ± 1.5		10	Sidak's post-hoc test		ns	
<i>Layer VI</i>	11.8 ± 1.2		9	11.5 ± 1.0		10	Sidak's post-hoc test		ns	
PV cell total number	24.4 ± 1.5		9	23.7 ± 1.21		10	T-test	0.705	ns	

Figure S2. Summary table of imaging results

N refers to the number of mice, n refers to the number of cells. All data are presented as mean ± SEM.

	Control	n	N	C4-OE	n	N	Test	p value	Significant	F statistic (ANOVA)
Intrinsic properties										
Membrane resistance (MΩ)	129.4 ± 8.8	20	3	98.3 ± 7.0	21	4	Mann-Whitney test	0.0024	**	
Resting membrane potential (mV)	-68.0 ± 0.8	20	3	-68.6 ± 0.8	21	4	T-test	0.881	ns	
Membrane capacitance (pF)	151 ± 15	20	3	124 ± 14	21	4	Mann-Whitney test	0.127	ns	
Firing		20	3		21	4	Two-way RM ANOVA	0.013	*	F _(1,37) = 6.82
mEPSC Amplitude (pA)										
mEPSC Amplitude (pA)	13.8 ± 0.7	18	5	15.1 ± 0.6	16	6	Mann-Whitney test	0.069	ns	
mEPSC Frequency (Hz)										
mEPSC Frequency (Hz)	17.9 ± 1.4	18	5	27.9 ± 3.1	16	6	Mann-Whitney test	0.018	*	
Excitatory PPR										
Excitatory PPR	1.04 ± 0.06	24	4	1.12 ± 0.05	21	3	T-test	0.251	ns	
mIPSC Amplitude (pA)										
mIPSC Amplitude (pA)	13.9 ± 0.8	18	4	15.4 ± 1.4	13	4	T-test	0.312	ns	
mIPSC Frequency (Hz)										
mIPSC Frequency (Hz)	9.25 ± 0.97	18	4	10.8 ± 1.43	13	4	T-test	0.365	ns	

Table S3. Summary table of patch-clamp results (PV interneurons)

N refers to the number of mice, n refers to the number of neuronal recordings. All data are presented as mean ± SEM.

	Control	N	C4-OE	N	Test	p value	Significant	F statistic (ANOVA)
Locomotion								
Actimeter (repeated mesures)		17		13	Two-way RM ANOVA	0.416	ns	F (1,28) = 0.681
Actimeter total activity	353 ± 30	17	404 ± 59	13	Mann-Whitney test	0.920	ns	
Open field (repeated mesures)		5		7	Two-way RM ANOVA	0.613	ns	F (1,90) = 0.258
Open field total activity	1765 ± 15	5	1849 ± 230	7	Mann-Whitney test	0.86	ns	
Working memory								
Non-matching to sample		15		14	Two-way RM ANOVA	0.556	ns	F (1,135) = 0.348
Odor Span	8.40 ± 0.83	15	4.43 ± 0.54	14	Mann-Whitney test	0.0022	**	
Spatial Span	6.40 ± 0.73	15	4.21 ± 0.68	14	Mann-Whitney test	0.045	*	

Table S4. Summary table of behavioral studies

N refers to the number of mice. All data are presented as mean ± SEM.

Methods

Table S5. Key Resources Table

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rat monoclonal anti-HA	Sigma	Cat# 11867431001; RRID: AB_390919
Rabbit anti-Parvalbumin	Swant	Cat# PV27; RRID: AB_2631173
Mouse monoclonal anti-Glutamate Decarboxylase 67	Millipore-Merk	Cat# G5419; RRID: AB_261978
Goat anti-rat Alexa Fluor 488	Invitrogen	Cat# A-11006; RRID: AB_2534074
Goat anti-rabbit Cy5	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-175-152; RRID: AB_2340607
Donkey anti-rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-165-152; RRID: AB_2307443
Goat anti-mouse Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	Cat# 115-605-003; RRID: AB_2338902
DNA and Plasmids		
C4b mouse sequence	NCBI Resources	NM_009780.2
pCAG-HAC4b	This paper	N/A
pCAG-TdTomato	This paper	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57Bl6/J	Janvier Labs	C57BL/6JRj
Mouse: PV-Cre (B6;129P2- Pvalb ^{tm1(cre)Arbr/J})	The Jackson Laboratory	JAX: 017320
Mouse: ChR2-YFP-loxP (B6;129S-Gt(ROSA) ^{26Sortm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze/J})	The Jackson Laboratory	JAX: 012569
Mouse: RCE-loxP (Gt(ROSA) ^{26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mmjax})	The Jackson Laboratory	JAX : 032037
Software and Algorithms		
GraphPad Prism	https://www.graphpad.com/	RRID: SCR_002798
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/	RRID: SCR_003070
MiniAnalysis	http://www.synaptosoft.com/MiniAnalysis/	RRID: SCR_002184
IgorPro	https://www.wavemetrics.com/	RRID: SCR_000325
PatchMaster	http://www.heka.com/products/products_main.html#soft_pm	RRID:SCR_000034
NeuroMatic	http://www.neuromatic.thinkrandon.com/	RRID:SCR_004186
Imetronic	http://www.imetronic.com/	N/A
Viewpoint	https://viewpoint.fr/en/p/software/viewpointtrack	N/A

Animals

All animal experiments were performed according to guidelines of the European Community for the use of animals in research and were approved by the local ethical committees (C2EA-05 in France; LANUV NRW in Germany). All experiments were performed on mice that had been electroporated at embryonic stage E15. Mice were housed in their home cages and kept under a 12-h light/dark cycle at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Food and water were available ad libitum. For optogenetics experiments, we used electroporated transgenic $Pvalb^{tm1(cre)Arbr (+/-)}::ChR2(H134R)-YFP^{(lox/-)}$ mice obtained after crossing homozygous $Pvalb^{tm1(cre)Arbr}$ (JAX n°017320) females expressing Cre recombinase under the control of the *Pvalb* promoter (kindly provided by Dr JC Poncer, Institut du Fer à Moulin, Paris) and homozygous *lox-STOP-lox ChR2-YFP* males (JAX n°012569) (kindly provided by Dr MC Angulo, Institute of Psychiatry and Neuroscience, Paris). To identify and patch-clamp PV interneurons ex vivo, we used PV-Cre mice crossed with RCE:LoxP reporter mice (JAX n°010701) expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the endogenous *Gt(ROSA)26Sor* promoter/enhancer regions and the CAG promoter. All mice were on a C57Bl/6J background. Females and males were used indifferently for electrophysiology, immunohistochemistry and imaging experiments. Only males were used for behavioral experiments.

DNA plasmid constructs

pCAG-HAC4 expression vector design was based on pCAG-HT2B-HA. The pCAG-HT2B-HA was a gift from I Moutkine (Fer à Moulin Institute, Paris). The HT2B gene was removed and replaced by the full coding sequence for murine C4b (NM_009780.2). The cDNA of C4b was obtained by reverse transcription PCR of total RNA from whole brain of adult 129S1/SvImJ mice. An HA tag was introduced at the N-terminus of the C4b sequence to allow the identification of the overexpressed C4 peptide. pCAG-tdTomato expression vector design was based on pCAG-mGFP which was a gift from Dr. C. Cepko (Matsuda and Cepko, 2004) (Addgene plasmid # 14757). mGFP was replaced by tdTomato in the pCAG backbone. Subcloning of C4b and tdTomato sequences were done using InFusi (Clontech) and DNA were purified with Nucleospin kit (Macherey-Nagel). Constructs were verified by sequencing.

***In utero* electroporation**

Pregnant mice at E15 were anesthetized by isoflurane 4% and were injected with Flunixin (0.05mg/kg body weight) before surgery. The surgery was performed under isoflurane 2% on a heated blanket and breathing was carefully monitored during all the procedure.

A midline laparotomy was performed and the uterine horns were exposed and moistened with sterile NaCl 0.9%. Between 0.5µl to 1µl of a solution containing pCAG-C4HA vector (0.8 µg/µl) together with pCAG-TdTomato vector (0.4 µg/µl) (molar ratio 4:1) in NaCl 0.9% were injected into the bilateral ventricles with a glass micropipette made from a microcapillary tube (#5-000-1001-X10, Drummond Scientific). In the control condition, a solution containing pCAG-TdTomato (0.8 µg/µl) alone was

injected. The injected plasmid solution contained Fast Green (0.1%) to monitor the injection. The embryo's head in the uterus was held between the tweezers-type electrode consisting of two disc electrodes of 5 mm diameter (CUY650P5, Nepagene). The cathode was placed just above the olfactory bulbs and the anode was placed at the back of the head below the cerebellum. Electrical pulses (50V; 50 ms) were applied five times at intervals of 950 ms with an electroporator (CUY21 Edit, Nepagene). The uterine horn was placed back into the abdominal cavity. The abdominal cavity was filled up with sterile NaCl 0.9% and the abdominal muscle and skin were sutured separately. After recovery, pregnant mice were returned to their home cage and sutures were examined every day until birth. Correct tdTomato expression was first checked through the intact skin shortly after birth (age P1-P2) and confirmed *post mortem* on brain slices from each experimental animal. Mice without tdTomato expression in the prefrontal cortex (PFC) were excluded from the analysis.

Cranial window surgery

At postnatal day 15 to 18 (P15-18) (and P30 respectively) a cranial window surgery was performed as previously described (Bittner et al., 2010; Fuhrmann et al., 2010; Fuhrmann et al., 2007). Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamin/xylazin (0.13/0.01 mg/g body weight). For analgesia an additional subcutaneous injection of buprenorphin (0.05 mg/kg) was given. The anesthetic profile was deepened and maintained by inhalation of isoflurane (0.2-0.4% in 0.2 l/min oxygen). After the withdrawal reflex of the hind limb had subsided, the surgery began. The eyes were covered with eye ointment (Bepanthen) to prevent drying and the mouse was placed on a heating pad to maintain body temperature. Subsequently, mice were fixed to a stereotactic frame and the skin of the head was disinfected with 70% ethanol. The skin above the skull was removed using surgical scissors. To assure correct placement of the cranial window, the expression of the fluorophore was located using a UV light source. Next, the skull bone was dried and a 4-mm-diameter circular piece of bone was removed over the prefrontal cortex using a dental drill. The dura mater was carefully removed and a circular coverslip (\varnothing 4 mm) was inserted into the craniotomy and glued to the bone. To allow stable and repetitive fixation of the mouse under the microscope, a small metal bar was attached next to the cortical window using UV-curable dental adhesive.

Two-photon *in vivo* imaging and analysis

Two-photon imaging was performed right after surgery at a Zeiss 7 multiphoton microscope with a Zeiss 20 x objective (NA = 1). The anesthesia was maintained with 1-1.5% inhalation of isoflurane while the mouse was head fixed to a custom-made imaging frame. TdTomato fluorescence was excited at 980 nm using an InSight X3 tunable laser (Spectra-Physics) and collected through a 617/73 band-pass filter on a highly sensitive non-descanned detector. First, a 600 μ m (x) x 600 μ m (y) x 400 μ m (z) overview z-stack (4 μ m z-spacing) was acquired to retrieve the region of interest over multiple sessions. Then z-stacks of single dendrites (1 μ m z-spacing) with a pixel size of 0.089 μ m were acquired. After the first imaging

session, the mice woke up and were placed in a cage with their littermates for 4-5 h (P15-18). For the second imaging session the mice were again anesthetized with isoflurane (initially 3%, then 1-1.5% for anesthesia maintenance) and imaged to retrieve the same dendritic structures recorded in the first imaging session.

Datasets were blinded prior to analysis by an experimenter not involved in the image analysis. In each animal 4-19 dendrites of 30-120 μm length were analyzed. Spines that extended out laterally from the dendritic shaft were counted manually by scrolling through the z-stack, as previously described (Gu et al., 2014). Spine density was calculated by the number of spines divided by the length of the respective dendrite. Turnover of dendritic spines was calculated as follows: $\text{turnover [\%]} = 100 * ((\# \text{gained} + \# \text{lost}) / (\# \text{T1} + \# \text{T2}))$. Here, $\# \text{gained}$ refers to the number of gained and $\# \text{lost}$ to the number of lost spines, respectively and $\# \text{T1}$ and $\# \text{T2}$ to the number of all spines at time-points T1 and T2, respectively. T1 and T2 refer to 0h and 4h.

Histology

Immunohistochemistry

Mice aged P30 were anesthetized with pentobarbital (150 mg/kg) and intracardially perfused with PBS followed by 4% buffered formaldehyde (Histofix, Roti). The brains were removed and fixed overnight in 4% Histofix. 40 μm sagittal sections were cut using a vibratome (VT1000S, Leica). Free-floating sections were permeabilized and blocked in 0.2% Triton-PBS, 3% BSA-PBS for 60 min before incubation with the first antibody in 0.2% Triton, 3% BSA-PBS overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with the secondary antibody in PBS for 2h, washed again in PBS, and mounted using Fluoromount G (Invitrogen). Primary antibodies were: rat anti-HA (1:300, Sigma), rabbit anti-Parvalbumin (PV27, 1:1000, Swant), mouse anti-Glutamate Decarboxylase 67 (GAD67, clone 1G10.2, 1:500, Millipore-Merk). Secondary antibodies were: goat anti-rat Alexa Fluor 488 (1:400, Invitrogen), goat anti-rabbit Cy5 (1:1000, Jackson Immuno Research), donkey anti-rabbit Cy3 (1:1000, Jackson Immuno Research), goat anti-mouse Alexa Fluor 647 (1:1000, Jackson Immuno Research). Hoechst 33342 was used for nuclear staining. Images were acquired using a confocal microscope (SP5, Leica).

PV cell number and distribution

The distribution of PV neurons in different PFC layers was quantified using maximal intensity projections of 3D confocal stacks. For each mouse, 4 PFC sagittal sections were imaged using a confocal microscope (Leica SP5, 40x objective). Layers were identified based on Hoechst nuclear staining and delineated using ImageJ's ROI manager software. The distribution of PV neurons in different PFC layers was quantified using maximal intensity projections of 3D confocal stacks. The density of PV cells

(number of PV cells per surface unit) in each layer was obtained by averaging the density across the 4 slices. During image acquisitions and quantifications, the investigator was blind to the genotype.

GAD67 expression

GAD67 expression levels in PV cells were measured by analyzing confocal images (Leica SP5, 40x objective) using ImageJ. For each animal, 3 to 4 PFC sagittal slices were acquired. At least 80 PV neurons per mice were analyzed. A single confocal section located 10 μm below the surface of the slice was acquired in each slice. The same acquisition parameters were used for each slice and were set such that the brightness of the GAD67 immunostaining was below saturation values. The brightness of the PV immunostaining was set above saturation level, allowing to use PV as a marker to delineate the shape of PV neurons. The density of GAD67 immunostaining within PV cells was then automatically calculated using Image J. During image acquisitions and quantifications, the investigator was blind to the condition (control or C4-OE).

Acute slice preparation

250 μm -thick coronal slices were prepared from brains of control and C4-OE mice. Mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold (0–4°C) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) solution containing (in mM): 110 Choline chloride, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 11.6 L-ascorbic acid and 3.1 sodium pyruvate. The brain was extracted and acute sagittal slices were cut in the same ice-cold solution using a vibroslicer (HM 650 V, Microm), then stored in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the following (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, and 1 MgCl₂, continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂. Slices were incubated in ACSF at 32°C for 20 minutes and then at room temperature (20-25°C). For patch-clamp recordings, slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with ACSF (30-32°C) buffered by continuous bubbling with 95% O₂-5% CO₂.

Electrophysiology and optogenetics

Whole-cell current and voltage-clamp recordings were performed in PFC layer II/III. Recorded pyramidal cells all expressed tdTomato. Recorded PV interneurons were in the vicinity of electroporated tdTomato⁺ pyramidal cells and were visually identified based on the expression of EGFP (in PV-Cre::RCE mice) or YFP (in PV-Cre::lox-STOP-lox Chr2-YFP mice). Stimulus delivery and data acquisition were performed using Patchmaster software (Multichannel Systems). Signals were acquired with an EPC10-usb amplifier (Multichannel Systems), sampled at 20 kHz and filtered at 4 kHz. Offline analysis was performed using Clampfit (Molecular Devices) and Igor Pro (Wavemetrics). For the study of miniature post synaptic currents, recordings were filtered offline at 2 kHz and analyzed using MiniAnalysis (Synaptosoft).

Patch-clamp pipettes (3–6 Mohm resistance) were prepared from borosilicate glass (BF150-86-10; Harvard Apparatus) using a DMZ pipette puller (Zeitz). Current-clamp experiments were performed using the following intracellular solution (in mM): 105 K-gluconate, 10 HEPES, 10 phosphocreatine-Na, 0.3 Na₃GTP, 4 MgATP, 30 KCl (pH 7.25, adjusted with KOH). For voltage-clamp experiments the following intracellular solution was used (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 Hepes, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Mg, 3 QX 314 (pH 7.25, adjusted with CsOH). To record miniature and evoked inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs and eIPSCs), we used an intracellular solution containing (in mM): 60 Cs methane sulfonate, 70 CsCl, 10 Hepes, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Mg (pH 7.25, adjusted with CsOH). Liquid junction potentials (-14.9 mV for Cs-based intracellular solutions and -5mV for the K⁺-based intracellular solution) were left uncorrected.

Excitability

Pyramidal cell and PV interneuron intrinsic properties and excitability were recorded in current-clamp in presence of the following synaptic blockers: SR95531 hydrobromide (Gabazine, 10 μ M, Hello Bio), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M, Hello Bio) and D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV, 50 μ M, Hello Bio). Spike frequency-depolarization curves were generated by injecting series of 500 ms depolarizing current steps increasing by 50 pA. The firing pattern of patched-clamped YFP⁺ cells in the cortex of PV-Cre::lox-STOP-lox ChR2-YFP mice was monitored using 500 ms pulse of blue light emitted by a light emitting diode (CoolLED).

Miniature EPSCs and evoked EPSCs

Miniature excitatory post synaptic currents (mEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV in the presence of tetrodotoxin (TTX, 0.5 μ M, Hello Bio) and Gabazine (10 μ M). At least 100s were analysed for each recording. Evoked excitatory post synaptic currents (eEPSCs) were recorded at a holding potential of -65 mV and triggered at a frequency of 0.1 Hz in the presence of GABA_A (10 μ M) with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator (Iso-Flex, A.M.P.I.), positioned in the vicinity of the recorded neuron. At least 12 consecutive sweeps were acquired for each cell. The paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the ratio of the peak amplitude of the averaged current response evoked by the second stimulation to the peak amplitude of the averaged current response evoked by the first stimulation.

Miniature IPSCs and evoked IPSCs

mIPSCs were recorded at a holding potential of -65 mV in the presence of TTX (0.5 μ M, Hello Bio), CNQX, (10 μ M) and D-APV (50 μ M). At least 100 s were analysed for each recording. Evoked IPSCs were recorded at a holding potential of +10mV to avoid unclamped action potentials commonly associated with evoked IPSCs measured at hyperpolarized potentials in our high-chloride recording conditions, in the presence of CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M). At least 25 consecutive sweeps were acquired and averaged for each cell. For electrically evoked IPSC (eIPSCs), four stimulations at 20 Hz

were applied with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator positioned in layer 3, 100-150 μm away from the recorded neuron. For light-evoked IPSCs, the recorded pyramidal cell was placed in the center of the field of view. The response to four 0.5-ms pulses of blue light (470nm) at 20 Hz emitted by a light emitting diode (CoolLED) was recorded. The paired-pulse ratio of eIPSCs was calculated as the ratio of the peak amplitude of the averaged current response evoked by the second, third and fourth stimulations to the peak amplitude of the averaged current response evoked by the first stimulation.

AMPA/NMDA ratio and rectification index of AMPAR-mediated currents

To measure the AMPA/NMDA ratio and the rectification index, EPSC were evoked with a monopolar electrode positioned in layer 3, 100-150 μm away from the recorded neuron. At least 12 consecutive sweeps were acquired and averaged at each holding potential. The AMPA/NMDA ratio was recorded in presence of GABA_Azine (10 μM). The AMPA current (I_{AMPA}) was measured as the peak amplitude of the current response at a holding potential of -65mV. The NMDA current (I_{NMDA}) was measured at a holding potential of +55mV, 50ms after stimulation, when AMPAR-mediated current have receded due to the fast deactivation kinetics of AMPARs. The ratio is calculated as $I_{\text{AMPA}}/I_{\text{NMDA}}$.

To study the rectification AMPA-mediated currents, pyramidal cells were recorded in the presence of GABA_Azine (10 μM) and D-APV (50 μM). Spermine (10 μM) was added to the intracellular solution. The rectification index was defined as the peak amplitude of synaptic currents measured at a holding potential of +55 mV (\approx +40 mV after correcting for junction potential) multiplied by 2 and divided by the peak amplitude of synaptic currents measured at a holding potential of -65mV (\approx -80 mV after correcting for junction potential).

Behavior

Actimeter

We used actimeter racks of 8 circular corridors (Imetronic, <http://www.imetronic.com/devices/circular-corridor/>) equipped with infrared sensors to detect and automatically record locomotion. Animals were introduced individually in corridors and their spontaneous, novelty-driven activity was recorded for a total of 60 minutes. Activity, measured as photocell beam breaks, was averaged over periods of 5 minutes. Control and C4-OE male mice were tested at weaning (age P30).

Open Field

The test took place in a white open-field apparatus (ViewPoint, Lyon, France) under high illumination (\sim 100 lux). Animal were individually placed in the corner of the open-field and were allowed to explore for 9 min. A video tracking system, which included a computer-linked overhead camera, was used to monitor general locomotor activity (<https://viewpoint.fr/en/p/software/videotrack>, ViewPoint, Lyon, France). Control and C4-OE male mice were tested a week after weaning (age P35 – P39).

Odor Span and Spatial Span Test

Working memory capacity was tested using a protocol adapted from a previous study (Young et al., 2007). All scented mixtures were prepared with 100 g of sawdust, 18 ground powdered pellets (Chocapic, Nestle) to mask the scent of the reward pellet and 3 g of a ground powder odor (Savory, Cinnamon, Cumin, Nutmeg, Mint, Fennel, Four spices, Herbs of Provence, Coriander, Basil, Coffee, Ginger). During shaping and testing, adult (4- to 6-month-old) male mice were maintained at 80-85% of their body weight. During the shaping phase, mice were trained to dig into a bowl of unscented sawdust to retrieve the hidden reward pellet. Once all animals had learned the procedure, the non-matching to sample (NMTS) task started for 5 consecutive days. Each day, the mouse was placed on a square platform and required to dig into the first bowl (odor 1) to retrieve the reward and to remember the scent of that bowl. Upon consumption of the reward pellet, a second baited bowl (odor 2) was added. The first bowl (no longer baited) and the new bowl were randomly distributed on the platform. Following retrieval of the pellet, the first bowl was removed and a novel baited bowl (odor 3) randomly placed. This process was repeated until each individual mouse had been exposed to 11 pairs of scented bowls or stopped after a maximum of 12 minutes when the mouse did not perform the task, and the number of correct pairs (direct digging into the baited bowl) was recorded.

Following the NMTS, animals were then tested 4 consecutive days for the odor span task, using the same procedure except that, following reward retrieval, the no longer baited bowls were not removed so that mice had to remember an increasing numbers of odors (span). The span length was calculated as the number of correct responses with more than one bowl on the platform prior to the first mistake. Thus, using 12 odors, the maximum span length is 11. The span score was given by the first mistake, but each mouse was allowed to continue the task until the 12 odors had been sampled or for a maximum of 12 minutes. The span length was the best score obtained by each tested mouse over a period of 4 consecutive days.

The same mice were subsequently tested for 4 consecutive days in the spatial span task. They had to remember an increasing numbers of locations, following a procedure similar to the odor span test, except that bowls of unscented sawdust were identified according to their spatial location on the platform. The span length was the best score obtained by each tested mouse over a period of 4 consecutive days.

The investigator was blind to the condition (control or C4-OE) during behavioral tests and analysis.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Prism (Graphpad). The normality of data distribution was tested using Shapiro-Wilk's test. Unpaired two-tailed T-tests (for normally distributed datasets) or Mann-Whitney tests (for non-normally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons we used two-way ANOVA followed by Sidak's test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. P values are reported as follows: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

References

- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6496-6499.
- Balu, D.T. (2016). The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Adv Pharmacol* 76, 351-382.
- Bayer, K.U., Lohler, J., Schulman, H., and Harbers, K. (1999). Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 70, 147-154.
- Bellone, C., and Luscher, C. (2006). Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. *Nat Neurosci* 9, 636-641.
- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S.M., Hoffmann, N., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., LaFerla, F.M., and Herms, J. (2010). Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One* 5, e15477.
- Benros, M.E., Mortensen, P.B., and Eaton, W.W. (2012). Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1262, 56-66.
- Brody, C.D., Romo, R., and Kepecs, A. (2003). Basic mechanisms for graded persistent activity: discrete attractors, continuous attractors, and dynamic representations. *Curr Opin Neurobiol* 13, 204-211.
- Brown, J.A., Ramikie, T.S., Schmidt, M.J., Baldi, R., Garbett, K., Everheart, M.G., Warren, L.E., Gellert, L., Horvath, S., Patel, S., and Mirnics, K. (2015). Inhibition of parvalbumin-expressing interneurons results in complex behavioral changes. *Mol Psychiatry* 20, 1499-1507.
- Busetto, G., Higley, M.J., and Sabatini, B.L. (2008). Developmental presence and disappearance of postsynaptically silent synapses on dendritic spines of rat layer 2/3 pyramidal neurons. *J Physiol* 586, 1519-1527.
- Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L.J., Sahn, R., Harrison, N.L., Gordon, J.A., Brown, A., and Kellendonk, C. (2016). Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry* 21, 956-968.
- Cao, H., Dixon, L., Meyer-Lindenberg, A., and Tost, H. (2016). Functional connectivity measures as schizophrenia intermediate phenotypes: advances, limitations, and future directions. *Curr Opin Neurobiol* 36, 7-14.

Cardin, J.A., Carlen, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H., and Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663-667.

Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., and Prince, D.A. (2010). Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7975-7980.

Chung, W.S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., *et al.* (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394-400.

Coiro, P., Padmashri, R., Suresh, A., Spartz, E., Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Meays, B., Roy, S., Gautam, N., *et al.* (2015). Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun* 50, 249-258.

Dienel, S.J., and Lewis, D.A. (2019). Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiol Dis* 131, 104208.

Duchatel, R.J., Meehan, C.L., Harms, L.R., Michie, P.T., Bigland, M.J., Smith, D.W., Jobling, P., Hodgson, D.M., and Tooney, P.A. (2018). Increased complement component 4 (C4) gene expression in the cingulate cortex of rats exposed to late gestation immune activation. *Schizophr Res* 199, 442-444.

Feinberg, I. (1982). Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *Journal of psychiatric research* 17, 319-334.

Fujihara, K., Miwa, H., Kakizaki, T., Kaneko, R., Mikuni, M., Tanahira, C., Tamamaki, N., and Yanagawa, Y. (2015). Glutamate Decarboxylase 67 Deficiency in a Subset of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 40, 2475-2486.

Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C.K., Burgold, S., Page, R.M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F.M., Kretschmar, H., and Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13, 411-413.

Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretschmar, H., and Herms, J. (2007). Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci* 27, 6224-6233.

Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15, 193-204.

Glantz, L.A., and Lewis, D.A. (2000). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57, 65-73.

Glausier, J.R., and Lewis, D.A. (2013). Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 251, 90-107.

Gu, L., Kleiber, S., Schmid, L., Nebeling, F., Chamoun, M., Steffen, J., Wagner, J., and Fuhrmann, M. (2014). Long-term in vivo imaging of dendritic spines in the hippocampus reveals structural plasticity. *J Neurosci* 34, 13948-13953.

Han, M., Zhang, J.C., and Hashimoto, K. (2017). Increased Levels of C1q in the Prefrontal Cortex of Adult Offspring after Maternal Immune Activation: Prevention by 7,8-Dihydroxyflavone. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology* 15, 64-67.

Hashimoto, T., Volk, D.W., Eggan, S.M., Mirnics, K., Pierri, J.N., Sun, Z., Sampson, A.R., and Lewis, D.A. (2003). Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 23, 6315-6326.

Henley, J.M., and Wilkinson, K.A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 17, 337-350.

Hoftman, G.D., Datta, D., and Lewis, D.A. (2017). Layer 3 Excitatory and Inhibitory Circuitry in the Prefrontal Cortex: Developmental Trajectories and Alterations in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 81, 862-873.

Hollmann, M., Hartley, M., and Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851-853.

Holtmaat, A.J., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., and Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279-291.

Inagaki, H.K., Fontolan, L., Romani, S., and Svoboda, K. (2019). Discrete attractor dynamics underlies persistent activity in the frontal cortex. *Nature* 566, 212-217.

Kahn, R.S., and Keefe, R.S. (2013). Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *JAMA psychiatry* 70, 1107-1112.

Lett, T.A., Voineskos, A.N., Kennedy, J.L., Levine, B., and Daskalakis, Z.J. (2014). Treating working memory deficits in schizophrenia: a review of the neurobiology. *Biol Psychiatry* 75, 361-370.

Lissin, D.V., Carroll, R.C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and von Zastrow, M. (1999). Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19, 1263-1272.

Manoach, D.S. (2003). Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. *Schizophr Res* 60, 285-298.

Matsuda, T., and Cepko, C.L. (2004). Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16-22.

Miller, J.A., Ding, S.L., Sunkin, S.M., Smith, K.A., Ng, L., Szafer, A., Ebbert, A., Riley, Z.L., Royall, J.J., Aiona, K., *et al.* (2014). Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature* 508, 199-206.

Mouchlianitis, E., Bloomfield, M.A., Law, V., Beck, K., Selvaraj, S., Rasquinha, N., Waldman, A., Turkheimer, F.E., Egerton, A., Stone, J., and Howes, O.D. (2016). Treatment-Resistant Schizophrenia Patients Show Elevated Anterior Cingulate Cortex Glutamate Compared to Treatment-Responsive. *Schizophr Bull* 42, 744-752.

Ortolani, D., Manot-Saillet, B., Orduz, D., Ortiz, F.C., and Angulo, M.C. (2018). In vivo Optogenetic Approach to Study Neuron-Oligodendroglia Interactions in Mouse Pups. *Front Cell Neurosci* 12, 477.

Perlstein, W.M., Carter, C.S., Noll, D.C., and Cohen, J.D. (2001). Relation of prefrontal cortex dysfunction to working memory and symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158, 1105-1113.

Postle, B.R. (2006). Working memory as an emergent property of the mind and brain. *Neuroscience* 139, 23-38.

Prasad, K.M., Chowdari, K.V., D'Aiuto, L.A., Iyengar, S., Stanley, J.A., and Nimgaonkar, V.L. (2018). Neuropil contraction in relation to Complement C4 gene copy numbers in independent cohorts of adolescent-onset and young adult-onset schizophrenia patients-a pilot study. *Translational psychiatry* 8, 134.

Presumey, J., Bialas, A.R., and Carroll, M.C. (2017). Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease. *Advances in immunology* 135, 53-79.

Purcell, S.M., Wray, N.R., Stone, J.L., Visscher, P.M., O'Donovan, M.C., Sullivan, P.F., and Sklar, P. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460, 748-752.

Ripke, S., Neale, B.M., Corvin, A., and al., e. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421-427.

Rossi, M.A., Hayrapetyan, V.Y., Maimon, B., Mak, K., Je, H.S., and Yin, H.H. (2012). Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice. *J Neurophysiol* 108, 1211-1222.

Roumier, A., Pascual, O., Bechade, C., Wakselman, S., Poncer, J.C., Real, E., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One* 3, e2595.

Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691-705.

Sekar, A., Bialas, A.R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T.R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., *et al.* (2016). Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530, 177-183.

Sellgren, C.M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J.D., Thanos, J.M., Whittredge, P.B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H.E., Wang, J., *et al.* (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat Neurosci* 22, 374-385.

Shi, J., Levinson, D.F., Duan, J., Sanders, A.R., Zheng, Y., Pe'er, I., Dudbridge, F., Holmans, P.A., Whittemore, A.S., Mowry, B.J., *et al.* (2009). Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460, 753-757.

Silver, H., and Feldman, P. (2005). Evidence for sustained attention and working memory in schizophrenia sharing a common mechanism. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 17, 391-398.

Silver, H., Feldman, P., Bilker, W., and Gur, R.C. (2003). Working memory deficit as a core neuropsychological dysfunction in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160, 1809-1816.

Stefansson, H., Ophoff, R.A., Steinberg, S., Andreassen, O.A., Cichon, S., Rujescu, D., Werge, T., Pietilainen, O.P., Mors, O., Mortensen, P.B., *et al.* (2009). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460, 744-747.

Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., *et al.* (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131, 1164-1178.

Uhlhaas, P.J., and Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 11, 100-113.

Wang, H.X., and Gao, W.J. (2010). Development of calcium-permeable AMPA receptors and their correlation with NMDA receptors in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex. *J Physiol* 588, 2823-2838.

- Wang, M., Yang, Y., Wang, C.J., Gamo, N.J., Jin, L.E., Mazer, J.A., Morrison, J.H., Wang, X.J., and Arnsten, A.F. (2013). NMDA receptors subserve persistent neuronal firing during working memory in dorsolateral prefrontal cortex. *Neuron* 77, 736-749.
- Watt, A.J., Sjöström, P.J., Häusser, M., Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (2004). A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP. *Nat Neurosci* 7, 518-524.
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N.L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., *et al.* (2018). Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature communications* 9, 1228.
- Wright, I.C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P.W., David, A.S., Murray, R.M., and Bullmore, E.T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157, 16-25.
- Young, J.W., Kerr, L.E., Kelly, J.S., Marston, H.M., Spratt, C., Finlayson, K., and Sharkey, J. (2007). The odour span task: a novel paradigm for assessing working memory in mice. *Neuropharmacology* 52, 634-645.
- Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., and Gan, W.B. (2005). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46, 181-189.

CHAPITRE 3 :
DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis d'identifier des altérations de la connectivité et des mécanismes de plasticité au cours de deux périodes critiques distinctes du développement cortical : celle de la période critique de dominance oculaire dans le cortex visuel, et celle du raffinement de la connectivité par stabilisation sélective de synapses dans le cortex préfrontal. Dans la première étude, j'ai montré des changements de propriétés synaptiques liés à la composition des récepteurs AMPA et concomitants d'une perte d'expression de GRIP1 dans les interneurons PV. Ces changements sont le produit d'un développement normal du cerveau et reflètent le déroulement d'un programme génétique intrinsèque. Au contraire, dans la deuxième étude, les altérations des propriétés neuronales identifiées résultent d'une surexpression d'un gène du système immunitaire impliqué dans la schizophrénie et, à ce titre, éclairent les mécanismes à l'œuvre dans des conditions pathologiques. Dans les deux cas, les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle du développement des synapses excitatrices au cours du développement cérébral et suscitent des interrogations sur les mécanismes impliqués dans les changements observés. Certaines hypothèses ont été proposées dans les discussions des manuscrits inclus dans ce manuscrit. La présente discussion a pour but de décrire certaines stratégies que nous avons déjà utilisées, ou que nous envisageons d'utiliser dans un avenir proche pour tenter de tester ces hypothèses, mais également de compléter les réflexions déjà esquissées. Pour finir, une conclusion générale portera sur les liens possibles entre plasticité du cortex visuel au cours de la période critique de dominance oculaire et mécanismes de l'élagage synaptique dépendants du complément abordés dans la deuxième partie.

I. IMPLICATION DE LA PROTEINE GRIP1 DANS LA PERIODE CRITIQUE DE DEVELOPPEMENT DU CORTEX VISUEL

Expression de GRIP1 dans les interneurons PV au cours du développement

Notre hypothèse de travail sur l'implication de la perte d'expression de GRIP1 dans les interneurons PV au cours du développement se base sur les résultats obtenus par l'analyse du transcriptome d'interneurons PV dans le cortex somatosensoriel (Okaty et al., 2009). L'étude a montré que l'expression de GRIP1 est diminuée de façon transitoire à P25, c'est-à-dire pendant la période critique de dominance oculaire dans le cortex visuel (**Figure 0**). Bien que la rectification accrue des courants synaptiques portés par les récepteurs AMPA soit clairement dépendante de GRIP1, comme nous l'avons montré en utilisant des souris PV^{GRIP1 KO}, une des limitations de notre étude est de ne pas montrer cette diminution d'expression protéique de GRIP1 durant la période critique dans le cortex visuel primaire. Au cours de ma thèse, j'ai tenté de vérifier cette perte d'expression transitoire de GRIP1 dans les neurones PV du cortex visuel en utilisant plusieurs approches expérimentales différentes.

J'ai commencé par tenter de visualiser la protéine GRIP1 dans les interneurons PV sur des tissus fixés par immunohistochimie classique sur des tranches épaisses de 40 μm après perfusion de souris sauvages, grâce à un co-immunomarquage de la protéine PV. Cependant, malgré des acquisitions en séries au confocal à fort objectif, nous n'avons pas pu quantifier avec précision la présence de GRIP1 dans les interneurons PV. En effet, le marquage GRIP1 étant présent dans la majorité des synapses excitatrices corticales et fortement exprimé par les cellules pyramidales, comme l'ont révélé des études de western blot (Dong et al., 1999a), un fort marquage se retrouve sur les tranches de cortex et il ne nous a pas été possible d'analyser spécifiquement l'expression dans les interneurons PV. Nous avons donc tenté une autre approche, plus précise : l'« *Array Tomographie* ». Cette technique est une méthode de microscopie volumétrique basée sur la coupe en série d'échantillons de tissu nerveux. Des sections ultrafines sont coupées à l'aide d'un ultra-microtome, collées sur une lamelle de verre, et immunomarcuées avant imagerie. Les images bidimensionnelles qui en résultent peuvent ensuite être reconstruites en images tridimensionnelles pour la visualisation et l'analyse quantitative. L'épaisseur faible des coupes individuelles permet un marquage efficace et rapide de nombreuses sections, et l'imagerie est automatisée (Micheva and Smith, 2007). En collaboration avec Mariano Soiza-Reilly à l'Institut du Fer à Moulin, nous avons étudié la colocalisation d'immunomarquages GRIP1, VgluT1, VgluT2 et PV par *Array Tomography*. Ce travail n'a pas permis de révéler de clusters synaptiques d'expression de GRIP1, ni même d'expression claire de GRIP1, dans les dendrites de neurones PV avec l'anticorps que nous possédions. Après l'obtention des souris triples transgéniques PV^{GRIP1 KO}, nous avons pu tester plusieurs anticorps anti-GRIP1 sur des tranches de cortex visuel dans ces souris et montrer qu'un marquage GRIP1 diffus était encore présent dans les neurones PV, démontrant leur insuffisante spécificité pour des études d'immunohistochimie.

Nous avons donc entrepris de quantifier l'expression des ARNm de GRIP1 dans les neurones PV du cortex visuel à différents stades de développement postnatal. Nous avons utilisé pour ce faire deux techniques permettant d'évaluer l'expression des gènes dans des cellules uniques : 1) le séquençage haut débit d'ARN de cellules uniques (*single-cell RNA seq*) et 2) une technique récente d'hybridation *in situ* semi-quantitative, le RNAscope (Wang et al., 2014). Le *single-cell RNaseq* est une technique de plus en plus utilisée permettant d'évaluer l'abondance des transcrits de chaque gène, c'est-à-dire le nombre de fois qu'un même transcrit a été séquençé, à partir du matériel cytosolique d'une seule cellule. Pour cela, nous avons identifié des interneurons PV fluorescents sur des tranches de cortex visuel de souris de la lignée G42, préparées comme pour des expériences d'électrophysiologies (tranches aiguës) et récupéré le cytoplasme et le noyau de cellules par aspiration grâce à des pipettes remplies d'une solution permettant la conservation des molécules d'ARNs. Nous avons envoyé des échantillons provenant de 24 cellules par stade de développement étudié (avant ouverture de l'œil, avant la période critique, pendant la période critique et post-période critique), soit en tout 96 échantillons, à nos collaborateurs à l'université Ludwigs Maximilian de Munich (département de génétique humaine, PI Wolfgang Enard) afin qu'ils

réalisent la transcription réverse, l'amplification et le séquençage des transcrits. Bien que les résultats aient montré une très bonne profondeur de séquençage par échantillon (plus de 8000 transcrits différents obtenus par échantillon), les résultats ne nous ont pas permis de conclure quant à l'expression de GRIP1 à cause d'une trop grande variabilité inter-cellules. Un nombre d'échantillons considérablement plus élevé aurait été nécessaire. C'est également le cas avec la méthode de RNAscope que nous avons utilisée. Cette technique est basée sur la méthode l'hybridation *in situ*, qui utilise des sondes synthétisées à partir de la séquence de l'ARNm d'un gène cible. La spécificité du RNAscope est fondée sur l'utilisation de sondes multiples et de petite taille (une vingtaine en général, d'environ 20 nucléotides chacune) contre la séquence cible. Seule la détection de multiples sondes appariées permet l'amplification du signal, ce qui favorise la suppression du bruit de fond et peut permettre de visualiser l'expression de molécules d'ARN uniques tout en préservant la morphologie des tissus. Il est donc possible, en théorie, de visualiser sur tranches de tissu fixé le nombre d'ARNm exprimés dans une cellule unique. Cette technique peut être utilisée de manière conjointe avec l'immunohistochimie. En utilisant des souris exprimant la GFP dans les interneurons PV (lignée PV-Cre ; RCE), il nous a été possible de compter les clusters de fluorescence correspondant à l'expression de l'ARN de GRIP1 au niveau du cytosol des interneurons PV. Mais, comme dans le cas du *single-cell RNA seq*, le nombre d'échantillons utilisés lors de nos expériences ne nous a pas permis d'observer une différence significative au cours du développement, en raison d'une forte variabilité d'expression d'une cellule à l'autre, et surtout d'un animal à l'autre. Les résultats semblent en particulier très sensibles à la qualité de la fixation des tissus par le paraformaldéhyde, puisque le nombre de clusters intracellulaires de GRIP1 était corrélé à la présence d'autofluorescence dans les vaisseaux sanguins, un indice de marquage incomplet des tissus.

Réexpression de GRIP1 pendant la période critique : l'absence de GRIP1 détermine-t-elle la perte de GluA2 et l'absence de plasticité homéostatique aux synapses des neurones PV pendant la période critique ?

Contrairement à la grande majorité des autres gènes dont l'expression est stable ou varie de manière monotonique au cours du développement, l'expression de GRIP1 diminue de façon transitoire à P25 (Okaty et al., 2009). Nos résultats obtenus dans les souris PV^{GRIP1 KO} montrent que l'expression de GRIP1 dans les neurones PV est *nécessaire* pour la présence de GluA2 aux synapses et la plasticité en dehors de la période critique. Cependant, il reste à déterminer si la présence de GRIP1 est *suffisante* pendant la période critique pour restaurer la présence de GluA2 dans les récepteurs AMPA, et la plasticité synaptique en réponse à une fermeture de l'œil.

Pour répondre à cette question, nous avons tenté à l'aide de plusieurs vecteurs viraux différents de ré-exprimer GRIP1 sélectivement dans les neurones PV pendant la période critique dans le cortex visuel de

souris PV-Cre ; RCE. Nous avons fait synthétiser plusieurs vecteurs viraux au cours de ces 4 années de thèse dont les caractéristiques sont détaillées ci-dessous.

Stratégie Virale	Vecteur	Promoteur	Séquence	Taille	Efficacité
Lentivirus	pFU	Ubiquitine	DIO-GRIP1-HA-T2A-GFP	13.5kB	Pas de fluorescence
AAV 2.9	pAAV	hSynapsine	DIO-TdTomato	5.6kB	Pas de fluorescence
AAV 2.9	pAAV	hSynapsine	DIO-GRIP1-HA	7.4kB	Pas d'expression de HA
Lentivirus	pCDH	CAG	DIO-TdTomato	13.9kB	<i>En cours de synthèse</i>
Lentivirus	pCDH	CAG	DIO-GRIP1-HA	15.8kB	<i>En cours de synthèse</i>

TABLE I : STRATEGIES VIRALES POUR LA REEXPRESSION DE GRIP1 DANS LES INTERNEURONES PV

L'ensemble des constructions ayant été utilisées pour fabriquer les vecteurs viraux ont été validées sur des cultures primaires de neurones, où l'expression des protéines TdTomato et GRIP1-HA a été observée par épifluorescence (tdTomato) ou immunomarquage anti-HA. Malheureusement, aucun des virus synthétisés ne nous a actuellement permis de ré-exprimer tdTomato ou GRIP1 *in vivo* dans les interneurones.

La première stratégie que nous avons envisagée est l'utilisation d'un lentivirus contenant à la fois la séquence d'une protéine fluorescente et la séquence de GRIP1-HA séparées par une séquence T2A, l'ensemble étant flanqué de doubles séquences LoxP pour expression sous le contrôle de la Cre recombinase (système FLEX, aussi appelé *Double inverted open reading frame* ou *DIO*), sous le contrôle du promoteur Ubiquitin C. Les peptides 2A, dont T2A fait partie, sont une classe de peptides permettant d'induire le clivage d'une protéine recombinante une fois synthétisée dans la cellule (Szymczak-Workman et al., 2012) et ainsi d'assurer la synthèse simultanée de deux protéines dans une même cellule. Par conséquent, l'observation de fluorescence dans des cellules sur des tranches de cortex signifie qu'il y a également eu expression de la protéine d'intérêt. De plus, nous avons marqué en C-terminal la protéine GRIP1 avec un tag HA, afin de pouvoir discerner par immunohistochimie sur tranches spécifiquement les protéines GRIP1 provenant de l'expression virale et de l'expression endogène. Après avoir vérifié l'expression correcte de la construction sur des cultures de cellules COS sous le contrôle de la Cre recombinase, nous avons réalisé plusieurs essais d'injections virales dans le cortex visuel de souris sans observer une seule fois de la fluorescence dans les interneurones PV.

Certaines études ont démontré une meilleure efficacité d'infection des interneurones *in vivo* par les AAV que par les lentivirus (Mancini and Horvath, 2018), nous avons donc décidé d'utiliser ces vecteurs. Contrairement aux lentivirus, les AAV sont des virus de petite taille ne s'insérant pas dans le génome des cellules hôtes. Leur capacité génomique ne dépasse pas 4,7kB. *GRIP1* est un gène de grande taille

(3,3kB ; NM_001277295), par conséquent l'utilisation d'un vecteur exprimant GRIP1 plus une protéine rapportrice (1,4 kb dans le cas de tdTomato) n'était pas envisageable. Nous avons donc décidé de synthétiser deux AAV destinés à être co-injectés dans le cortex visuel chez la souris, l'un pour la sur-expression conditionnelle de GRIP1 et l'autre pour la sur-expression conditionnelle de tdTomato. Après avoir déterminé les meilleures caractéristiques pour infecter les interneurons corticaux et obtenir une diffusion optimale (Watakabe et al., 2015), et vérifié l'expression des constructions sous contrôle de la Cre dans des cultures de neurones, nous avons injecté les deux AAV dans le cortex visuel de souris. Nous avons réalisé différents essais d'injection à différents stades de développement (juste après la naissance, chez la souris juvénile à P17 et chez la souris adulte de plus de 40 jours). Cependant, même 4 semaines après l'injection des virus, aucune fluorescence n'a été retrouvée sur des tranches de cortex à proximité du site d'injection. L'absence d'efficacité de ces AAV pourrait provenir de la séquence régulatrice post-transcriptionnelle WPRE que nous avons ajoutée à la fin de la séquence. En effet, GRIP1 étant de grande taille et la capacité de l'AAV étant limitée, nous avons optimisé les différentes autres parties du plasmide et sélectionné un WPRE tronqué, ayant déjà montré une efficacité dans des virus utilisés en culture mais pas *in vivo*. Nous avons décidé d'utiliser le promoteur hSyn (*human synapsin 1*) car il s'agit d'un promoteur de petite taille ayant déjà été utilisé dans des constructions ciblant des interneurons (Dimidschstein et al., 2017; Nathanson et al., 2009). Cependant, il est possible que ce promoteur ne soit pas assez puissant pour une expression optimale dans les interneurons PV corticaux. Une dernière possibilité est que la recombinaison n'ait pas eu lieu *in vivo* en dépit de l'infection des cellules cibles par le vecteur viral.

Nous sommes actuellement en train de synthétiser une autre construction afin de générer un autre lentivirus permettant de ré-exprimer GRIP1 de manière conditionnelle. Nous avons inséré dans le vecteur lentiviral une nouvelle séquence FLEX légèrement différente de la séquence FLEX utilisée auparavant, que nous avons validée *in vivo* par injection d'un AAV-FLEX-tdTomato commercial (Addgene) dans les souris PV-Cre ; RCE. Nous avons opté pour un promoteur CAG, promoteur dont nous avons vérifié qu'il induisait une expression forte dans les neurones PV *in vivo*. La séquence GRIP1 a été sous-clonée en remplacement de tdTomato. Deux constructions ont ainsi été générées : l'une contrôle, exprimant tdTomato, et l'autre exprimant GRIP1 muni d'un tag HA.

Les expériences planifiées devraient pouvoir nous permettre de ré-exprimer GRIP1 dans les interneurons PV au cours de la période critique, et déterminer si cette expression est suffisante pour restaurer GluA2 dans les récepteurs AMPA dans les interneurons PV ainsi que la plasticité en réponse à une déprivation visuelle. Nous envisageons à terme d'utiliser ce système pour tester si la réexpression de GRIP1 pendant la période critique permet de bloquer la plasticité de dominance oculaire *in vivo*. Ces dernières expériences seront cruciales pour démontrer l'importance de l'expression de GRIP1 dans les neurones PV pour la plasticité du cortex visuel.

Modification aux afférences excitatrices sur les interneurons PV : le changement de rectification des courants AMPA se produit-il à toutes les synapses excitatrices ?

Une autre question importante dans la compréhension des phénomènes moléculaires sous-tendant la période critique de dominance oculaire est de savoir si les changements de composition des récepteurs AMPA se produisent de la même manière aux différentes afférences excitatrices dans les interneurons PV. En effet la maturation des afférences excitatrices thalamo-corticales et cortico-corticales n'est pas identique (Miao et al., 2016). Les règles de plasticité à ces différentes synapses diffèrent dans les interneurons PV (Miao et al., 2016). De plus, des disparités ont été constatées dans les fonctions de protéines synaptiques à ces synapses dans les interneurons PV. Par exemple, SynCam-1 est indispensable pour la maturation des afférences thalamo-corticales, mais pas cortico-corticales, et son expression est nécessaire pour la maturation des interneurons PV (Ribic et al., 2019). Une régulation fine de la composition en sous-unité des récepteurs AMPA est ainsi envisageable. La composition en sous-unités des récepteurs AMPA dictant les règles de plasticité aux synapses excitatrices, il est possible d'imaginer une disparité de plasticité entre les afférences thalamo-corticales et corticales.

L'utilisation de l'optogénétique pourrait permettre d'étudier cette question : l'injection d'un virus contenant la séquence de la Channelrhodopsine sous le contrôle d'un promoteur exprimé par les cellules excitatrices soit dans le cortex visuel, soit dans le dLGN permettrait de distinguer les différentes afférences excitatrices. Une injection tôt au cours du développement permettrait d'enregistrer les courants médiés par les récepteurs AMPA dans les interneurons PV pendant et après la période critique. L'analyse des index de rectification en réponse à des stimulations provenant soit du cortex soit du dLGN au cours du développement renseignerait sur la présence de GluA2 dans les récepteurs AMPA.

Lien entre *synaptic scaling* et augmentation de la fréquence des courants miniatures en réponse à une déprivation monoculaire

Notre observation d'une augmentation de la fréquence des courants miniatures excitateurs dans les neurones PV en réponse à une déprivation visuelle, et l'absence de modification de leur amplitude, est surprenante. Le *synaptic scaling* en réponse à une baisse de l'activité persistante de la synapse, qui se traduit par une augmentation homéostatique de l'amplitude des courants miniatures, a été démontré dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* et les mécanismes moléculaires impliqués commencent à être bien caractérisés (Barnes et al., 2017; Desai et al., 2002; Goel et al., 2011; Wang and Gao, 2010). Des modifications de la taille des épines dendritiques sont observées dans des tranches organotypiques d'hippocampe en réponse à 72h d'exposition à la tétrodontoxine. Ce résultat est corrélé à une augmentation de l'amplitude des courants excitateurs suggérant une augmentation du nombre de récepteurs AMPA aux synapses (Hobbiss et al., 2018). De même, l'étude *in vivo* de cellules pyramidales et d'interneurons dans les couches II/III du cortex visuel en réponse à une énucléation a révélé une forte

augmentation de la taille des épines et synapses après 48h (Barnes et al., 2017). Dans notre étude, nous avons observé non pas une augmentation de l'amplitude des courants miniatures excitateurs mais une augmentation de la fréquence de ces courants. Le rôle postsynaptique de GRIP1, démontré par l'absence de cette plasticité homéostatique dans les souris PV^{GRIP1 KO}, suggère que l'augmentation de la fréquence des courants miniatures traduit une augmentation du nombre de synapses plutôt qu'une augmentation de la probabilité de libération du glutamate. Notre hypothèse de travail est qu'un mécanisme de *synaptic scaling* pourrait se mettre en place assez rapidement aux synapses excitatrices sur les interneurons PV, et induire une augmentation de la taille de la densité post-synaptique qui se scinderait ensuite pour former plusieurs synapses. Dans les cellules pyramidales, la scission des épines dendritiques pour produire plusieurs synapses, par exemple après des protocoles de potentialisation à long terme, a été envisagée comme un concept théorique (Carlin and Siekevitz, 1983) mais n'a jamais été observée expérimentalement (Berry and Nedivi, 2017; Bosch et al., 2014). Cependant, les synapses excitatrices sur les neurones PV se font pour l'essentiel directement sur les dendrites, et seulement rarement sur des épines, ce qui leur confèrent des propriétés distinctes (Sancho and Bloodgood, 2018). L'une des prédictions testables de notre hypothèse est qu'une augmentation de l'amplitude des courants miniatures excitateurs dans les neurones PV pourrait être observée en réponse à des déprivations monoculaires plus courtes (par exemple 24h au lieu de 72h). Afin de tester cette hypothèse, nous avons commencé à enregistrer les courants miniatures excitateurs dans les interneurons PV en réponse à 24h de déprivation visuelle.

II. ROLE DE C4 DANS LA PERIODE CRITIQUE D'ELAGAGE SYNAPTIQUE DU CORTEX PREFRONTAL

Lien entre le système du complément, turnover synaptique et microglies

Nos travaux ont montré qu'une expression accrue du gène C4 du complément dans le cortex de souris engendre des phénotypes corticaux qui, chez l'homme, ont été associés à la schizophrénie. Notamment, nous avons observé une diminution du nombre de synapses excitatrices dans le cortex préfrontal en réponse à la sur-expression de C4. Il est intéressant de noter que la diminution de la fréquence des courants miniatures est présente à partir de P16, au pic de l'élagage synaptique dans le cortex, mais n'est pas observable à un stade plus précoce (P8-P10) bien que la sur-expression de C4 commence dès la genèse embryonnaire des cellules pyramidales. Ceci suggère que C4 n'intervient dans le raffinement synaptique qu'à un stade assez tardif du développement postnatal, auquel les réseaux deviennent sensibles à l'action du complément. Les mécanismes sous-jacents restent à identifier : cet effet « à retardement » du complément pourrait être dû à l'expression tardive de molécules du complément nécessaire à l'activation de la cascade dont C4 n'est qu'un composant, ou l'expression tardive de récepteurs au complément, exprimés notamment par les cellules gliales impliquées dans le raffinement synaptique. Le timing de l'effet pourrait aussi être déterminé par l'expression de molécules cibles du complément par les synapses.

Les expériences de microscopie bi-photonique *in vivo* menées par nos collaborateurs à Bonn ont fourni un résultat inattendu, en révélant une diminution du turnover des épines dendritiques, c'est-à-dire une diminution à la fois de leur formation et de leur élimination, en réponse à une expression élevée de C4. Une étude publiée en 2020 utilisant un paradigme expérimental semblable au nôtre, c'est-à-dire une sur-expression de C4 dans le cortex préfrontal chez la souris par électroporation *in utero*, a aussi conclu à une diminution de la densité des épines dendritiques. Les résultats de cette étude montrent une augmentation des inclusions présynaptiques dans les microglies de souris âgées de 21 jours, ainsi qu'une expression accrue de marqueurs associé à la phagocytose (Comer et al., 2020). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que premièrement : le système du complément est impliqué dans la diminution de la densité des épines dendritiques, résultant d'un défaut de formation et d'élimination synaptique ; et deuxièmement que les cellules immunitaires et notamment les microglies sont impliquées dans le processus. Mais comment articuler la diminution de formation synaptique que nous avons observée avec l'augmentation de l'activité phagocytaire des microglies ?

Une étude de la densité des épines dendritiques dans du tissu cortical *post-mortem* de patients schizophrènes a montré que les épines qui disparaissent chez les patients sont celles de faible volume, c'est-à-dire les plus immatures. Les auteurs en concluent que c'est vraisemblablement la formation ou la

stabilisation des synapses immatures qui est affectée dans le cortex schizophrène au cours du développement, plutôt que l'élimination de synapses établies (Knott and Holtmaat, 2008; MacDonald et al., 2017).

La diminution du turnover observé dans notre modèle pourrait ainsi être causée par une phagocytose trop importante par les microglies des synapses en formation ou tout juste formées, empêchant leur stabilisation et donc provoquant la diminution de la densité d'épines. La disparition de ces épines en moins de 4h, la fenêtre temporelle utilisée pour nos acquisitions de microscopie bi-photonique dynamique, donnerait ainsi l'illusion d'une « formation » moindre des synapses, alors qu'il pourrait s'agir avant tout d'une stabilisation déficiente. La diminution concomitante de l'élimination des épines pourrait simplement s'expliquer par le fait que les épines immatures, dont le turnover est élevé, sont moins présentes : ne resteraient en effet que les épines les plus matures, qui sont les moins susceptibles d'être éliminées.

Voies moléculaires impliquées dans les effets de la surexpression de C4

Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'élagage synaptique par les microglies ont été identifiées. L'une dépend du récepteur CR3 du complément, uniquement exprimé par les microglies dans le cerveau, sur lequel vient se fixer C3b, un produit de la protéolyse de C3 (Schafer et al., 2012). Une autre dépend du récepteur aux fractalkines, Cx3CR1 (Paolicelli et al., 2011). Ces deux voies n'agissent pas dans les mêmes régions du cerveau. Par exemple, dans le cortex en tonneaux et l'hippocampe, la voie fractalkine/Cx3CR1 est impliquée dans l'élagage synaptique dépendant de l'activité (Gunner et al., 2019; Hoshiko et al., 2012; Paolicelli et al., 2011); et indépendant de CR3 dans l'hippocampe (Weinhard et al., 2018). A l'inverse, CR3 joue un rôle clé dans l'élagage synaptique au cours du développement du système réticulo-géniculé (Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007). Étant donné que C4 est en amont de C3 dans la voie classique du complément, il est plausible que la surexpression de C4 dans le cortex provoque une augmentation locale des produits de protéolyse de C3 (C3a et C3b), engendrant une élimination synaptique exubérante par l'intermédiaire de la voie C3b/CR3. L'utilisation de souris knock-out pour le récepteur CR3 permettrait d'étudier l'implication de cette voie (Schafer et al., 2012). Cependant, une autre voie de signalisation est à envisager dans le contexte d'élagage synaptique dépendant du complément. En effet, la protéolyse de C3 génère aussi C3a, qui est une anaphylatoxine impliquée dans la réponse inflammatoire en se fixant sur son récepteur C3aR présent à la surface des macrophages. Dans le cerveau, C3aR est exprimé par les microglies (Davoust et al., 1998). L'interaction C3a/C3aR a été impliquée dans la diminution du nombre de synapses dans plusieurs modèles de pathologies dont Alzheimer et le virus Nile West (Litvinchuk et al., 2018; Vasek et al., 2016). Par exemple, l'expression de C3 et C3aR est augmentée dans le modèle murin PS19, qui est utilisé pour étudier l'effet des plaques A β dans la pathologie d'Alzheimer. L'ablation génétique du récepteur C3aR

bloque la perte de synapses caractéristiques du cortex des souris PS19, ce qui implique directement C3aR dans l'élimination synaptique (Litvinchuk et al., 2018). Par conséquent, la voie C3a/C3aR pourrait aussi jouer un rôle dans la perte de synapses chez les souris qui sur-expriment C4. L'électroporation de C4 dans des souris C3aR KO permettrait de déterminer si cette voie est impliquée dans la perte de synapses observée dans notre modèle.

III. INFLUENCES CROISEES DES DEUX PERIODES CRITIQUES ETUDIEES

Les périodes critiques dont j'ai étudié certains mécanismes dans le cadre de mes projets de doctorat se recouvrent partiellement : l'élagage synaptique dépendant du complément, bien qu'incomplètement caractérisé dans certaines régions du néocortex, semble culminer au cours de la troisième semaine de développement postnatal chez la souris (Holtmaat et al., 2005), au moment du début de la période de dominance oculaire dans le cortex visuel. Chez l'homme, ces deux périodes se recouvrent aussi largement : la plasticité de dominance oculaire se poursuit jusqu'à l'âge de sept ans, puis à moindre degré jusqu'à douze ans environ (Scheiman et al., 2005), tandis que la densité synaptique dans le cortex connaît un pic pendant l'enfance (entre 3 et 7 ans) avant un déclin jusqu'à la fin de l'adolescence (Huttenlocher, 1979; Petanjek et al., 2011). Le raffinement synaptique développemental pourrait-il influencer, voire favoriser la période critique de dominance oculaire dans le cortex visuel ? A l'inverse, les reconfigurations du cortex visuel pendant la période critique de dominance oculaire pourraient-elles modifier l'expression du complément et les interactions microglies-neurones ?

Le développement de l'imagerie bi-photonique *ex vivo* et *in vivo* a permis d'étudier les épines dendritiques « en temps » réel, c'est-à-dire leur dynamique de formation, de disparition et de stabilisation au cours du temps. L'utilisation de cette technique a permis de montrer que la modulation de l'activité neuronale par les expériences sensorielles change le turnover ainsi que la densité d'épines dendritiques dans le cortex (Holtmaat et al., 2008; Keck et al., 2008; Trachtenberg et al., 2002). La plasticité structurelle des épines dendritiques persiste jusqu'à l'âge adulte, mais varie en fonction du stade de développement (Majewska and Sur, 2003). Dans le cortex visuel de souris par exemple, l'étude de la motilité des épines dendritiques de la dendrite apicale des neurones de la couche V *in vivo* a montré une diminution significative de la formation et de la disparition de tous les types d'épines dendritiques entre la période pré-critique et la période critique (Majewska and Sur, 2003). Ce résultat à lui seul ne prouve pas l'importance des changements du turnover des épines dans l'ouverture de la période critique : la diminution de la dynamique de formation et d'élimination des épines se poursuit de manière graduelle jusqu'à l'âge adulte dans le néocortex (Holtmaat et al., 2005; Majewska and Sur, 2003), et pourrait ne pas jouer de rôle déterminant dans la plasticité accrue du réseau spécifiquement entre P21 et P35. Cependant, certaines observations montrent qu'une déprivation visuelle engendre une augmentation de la motilité des épines dendritiques spécifiquement pendant la période critique ainsi qu'une diminution de leur densité (Majewska and Sur, 2003; Tremblay et al., 2010). Ceci suggère l'existence de mécanismes spécifiques à la période critique de dominance oculaire dans le remodelage des synapses excitatrices portées par les épines. Bien que les mécanismes responsables de la plasticité accrue des épines dendritiques pendant la période critique dans le cortex visuel ne soient pas bien connus, il est établi que

les microglies participent directement à ce phénomène. Plusieurs modifications morphologiques des microglies ont été observées après déprivation visuelle pendant la période critique de dominance oculaire : une augmentation du nombre de contacts avec les synapses (Tremblay et al., 2010), une hyperamification de leurs prolongements (Sipe et al., 2016), ainsi qu'une augmentation de l'activité phagocytaire (Welsh et al., 2020).

Comme je l'ai détaillé dans l'introduction, les microglies établissent des contacts étroits avec les synapses afin d'en contrôler l'homéostasie et réguler des phénomènes de plasticité. Elles contrôlent notamment le nombre de contacts synaptiques, par élimination de synapses, mais aussi possiblement en favorisant la genèse de filipodes à partir de la tête de l'épine dendritique (Weinhard et al., 2018). Il a été démontré que ces processus sont dépendants de l'activité neuronale dans plusieurs modèles (Schafer et al. 2012 ; Tremblay 2010 ; Sipe et al 2016). Par exemple, dans le cortex somatosensoriel, une lésion des vibrisses provoquant une diminution de l'activité des afférences thalamo-corticales engendre une élimination de ces synapses qui dépend de la voie Fractalkine/Cx3CR1 des microglies (Gunner et al., 2019). Des études ont cherché à déterminer si cette voie était également impliquée dans la période critique du cortex visuel (Lowery et al., 2017; Schechter et al., 2017). Cependant, ces deux études ont montré que la plasticité dépendante de l'expérience dans le cortex visuel primaire se produisait normalement en l'absence de l'expression du récepteur Cx3CR1 dans les microglies. De plus, les auteurs de ces études ont observé une augmentation de l'activité phagocytaire des microglies même en l'absence de Cx3CR1. Ces résultats suggèrent que la diminution d'activité neuronale affecte bien les microglies et qu'elle joue un rôle dans l'élimination synaptique, mais par l'intermédiaire d'une autre voie. Comme nous l'avons évoqué à de multiples reprises dans ce manuscrit, le complément agit comme médiateur de l'élagage synaptique dans différentes régions du cerveau et de façon dépendant de l'activité (Schafer et al., 2012). Il pourrait ainsi être impliqué dans la communication neurones-microglie pour favoriser la plasticité des épines au cours de la période critique du cortex visuel. L'équipe de Beth Stevens à Harvard, ayant démontré plusieurs années auparavant l'implication de C1q, C3 et C4 dans l'élagage synaptique dans le dLGN (Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012; Sekar, et al., 2016), a testé l'hypothèse d'une implication de C1q dans la plasticité de dominance oculaire dans le cortex visuel en utilisant des souris knock-out pour C1q. Aucun déficit de densité d'épines dendritiques dans les cellules pyramidales du cortex visuel en réponse à une déprivation visuelle n'a été observé chez souris knock-out pour C1q ; de plus, la plasticité de dominance oculaire se déroule normalement chez ces souris. La déprivation visuelle n'entraîne pas non plus de changements d'expression de C1q chez les souris sauvages (Welsh et al., 2020). Cette dernière étude montre que le système du complément, ou du moins la voie classique du complément initiée par C1q, n'est pas impliqué dans le phénomène de plasticité de dominance oculaire. D'autres études seront nécessaires afin d'identifier la ou les voies de signalisation impliquant les microglies dans le changement de motilité des épines dendritiques au cours de la période critique de dominance oculaire. Une voie intéressante à explorer est celle du récepteur purinergique P2Y12 (Haynes

et al., 2006). Ce récepteur, couplé à une protéine $G_{i/o}$, est impliqué dans la motilité des prolongements microgliaux et son ablation perturbe la réponse des microglies en réponse à une déprivation monoculaire (Sipe et al., 2016).

L'ensemble de ces études démontrent que le remodelage des synapses glutamatergiques portées par les épines dendritiques ne dépend pas d'un mécanisme unique, et que différents acteurs et voies de signalisation sont impliqués en fonctions des régions et des stades de développement. La formation et l'élimination des épines dendritiques sont des processus finement régulés, dont l'étude des mécanismes moléculaires devrait permettre d'apporter un éclairage nouveau sur les pathologies neuro-développementales comme les troubles du spectre de l'autisme et la schizophrénie qui présentent des anomalies de connectivité corticale.

RÉFÉRENCES

- Aarum, J., Sandberg, K., Haerberlein, S.L.B., Persson, M.A.A., 2003. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15983–15988. <https://doi.org/10.1073/pnas.2237050100>
- Acsády, L., Arabadzisz, D., Freund, T.F., 1996. Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73, 299–315. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00610-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00610-9)
- Akbarian, S., 1995. Gene Expression for Glutamic Acid Decarboxylase Is Reduced Without Loss of Neurons in Prefrontal Cortex of Schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 258. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950160008002>
- Alcántara, S., Ruiz, M., D’Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., Soriano, E., 1998. Regional and Cellular Patterns of *reelin* mRNA Expression in the Forebrain of the Developing and Adult Mouse. *J. Neurosci.* 18, 7779–7799. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-19-07779.1998>
- Allene, C., Lourenço, J., Bacci, A., 2015. The neuronal identity bias behind neocortical GABAergic plasticity. *Trends Neurosci.* 38, 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.07.008>
- Alliot, F., Godin, I., Pessac, B., 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* 117, 145–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3)
- Anderson, S.A., 2002. Distinct Origins of Neocortical Projection Neurons and Interneurons In Vivo. *Cereb. Cortex* 12, 702–709. <https://doi.org/10.1093/cercor/12.7.702>
- Anggono, V., Clem, R.L., Huganir, R.L., 2011. PICK1 Loss of Function Occludes Homeostatic Synaptic Scaling. *J. Neurosci.* 31, 2188–2196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5633-10.2011>
- Anggono, V., Huganir, R.L., 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.12.006>
- Antonini, A., Fagiolini, M., Stryker, M.P., 1999. Anatomical Correlates of Functional Plasticity in Mouse Visual Cortex. *J. Neurosci.* 19, 4388–4406. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04388.1999>
- Arcelli, P., Frassoni, C., Regondi, M.C., Biasi, S.D., Spreafico, R., 1997. GABAergic Neurons in Mammalian Thalamus: A Marker of Thalamic Complexity? *Brain Res. Bull.* 42, 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(96\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(96)00107-4)
- Arnò, B., Grassivaro, F., Rossi, C., Bergamaschi, A., Castiglioni, V., Furlan, R., Greter, M., Favaro, R., Comi, G., Becher, B., Martino, G., Muzio, L., 2014. Neural progenitor cells orchestrate microglia

migration and positioning into the developing cortex. *Nat. Commun.* 5, 5611. <https://doi.org/10.1038/ncomms6611>

Artola, A., Singer, W., 1987. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330, 649–652. <https://doi.org/10.1038/330649a0>

Balu, D.T., Coyle, J.T., 2012. Neuronal d-serine regulates dendritic architecture in the somatosensory cortex. *Neurosci. Lett.* 517, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.04.020>

Balu, D.T., Li, Y., Puhl, M.D., Benneyworth, M.A., Basu, A.C., Takagi, S., Bolshakov, V.Y., Coyle, J.T., 2013. Multiple risk pathways for schizophrenia converge in serine racemase knockout mice, a mouse model of NMDA receptor hypofunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E2400–E2409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304308110>

Barnes, S.J., Franzoni, E., Jacobsen, R.I., Erdelyi, F., Szabo, G., Clopath, C., Keller, G.B., Keck, T., 2017. Deprivation-Induced Homeostatic Spine Scaling In Vivo Is Localized to Dendritic Branches that Have Undergone Recent Spine Loss. *Neuron* 96, 871–882.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.052>

Basilico, B., Pagani, F., Grimaldi, A., Cortese, B., Di Angelantonio, S., Weinhard, L., Gross, C., Limatola, C., Maggi, L., Ragozzino, D., 2019. Microglia shape presynaptic properties at developing glutamatergic synapses. *Glia* 67, 53–67. <https://doi.org/10.1002/glia.23508>

Bassett, A.S., Chow, E.W., Weksberg, R., 2000. Chromosomal abnormalities and schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* 97, 45–51. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(200021\)97:1<45::aid-ajmg6>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(200021)97:1<45::aid-ajmg6>3.0.co;2-9)

Basu, A.C., Tsai, G.E., Ma, C.-L., Ehmsen, J.T., Mustafa, A.K., Han, L., Jiang, Z.I., Benneyworth, M.A., Froimowitz, M.P., Lange, N., Snyder, S.H., Bergeron, R., Coyle, J.T., 2009. Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol. Psychiatry* 14, 719–727. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.130>

Béchade, C., Cantaut-Belarif, Y., Bessis, A., 2013. Microglial control of neuronal activity. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00032>

Bénard, M., Raoult, E., Vaudry, D., Leprince, J., Falluel-Morel, A., Gonzalez, B.J., Galas, L., Vaudry, H., Fontaine, M., 2008. Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol. Immunol.* 45, 3767–3774. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.05.027>

Benes, F.M., Sorensen, I., Vincent, S.L., Bird, E.D., Sathi, M., 1992. Increased Density of Glutamate-immunoreactive Vertical Processes in Superficial Laminae in Cingulate Cortex of Schizophrenic Brain. *Cereb. Cortex* 2, 503–512. <https://doi.org/10.1093/cercor/2.6.503>

Benes, F.M., Vincent, S.L., Marie, A., Khan, Y., 1996. Up-regulation of GABAA receptor binding on neurons of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Neuroscience* 75, 1021–1031. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00328-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00328-4)

- Bergdolt, L., Dunaevsky, A., 2019. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog. Neurobiol.* 175, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>
- Bergen, S.E., Petryshen, T.L., 2012. Genome-wide association studies of schizophrenia: does bigger lead to better results? *Curr. Opin. Psychiatry* 25, 76–82. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835035dd>
- Berry, K.P., Nedivi, E., 2017. Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron* 96, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., Roumier, A., 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55, 233–238. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>
- Bialas, A.R., Stevens, B., 2013. TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat. Neurosci.* 16, 1773–1782. <https://doi.org/10.1038/nn.3560>
- Blakemore, C., Garey, L.J., Vital-Durand, F., 1978. The physiological effects of monocular deprivation and their reversal in the monkey's visual cortex. *J. Physiol.* 283, 223–262. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012498>
- Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bliss, T.V.P., Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., Hayashi, Y., 2014. Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. *Neuron* 82, 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Bourassa, J., Pinault, D., Deschênes, M., 1995. Corticothalamic Projections from the Cortical Barrel Field to the Somatosensory Thalamus in Rats: A Single-fibre Study Using Biocytin as an Anterograde Tracer. *Eur. J. Neurosci.* 7, 19–30. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01016.x>
- Bourgeois, J., 1997. Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex. *Acta Paediatr.* 86, 27–33. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1997.tb18340.x>
- Bourgeois, J., Rakic, P., 1993. Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J. Neurosci.* 13, 2801–2820. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-07-02801.1993>
- Bourgeois, J.-P., Goldman-Rakic, P.S., Rakic, P., 1994. Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex of Rhesus Monkeys. *Cereb. Cortex* 4, 78–96. <https://doi.org/10.1093/cercor/4.1.78>
- Bourgeois, J.P., Jastreboff, P.J., Rakic, P., 1989. Synaptogenesis in visual cortex of normal and preterm monkeys: evidence for intrinsic regulation of synaptic overproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4297–4301. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.4297>

- Bowie, D., Mayer, M.L., 1995. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15, 453–462. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90049-7)
- Bredt, D.S., Nicoll, R.A., 2003. AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron* 40, 361–379. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00640-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00640-8)
- Briggs, 2010. Organizing principles of cortical layer 6. *Front. Neural Circuits*. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.003.2010>
- Britsch, S., 2007. The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 190, 1–65.
- Broser, P., Grinevich, V., Osten, P., Sakmann, B., Wallace, D.J., 2008. Critical Period Plasticity of Axonal Arbors of Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Rat Somatosensory Cortex: Layer-Specific Reduction of Projections into Deprived Cortical Columns. *Cereb. Cortex* 18, 1588–1603. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm189>
- Brown, A.S., 2012. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev. Neurobiol.* 72, 1272–1276. <https://doi.org/10.1002/dneu.22024>
- Brown, A.S., Begg, M.D., Gravenstein, S., Schaefer, C.A., Wyatt, R.J., Bresnahan, M., Babulas, V.P., Susser, E.S., 2004a. Serologic Evidence of Prenatal Influenza in the Etiology of Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 774. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.8.774>
- Brown, A.S., Hooton, J., Schaefer, C.A., Zhang, H., Petkova, E., Babulas, V., Perrin, M., Gorman, J.M., Susser, E.S., 2004b. Elevated Maternal Interleukin-8 Levels and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring. *Am. J. Psychiatry* 161, 889–895. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.5.889>
- Brown, K.N., Chen, S., Han, Z., Lu, C.-H., Tan, X., Zhang, X.-J., Ding, L., Lopez-Cruz, A., Saur, D., Anderson, S.A., Huang, K., Shi, S.-H., 2011. Clonal Production and Organization of Inhibitory Interneurons in the Neocortex. *Science* 334, 480–486. <https://doi.org/10.1126/science.1208884>
- Butt, S.J.B., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J.G., Fishell, G., 2005. The Temporal and Spatial Origins of Cortical Interneurons Predict Their Physiological Subtype. *Neuron* 48, 591–604. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.034>
- Callaway, E.M., Katz, L.C., 1991. Effects of binocular deprivation on the development of clustered horizontal connections in cat striate cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 745–749. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.745>
- Campo, C.G., Sinagra, M., Verrier, D., Manzoni, O.J., Chavis, P., 2009. Reelin Secreted by GABAergic Neurons Regulates Glutamate Receptor Homeostasis. *PLoS ONE* 4, e5505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005505>
- Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L.J., Sahn, R., Harrison, N.L., Gordon, J.A., Brown, A., Kellendonk, C., 2016. Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol. Psychiatry* 21, 956–968. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.222>

- Canu, E., Agosta, F., Filippi, M., 2015. A selective review of structural connectivity abnormalities of schizophrenic patients at different stages of the disease. *Schizophr. Res.* 161, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.05.020>
- Capsoni, S., Tongiorgi, E., Cattaneo, A., Domenici, L., 1999. Dark rearing blocks the developmental down-regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in layers IV and V of the rat visual cortex. *Neuroscience* 88, 393–403. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00250-4)
- Carlin, R.K., Siekevitz, P., 1983. Plasticity in the central nervous system: do synapses divide? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 3517–3521. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.11.3517>
- Carmona-Fontaine, C., Theveneau, E., Tzekou, A., Tada, M., Woods, M., Page, K.M., Parsons, M., Lambris, J.D., Mayor, R., 2011. Complement Fragment C3a Controls Mutual Cell Attraction during Collective Cell Migration. *Dev. Cell* 21, 1026–1037. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.012>
- Catts, V.S., Lai, Y.L., Weickert, C.S., Weickert, T.W., Catts, S.V., 2016. A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-d-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? *Biol. Psychol.* 116, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2015.10.013>
- Cauli, B., Porter, J.T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., Audinat, E., 2000. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6144–6149. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6144>
- Caulier, L.J., Clancy, B., Connors, B.W., 1998. Backward cortical projections to primary somatosensory cortex in rats extend long horizontal axons in layer I. *J. Comp. Neurol.* 390, 297–310.
- Chang, E.F., 2003. Environmental Noise Retards Auditory Cortical Development. *Science* 300, 498–502. <https://doi.org/10.1126/science.1082163>
- Charil, A., Laplante, D.P., Vaillancourt, C., King, S., 2010. Prenatal stress and brain development. *Brain Res. Rev.* 65, 56–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.06.002>
- Chattopadhyaya, B., 2004. Experience and Activity-Dependent Maturation of Perisomatic GABAergic Innervation in Primary Visual Cortex during a Postnatal Critical Period. *J. Neurosci.* 24, 9598–9611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004>
- Chen, C., Regehr, W.G., 2000. Developmental Remodeling of the Retinogeniculate Synapse. *Neuron* 28, 955–966. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00166-5)
- Chen, Y.-C., Kuo, H.-Y., Bornschein, U., Takahashi, H., Chen, S.-Y., Lu, K.-M., Yang, H.-Y., Chen, G.-M., Lin, J.-R., Lee, Y.-H., Chou, Y.-C., Cheng, S.-J., Chien, C.-T., Enard, W., Hevers, W., Pääbo, S., Graybiel, A.M., Liu, F.-C., 2016. Foxp2 controls synaptic wiring of corticostriatal circuits and vocal communication by opposing Mef2c. *Nat. Neurosci.* 19, 1513–1522. <https://doi.org/10.1038/nn.4380>
- Chini, M., Pöppelau, J.A., Lindemann, C., Carol-Perdiguer, L., Hnida, M., Oberländer, V., Xu, X., Ahlbeck, J., Bitzenhofer, S.H., Mulert, C., Hanganu-Opatz, I.L., 2020. Resolving and Rescuing

- Developmental Miswiring in a Mouse Model of Cognitive Impairment. *Neuron* 105, 60-74.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.042>
- Chowdhury, D., Hell, J.W., 2018. Homeostatic synaptic scaling: molecular regulators of synaptic AMPA-type glutamate receptors. *F1000Research* 7, 234. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13561.1>
- Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., Prince, D.A., 2010. Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7975–7980. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913449107>
- Ciceri, G., Dehorter, N., Sols, I., Huang, Z.J., Maravall, M., Marín, O., 2013. Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1199–1210. <https://doi.org/10.1038/nn.3485>
- Coleman, J.E., Nahmani, M., Gavornik, J.P., Haslinger, R., Heynen, A.J., Erisir, A., Bear, M.F., 2010. Rapid Structural Remodeling of Thalamocortical Synapses Parallels Experience-Dependent Functional Plasticity in Mouse Primary Visual Cortex. *J. Neurosci.* 30, 9670–9682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1248-10.2010>
- Colonnello, V., Iacobucci, P., Fuchs, T., Newberry, R.C., Panksepp, J., 2011. Octodon degus. A useful animal model for social-affective neuroscience research: Basic description of separation distress, social attachments and play. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1854–1863. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.014>
- Comer, A.L., Jinadasa, T., Sriram, B., Phadke, R.A., Kretsge, L.N., Nguyen, T.P.H., Antognetti, G., Gilbert, J.P., Lee, J., Newmark, E.R., Hausmann, F.S., Rosenthal, S., Liu Kot, K., Liu, Y., Yen, W.W., Dejanovic, B., Cruz-Martín, A., 2020. Increased expression of schizophrenia-associated gene C4 leads to hypoconnectivity of prefrontal cortex and reduced social interaction. *PLOS Biol.* 18, e3000604. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000604>
- Cooper, J.A., 2013. Mechanisms of cell migration in the nervous system. *J. Cell Biol.* 202, 725–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305021>
- Coulthard, L.G., Hawksworth, O.A., Li, R., Balachandran, A., Lee, J.D., Seppehrband, F., Kurniawan, N., Jeanes, A., Simmons, D.G., Wolvetang, E., Woodruff, T.M., 2017. Complement C5aR1 Signaling Promotes Polarization and Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells through PKC ζ . *J. Neurosci.* 37, 5395–5407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0525-17.2017>
- Coyle, J.T., Tsai, G., Goff, D., 2003. Converging Evidence of NMDA Receptor Hypofunction in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 318–327. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.020>
- Crozier, R.A., Wang, Y., Liu, C.-H., Bear, M.F., 2007. Deprivation-induced synaptic depression by distinct mechanisms in different layers of mouse visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1383–1388. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609596104>

- Cruikshank, S.J., Ahmed, O.J., Stevens, T.R., Patrick, S.L., Gonzalez, A.N., Elmaleh, M., Connors, B.W., 2012. Thalamic Control of Layer 1 Circuits in Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 32, 17813–17823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3231-12.2012>
- Cruikshank, S.J., Urabe, H., Nurmikko, A.V., Connors, B.W., 2010. Pathway-Specific Feedforward Circuits between Thalamus and Neocortex Revealed by Selective Optical Stimulation of Axons. *Neuron* 65, 230–245. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.025>
- Cunningham, C.L., Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S.C., 2013. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 33, 4216–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013>
- Dalmau, J., Gleichman, A.J., Hughes, E.G., Rossi, J.E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S.K., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., Lynch, D.R., 2008. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 7, 1091–1098. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2)
- Dalmau, J., Lancaster, E., Martinez-Hernandez, E., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., 2011. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol.* 10, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70253-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70253-2)
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.-B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- Dávid, C., Schleicher, A., Zuschratter, W., Staiger, J.F., 2007. The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat: VIP innervation of neocortical PV + interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2329–2340. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05496.x>
- Davis, M.F., Figueroa Velez, D.X., Guevarra, R.P., Yang, M.C., Habeeb, M., Carathedathu, M.C., Gandhi, S.P., 2015. Inhibitory Neuron Transplantation into Adult Visual Cortex Creates a New Critical Period that Rescues Impaired Vision. *Neuron* 86, 1055–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.062>
- Davoust, N., Stahel, P.F., Ames, R., Barnum, S.R., 1998. The receptor the C3a anaphylatoxin is expressed by glial cells and neurons. *J. Neuroimmunol.* 90, 15. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)91272-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)91272-3)
- Daw, N.W., 1998. Critical Periods and Amblyopia. *Arch. Ophthalmol.* 116, 502. <https://doi.org/10.1001/archoph.116.4.502>
- de Baumont, A., Maschietto, M., Lima, L., Carraro, D.M., Olivieri, E.H., Fiorini, A., Barreta, L.A.N., Palha, J.A., Belmonte-de-Abreu, P., Moreira Filho, C.A., Brentani, H., 2015. Innate immune response is differentially dysregulated between bipolar disease and schizophrenia. *Schizophr. Res.* 161, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.10.055>

- De Picker, L., Morrens, M., 2020. Perspective: Solving the Heterogeneity Conundrum of TSPO PET Imaging in Psychosis. *Front. Psychiatry* 11, 362. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00362>
- de Villers-Sidani, E., Chang, E.F., Bao, S., Merzenich, M.M., 2007. Critical Period Window for Spectral Tuning Defined in the Primary Auditory Cortex (A1) in the Rat. *J. Neurosci.* 27, 180–189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3227-06.2007>
- DeBoer, E.M., Kraushar, M.L., Hart, R.P., Rasin, M.-R., 2013. Post-transcriptional regulatory elements and spatiotemporal specification of neocortical stem cells and projection neurons. *Neuroscience* 248, 499–528. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.042>
- DeFelipe, J., Fariñas, I., 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90015-7)
- DeFelipe, J., López-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T.F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P.R., Huang, J., Jones, E.G., Kawaguchi, Y., Kisvárdy, Z., Kubota, Y., Lewis, D.A., Marín, O., Markram, H., McBain, C.J., Meyer, H.S., Monyer, H., Nelson, S.B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J.L.R., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G.M., Sherwood, C.C., Staiger, J.F., Tamás, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., Ascoli, G.A., 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 202–216. <https://doi.org/10.1038/nrn3444>
- DeLisi, L.E., Szulc, K.U., Bertisch, H.C., Majcher, M., Brown, K., 2006. Understanding structural brain changes in schizophrenia. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 71–78.
- Demmer, J., Dragunow, M., Lawlor, P.A., Mason, S.E., Leah, J.D., Abraham, W.C., Tate, W.P., 1993. Differential expression of immediate early genes after hippocampal long-term potentiation in awake rats. *Mol. Brain Res.* 17, 279–286. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90012-E](https://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90012-E)
- Desai, N.S., Cudmore, R.H., Nelson, S.B., Turrigiano, G.G., 2002. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 5, 783–789. <https://doi.org/10.1038/nn878>
- DeVito, L.M., Balu, D.T., Kanter, B.R., Lykken, C., Basu, A.C., Coyle, J.T., Eichenbaum, H., 2011. Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology. *Genes Brain Behav.* 10, 210–222. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00656.x>
- Diering, G.H., Gustina, A.S., Huganir, R.L., 2014. PKA-GluA1 Coupling via AKAP5 Controls AMPA Receptor Phosphorylation and Cell-Surface Targeting during Bidirectional Homeostatic Plasticity. *Neuron* 84, 790–805. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.024>
- Dimidschstein, J., Chen, Q., Tremblay, R., Rogers, S.L., Saldi, G.-A., Guo, L., Xu, Q., Liu, R., Lu, C., Chu, J., Avery, M.C., Rashid, M.S., Baek, M., Jacob, A.L., Smith, G.B., Wilson, D.E., Kosche, G., Kruglikov, I., Rusielewicz, T., Kotak, V.C., Mowery, T.M., Anderson, S.A., Callaway, E.M., Dasen, J.S., Fitzpatrick, D., Fossati, V., Long, M.A., Noggle, S., Reynolds, J.H., Sanes, D.H., Rudy, B., Feng,

- G., Fishell, G., 2017. Addendum: A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nat. Neurosci.* 20, 1033–1033. <https://doi.org/10.1038/nn0717-1033d>
- Discenza, C.B., Reinagel, P., 2012. Dorsal Lateral Geniculate Substructure in the Long–Evans Rat: A Cholera Toxin B Subunit Study. *Front. Neuroanat.* 6. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00040>
- Donat, C.K., Scott, G., Gentleman, S.M., Sastre, M., 2017. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front. Aging Neurosci.* 9, 208. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00208>
- Donato, F., Rompani, S.B., Caroni, P., 2013. Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276. <https://doi.org/10.1038/nature12866>
- Dong, H., O’Brien, R.J., Fung, E.T., Lanahan, A.A., Worley, P.F., Huganir, R.L., 1997. GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* 386, 279–284. <https://doi.org/10.1038/386279a0>
- Dong, H., Zhang, P., Liao, D., Huganir, R.L., 1999a. Characterization, expression, and distribution of GRIP protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 535–540. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11323.x>
- Dong, H., Zhang, P., Song, I., Petralia, R.S., Liao, D., Huganir, R.L., 1999b. Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 6930–6941.
- Dräger, U.C., Olsen, J.F., 1980. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice: MOUSE RETINAL GANGLION CELLS. *J. Comp. Neurol.* 191, 383–412. <https://doi.org/10.1002/cne.901910306>
- Druart, M., Le Magueresse, C., 2019. Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders. *Front. Psychiatry* 10, 573. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00573>
- Dudek, S., Bear, M., 1993. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J. Neurosci.* 13, 2910–2918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-07-02910.1993>
- Elvevåg, B., Goldberg, T.E., 2000. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit. Rev. Neurobiol.* 14, 1–21.
- Enwright III, J.F., Huo, Z., Arion, D., Corradi, J.P., Tseng, G., Lewis, D.A., 2018. Transcriptome alterations of prefrontal cortical parvalbumin neurons in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 23, 1606–1613. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.216>
- Erisir, A., Harris, J.L., 2003. Decline of the Critical Period of Visual Plasticity Is Concurrent with the Reduction of NR2B Subunit of the Synaptic NMDA Receptor in Layer 4. *J. Neurosci.* 23, 5208–5218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05208.2003>
- Eroglu, C., Barres, B.A., 2010. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231. <https://doi.org/10.1038/nature09612>

- Erzurumlu, R.S., Gaspar, P., 2012. Development and critical period plasticity of the barrel cortex: Barrel cortex plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1540–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x>
- Escudero-Esparza, A., Kalchishkova, N., Kurbasic, E., Jiang, W.G., Blom, A.M., 2013. The novel complement inhibitor human CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1) protein promotes factor I-mediated degradation of C4b and C3b and inhibits the membrane attack complex assembly. *FASEB J.* 27, 5083–5093. <https://doi.org/10.1096/fj.13-230706>
- Fagiolini, M., 2004. Specific GABAA Circuits for Visual Cortical Plasticity. *Science* 303, 1681–1683. <https://doi.org/10.1126/science.1091032>
- Fagiolini, M., Hensch, T.K., 2000. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 404, 183–186. <https://doi.org/10.1038/35004582>
- Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L., Maffei, L., 1994. Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: Dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res.* 34, 709–720. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90210-0)
- Faini, G., Aguirre, A., Landi, S., Lamers, D., Pizzorusso, T., Ratto, G.M., Deleuze, C., Bacci, A., 2018. Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons. *eLife* 7, e41520. <https://doi.org/10.7554/eLife.41520>
- Fatemi, S.H., Folsom, T.D., 2009. The Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia, Revisited. *Schizophr. Bull.* 35, 528–548. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn187>
- Feinberg, I., 1982. Schizophrenia: Caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J. Psychiatr. Res.* 17, 319–334. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(82\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0022-3956(82)90038-3)
- Fenelon, K., Xu, B., Lai, C.S., Mukai, J., Markx, S., Stark, K.L., Hsu, P.-K., Gan, W.-B., Fischbach, G.D., MacDermott, A.B., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2013. The Pattern of Cortical Dysfunction in a Mouse Model of a Schizophrenia-Related Microdeletion. *J. Neurosci.* 33, 14825–14839. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1611-13.2013>
- Ferguson, B.R., Gao, W.-J., 2018. PV Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. *Front. Neural Circuits* 12, 37. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>
- Ferland, R.J., Cherry, T.J., Preware, P.O., Morrissey, E.E., Walsh, C.A., 2003. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J. Comp. Neurol.* 460, 266–279. <https://doi.org/10.1002/cne.10654>
- Fillman, S.G., Cloonan, N., Catts, V.S., Miller, L.C., Wong, J., McCrossin, T., Cairns, M., Weickert, C.S., 2013. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 18, 206–214. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.110>
- Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L.R., Marín, O., 2004. Short- and Long-Range Attraction of Cortical GABAergic Interneurons by Neuregulin-1. *Neuron* 44, 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.028>

- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marin, O., Pachnis, V., Kessar, N., 2007. Spatial Genetic Patterning of the Embryonic Neuroepithelium Generates GABAergic Interneuron Diversity in the Adult Cortex. *J. Neurosci.* 27, 10935–10946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007>
- Földy, C., Darmanis, S., Aoto, J., Malenka, R.C., Quake, S.R., Südhof, T.C., 2016. Single-cell RNAseq reveals cell adhesion molecule profiles in electrophysiologically defined neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E5222–E5231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610155113>
- Fonseca, M.I., 2004. Absence of C1q Leads to Less Neuropathology in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 24, 6457–6465. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0901-04.2004>
- Frazer, S., Prados, J., Niquille, M., Cadilhac, C., Markopoulos, F., Gomez, L., Tomasello, U., Telley, L., Holtmaat, A., Jabaudon, D., Dayer, A., 2017. Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT3AR expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat. Commun.* 8, 14219. <https://doi.org/10.1038/ncomms14219>
- Frenkel, M.Y., Bear, M.F., 2004. How Monocular Deprivation Shifts Ocular Dominance in Visual Cortex of Young Mice. *Neuron* 44, 917–923. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.003>
- Friedmann, N., Rusou, D., 2015. Critical period for first language: the crucial role of language input during the first year of life. *Curr. Opin. Neurobiol.* 35, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.003>
- Fu, Y., Tucciarone, J.M., Espinosa, J.S., Sheng, N., Darcy, D.P., Nicoll, R.A., Huang, Z.J., Stryker, M.P., 2014. A Cortical Circuit for Gain Control by Behavioral State. *Cell* 156, 1139–1152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.050>
- Funahashi, R., Maruyama, T., Yoshimura, Y., Komatsu, Y., 2013. Silent synapses persist into adulthood in layer 2/3 pyramidal neurons of visual cortex in dark-reared mice. *J. Neurophysiol.* 109, 2064–2076. <https://doi.org/10.1152/jn.00912.2012>
- Gabbott, P.L., Somogyi, P., 1986. Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the visual cortex (area 17) of the cat. *Exp. Brain Res.* 61, 323–331. <https://doi.org/10.1007/bf00239522>
- Gainey, M.A., Hurvitz-Wolff, J.R., Lambo, M.E., Turrigiano, G.G., 2009. Synaptic scaling requires the GluR2 subunit of the AMPA receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 6479–6489. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3753-08.2009>
- Gainey, M.A., Tataavarty, V., Nahmani, M., Lin, H., Turrigiano, G.G., 2015. Activity-dependent synaptic GRIP1 accumulation drives synaptic scaling up in response to action potential blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E3590–E3599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510754112>
- Gattass, R., Nascimento-Silva, S., Soares, J.G.M., Lima, B., Jansen, A.K., Diogo, A.C.M., Farias, M.F., Botelho, M.M., Eliã P., Mariani, O.S., Azzi, J., Fiorani, M., 2005. Cortical visual areas in monkeys: location, topography, connections, columns, plasticity and cortical dynamics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 709–731. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1629>

Gelman, D.M., Martini, F.J., Nobrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N., Marin, O., 2009. The Embryonic Preoptic Area Is a Novel Source of Cortical GABAergic Interneurons. *J. Neurosci.* 29, 9380–9389. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-09.2009>

†Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP), Stefansson, H., Ophoff, R.A., Steinberg, S., Andreassen, O.A., Cichon, S., Rujescu, D., Werge, T., Pietiläinen, O.P.H., Mors, O., Mortensen, P.B., Sigurdsson, E., Gustafsson, O., Nyegaard, M., Tuulio-Henriksson, A., Ingason, A., Hansen, T., Suvisaari, J., Lonnqvist, J., Paunio, T., Børglum, A.D., Hartmann, A., Fink-Jensen, A., Nordentoft, M., Hougaard, D., Norgaard-Pedersen, B., Böttcher, Y., Olesen, J., Breuer, R., Möller, H.-J., Giegling, I., Rasmussen, H.B., Timm, S., Mattheisen, M., Bitter, I., Réthelyi, J.M., Magnusdottir, B.B., Sigmundsson, T., Olason, P., Masson, G., Gulcher, J.R., Haraldsson, M., Fossdal, R., Thorgeirsson, T.E., Thorsteinsdottir, U., Ruggeri, M., Tosato, S., Franke, B., Strengman, E., Kiemeny, L.A., Melle, I., Djurovic, S., Abramova, L., Kaleda, V., Sanjuan, J., de Frutos, R., Bramon, E., Vassos, E., Fraser, G., Ettinger, U., Picchioni, M., Walker, N., Touloupoulou, T., Need, A.C., Ge, D., Lim Yoon, J., Shianna, K.V., Freimer, N.B., Cantor, R.M., Murray, R., Kong, A., Golimbet, V., Carracedo, A., Arango, C., Costas, J., Jönsson, E.G., Terenius, L., Agartz, I., Petursson, H., Nöthen, M.M., Rietschel, M., Matthews, P.M., Muglia, P., Peltonen, L., St Clair, D., Goldstein, D.B., Stefansson, K., Collier, D.A., 2009. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460, 744–747. <https://doi.org/10.1038/nature08186>

Gerfen, C.R., Paletzki, R., Heintz, N., 2013. GENSAT BAC Cre-Recombinase Driver Lines to Study the Functional Organization of Cerebral Cortical and Basal Ganglia Circuits. *Neuron* 80, 1368–1383. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.016>

Ghosh, A., Antonini, A., McConnell, S.K., Shatz, C.J., 1990. Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347, 179–181. <https://doi.org/10.1038/347179a0>

Gilman, S.R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., Vitkup, D., 2011. Rare De Novo Variants Associated with Autism Implicate a Large Functional Network of Genes Involved in Formation and Function of Synapses. *Neuron* 70, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.021>

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

Glantz, L.A., Lewis, D.A., 2000. Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 65. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.1.65>

Glausier, J.R., Lewis, D.A., 2013. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 251, 90–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.044>

Goel, A., Xu, L.W., Snyder, K.P., Song, L., Goenaga-Vazquez, Y., Megill, A., Takamiya, K., Huganir, R.L., Lee, H.-K., 2011. Phosphorylation of AMPA Receptors Is Required for Sensory Deprivation-Induced Homeostatic Synaptic Plasticity. *PLoS ONE* 6, e18264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018264>

- Gonzalez-Burgos, G., Cho, R.Y., Lewis, D.A., 2015. Alterations in Cortical Network Oscillations and Parvalbumin Neurons in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 77, 1031–1040. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.010>
- Gordon, J.A., Stryker, M.P., 1996. Experience-Dependent Plasticity of Binocular Responses in the Primary Visual Cortex of the Mouse. *J. Neurosci.* 16, 3274–3286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-10-03274.1996>
- Gorelik, A., Sapir, T., Woodruff, T.M., Reiner, O., 2017. Serping1/C1 Inhibitor Affects Cortical Development in a Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Manner. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 169. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00169>
- Grafstein, B., 1971. Transneuronal Transfer of Radioactivity in the Central Nervous System. *Science* 172, 177–179. <https://doi.org/10.1126/science.172.3979.177>
- Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H., Macklis, J.D., 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 755–769. <https://doi.org/10.1038/nrn3586>
- Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F.A., Verrier, D., Manzoni, O.J., Chavis, P., 2007. NMDA Receptor Surface Trafficking and Synaptic Subunit Composition Are Developmentally Regulated by the Extracellular Matrix Protein Reelin. *J. Neurosci.* 27, 10165–10175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1772-07.2007>
- Groh, A., Meyer, H.S., Schmidt, E.F., Heintz, N., Sakmann, B., Krieger, P., 2010. Cell-Type Specific Properties of Pyramidal Neurons in Neocortex Underlying a Layout that Is Modifiable Depending on the Cortical Area. *Cereb. Cortex* 20, 826–836. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp152>
- Groszer, M., Keays, D.A., Deacon, R.M.J., de Bono, J.P., Prasad-Mulcare, S., Gaub, S., Baum, M.G., French, C.A., Nicod, J., Coventry, J.A., Enard, W., Fray, M., Brown, S.D.M., Nolan, P.M., Pääbo, S., Channon, K.M., Costa, R.M., Eilers, J., Ehret, G., Rawlins, J.N.P., Fisher, S.E., 2008. Impaired Synaptic Plasticity and Motor Learning in Mice with a Point Mutation Implicated in Human Speech Deficits. *Curr. Biol.* 18, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.060>
- Gu, Y., Huang, S., Chang, M.C., Worley, P., Kirkwood, A., Quinlan, E.M., 2013. Obligatory Role for the Immediate Early Gene NARP in Critical Period Plasticity. *Neuron* 79, 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.016>
- Gu, Y., Tran, T., Murase, S., Borrell, A., Kirkwood, A., Quinlan, E.M., 2016. Neuregulin-Dependent Regulation of Fast-Spiking Interneuron Excitability Controls the Timing of the Critical Period. *J. Neurosci.* 36, 10285–10295. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4242-15.2016>
- Gunner, G., Cheadle, L., Johnson, K.M., Ayata, P., Badimon, A., Mondo, E., Nagy, M.A., Liu, L., Bemiller, S.M., Kim, K.-W., Lira, S.A., Lamb, B.T., Tapper, A.R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Schaefer, A., Schafer, D.P., 2019. Sensory lesioning induces microglial synapse elimination via ADAM10 and fractalkine signaling. *Nat. Neurosci.* 22, 1075–1088. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0419-y>

- Hall, B.J., Ghosh, A., 2008. Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci.* 31, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.010>
- Hanisch, U.-K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155. <https://doi.org/10.1002/glia.10161>
- Hanisch, U.-K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hannon, E., Spiers, H., Viana, J., Pidsley, R., Burrage, J., Murphy, T.M., Troakes, C., Turecki, G., O'Donovan, M.C., Schalkwyk, L.C., Bray, N.J., Mill, J., 2016. Methylation QTLs in the developing brain and their enrichment in schizophrenia risk loci. *Nat. Neurosci.* 19, 48–54. <https://doi.org/10.1038/nn.4182>
- Hanover, J.L., Huang, Z.J., Tonegawa, S., Stryker, M.P., 1999. Brain-Derived Neurotrophic Factor Overexpression Induces Precocious Critical Period in Mouse Visual Cortex. *J. Neurosci.* 19, RC40–RC40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-22-j0003.1999>
- Hanse, E., Seth, H., Riebe, I., 2013. AMPA-silent synapses in brain development and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 839–850. <https://doi.org/10.1038/nrn3642>
- Harris, K.D., Shepherd, G.M.G., 2015. The neocortical circuit: themes and variations. *Nat. Neurosci.* 18, 170–181. <https://doi.org/10.1038/nn.3917>
- Harwell, C.C., Fuentealba, L.C., Gonzalez-Cerrillo, A., Parker, P.R.L., Gertz, C.C., Mazzola, E., Garcia, M.T., Alvarez-Buylla, A., Cepko, C.L., Kriegstein, A.R., 2015. Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory Interneurons. *Neuron* 87, 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.030>
- Hashimoto, T., Volk, D.W., Eggan, S.M., Mirnic, K., Pierri, J.N., Sun, Z., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2003. Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *J. Neurosci.* 23, 6315–6326. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-15-06315.2003>
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., Nakanishi, H., 2006. Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53, 660–668. <https://doi.org/10.1002/glia.20322>
- Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., Julius, D., 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519. <https://doi.org/10.1038/nn1805>
- He, M., Tucciarone, J., Lee, S., Nigro, M.J., Kim, Y., Levine, J.M., Kelly, S.M., Krugikov, I., Wu, P., Chen, Y., Gong, L., Hou, Y., Osten, P., Rudy, B., Huang, Z.J., 2016. Strategies and Tools for Combinatorial Targeting of GABAergic Neurons in Mouse Cerebral Cortex. *Neuron* 91, 1228–1243. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.021>

- Helmeke, C., 2001. Juvenile Emotional Experience Alters Synaptic Inputs on Pyramidal Neurons in the Anterior Cingulate Cortex. *Cereb. Cortex* 11, 717–727. <https://doi.org/10.1093/cercor/11.8.717>
- Hensch, T.K., 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877–888. <https://doi.org/10.1038/nrn1787>
- Hensch, T.K., 1998. Local GABA Circuit Control of Experience-Dependent Plasticity in Developing Visual Cortex. *Science* 282, 1504–1508. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1504>
- Heynen, A.J., Yoon, B.-J., Liu, C.-H., Chung, H.J., Huganir, R.L., Bear, M.F., 2003. Molecular mechanism for loss of visual cortical responsiveness following brief monocular deprivation. *Nat. Neurosci.* 6, 854–862. <https://doi.org/10.1038/nn1100>
- Hikida, T., Jaaro-Peled, H., Seshadri, S., Oishi, K., Hookway, C., Kong, S., Wu, D., Xue, R., Andrade, M., Tankou, S., Mori, S., Gallagher, M., Ishizuka, K., Pletnikov, M., Kida, S., Sawa, A., 2007. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 14501–14506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704774104>
- Hill, M.J., Bray, N.J., 2012. Evidence That Schizophrenia Risk Variation in the *ZNF804A* Gene Exerts Its Effects During Fetal Brain Development. *Am. J. Psychiatry* 169, 1301–1308. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.11121845>
- Hlushchenko, I., Koskinen, M., Hotulainen, P., 2016. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity: Actin Dynamics in Dendritic Spines. *Cytoskeleton* 73, 435–441. <https://doi.org/10.1002/cm.21280>
- Hobbiss, A.F., Ramiro-Cortés, Y., Israely, I., 2018. Homeostatic Plasticity Scales Dendritic Spine Volumes and Changes the Threshold and Specificity of Hebbian Plasticity. *iScience* 8, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.09.015>
- Holtmaat, A., De Paola, V., Wilbrecht, L., Knott, G.W., 2008. Imaging of experience-dependent structural plasticity in the mouse neocortex in vivo. *Behav. Brain Res.* 192, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.04.005>
- Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., Svoboda, K., 2005. Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron* 45, 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.003>
- Honea, R., Crow, T.J., Passingham, D., Mackay, C.E., 2005. Regional Deficits in Brain Volume in Schizophrenia: A Meta-Analysis of Voxel-Based Morphometry Studies. *Am. J. Psychiatry* 162, 2233–2245. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.12.2233>
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Stevens, B., 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>

- Hooks, B.M., Chen, C., 2020. Circuitry Underlying Experience-Dependent Plasticity in the Mouse Visual System. *Neuron* 106, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.031>
- Horton, J.C., Hocking, D.R., 1997. Timing of the Critical Period for Plasticity of Ocular Dominance Columns in Macaque Striate Cortex. *J. Neurosci.* 17, 3684–3709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03684.1997>
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., Audinat, E., 2012. Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 32, 15106–15111. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012>
- Hou, Q., Ruan, H., Gilbert, J., Wang, G., Ma, Q., Yao, W.-D., Man, H.-Y., 2015. MicroRNA miR124 is required for the expression of homeostatic synaptic plasticity. *Nat. Commun.* 6, 10045. <https://doi.org/10.1038/ncomms10045>
- Howarth, M., Walmsley, L., Brown, T.M., 2014. Binocular Integration in the Mouse Lateral Geniculate Nuclei. *Curr. Biol.* 24, 1241–1247. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.014>
- Howes, O.D., McDonald, C., Cannon, M., Arseneault, L., Boydell, J., Murray, R.M., 2004. Pathways to schizophrenia: the impact of environmental factors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7, S7–S13. <https://doi.org/10.1017/S1461145704004122>
- Hu, H., Gan, J., Jonas, P., 2014. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* 345, 1255263–1255263. <https://doi.org/10.1126/science.1255263>
- Hu, J.S., Vogt, D., Sandberg, M., Rubenstein, J.L., 2017. Cortical interneuron development: a tale of time and space. *Development* 144, 3867–3878. <https://doi.org/10.1242/dev.132852>
- Huang, S., Gu, Y., Quinlan, E.M., Kirkwood, A., 2010. A Refractory Period for Rejuvenating GABAergic Synaptic Transmission and Ocular Dominance Plasticity with Dark Exposure. *J. Neurosci.* 30, 16636–16642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4384-10.2010>
- Huang, Y.H., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2015. Silent Synapses Speak Up: Updates of the Neural Rejuvenation Hypothesis of Drug Addiction. *The Neuroscientist* 21, 451–459. <https://doi.org/10.1177/1073858415579405>
- Huang, Z.J., Di Cristo, G., Ango, F., 2007. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 673–686. <https://doi.org/10.1038/nrn2188>
- Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., Tonegawa, S., 1999. BDNF Regulates the Maturation of Inhibition and the Critical Period of Plasticity in Mouse Visual Cortex. *Cell* 98, 739–755. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81509-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81509-3)
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1970. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J. Physiol.* 206, 419–436. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009022>
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* 160, 106–154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>

- Hübener, M., 2003. Mouse visual cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 413–420. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00102-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00102-8)
- Huberman, A.D., Feller, M.B., Chapman, B., 2008. Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 479–509. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125533>
- Huttenlocher, P.R., 1979. Synaptic density in human frontal cortex — Developmental changes and effects of aging. *Brain Res.* 163, 195–205. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90349-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90349-4)
- Huttenlocher, P.R., Dabholkar, A.S., 1997. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387, 167–178. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19971020\)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971020)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z)
- Iafrati, J., Orejarena, M.J., Lassalle, O., Bouamrane, L., Chavis, P., 2014. Reelin, an extracellular matrix protein linked to early onset psychiatric diseases, drives postnatal development of the prefrontal cortex via GluN2B-NMDARs and the mTOR pathway. *Mol. Psychiatry* 19, 417–426. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.66>
- Inta, D., Alfonso, J., von Engelhardt, J., Kreuzberg, M.M., Meyer, A.H., van Hooft, J.A., Monyer, H., 2008. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20994–20999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807059105>
- Isaac, J.T.R., Crair, M.C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., 1997. Silent Synapses during Development of Thalamocortical Inputs. *Neuron* 18, 269–280. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80267-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80267-6)
- Isaacson, J.S., Scanziani, M., 2011. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* 72, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.027>
- Issa, N.P., Trachtenberg, J.T., Chapman, B., Zahs, K.R., Stryker, M.P., 1999. The critical period for ocular dominance plasticity in the Ferret's visual cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 6965–6978.
- Iwai, Y., Fagiolini, M., Obata, K., Hensch, T.K., 2003. Rapid Critical Period Induction by Tonic Inhibition in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 23, 6695–6702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06695.2003>
- Jaubert-Miazza, L., Green, E., Lo, F.-S., Bui, K., Mills, J., Guido, W., 2005. Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Vis. Neurosci.* 22, 661–676. <https://doi.org/10.1017/S0952523805225154>
- Javitt, D.C., Zukin, S.R., 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 148, 1301–1308. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.10.1301>
- Jeffery, G., Erskine, L., 2005. Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 721–753. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2005.04.005>

- Ji, X., Zingg, B., Mesik, L., Xiao, Z., Zhang, L.I., Tao, H.W., 2016. Thalamocortical Innervation Pattern in Mouse Auditory and Visual Cortex: Laminar and Cell-Type Specificity. *Cereb. Cortex* 26, 2612–2625. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv099>
- Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., Finch, C.E., 1994. Expression of complement C1gB and C4 mRNAs during rat brain development. *Dev. Brain Res.* 80, 163–174. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90101-5)
- Johnstone, M., Thomson, P.A., Hall, J., McIntosh, A.M., Lawrie, S.M., Porteous, D.J., 2011. DISC1 in Schizophrenia: Genetic Mouse Models and Human Genomic Imaging. *Schizophr. Bull.* 37, 14–20. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq135>
- Joshi, D., Fullerton, J.M., Weickert, C.S., 2014. Elevated ErbB4 mRNA is related to interneuron deficit in prefrontal cortex in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 53, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.02.014>
- Kaas, J.H., 2011. Neocortex in early mammals and its subsequent variations: Kaas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1225, 28–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05981.x>
- Kaminitz, A., Barzilay, R., Segal, H., Taler, M., Offen, D., Gil-Ad, I., Mechoulam, R., Weizman, A., 2014. Dominant negative DISC1 mutant mice display specific social behaviour deficits and aberration in BDNF and cannabinoid receptor expression. *World J. Biol. Psychiatry* 15, 76–82. <https://doi.org/10.3109/15622975.2013.841993>
- Kawaguchi, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>
- Keck, T., Mrcic-Flogel, T.D., Vaz Afonso, M., Eysel, U.T., Bonhoeffer, T., Hübener, M., 2008. Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat. Neurosci.* 11, 1162–1167. <https://doi.org/10.1038/nn.2181>
- Kilgard, M.P., Pandya, P.K., Vazquez, J., Gehi, A., Schreiner, C.E., Merzenich, M.M., 2001. Sensory Input Directs Spatial and Temporal Plasticity in Primary Auditory Cortex. *J. Neurophysiol.* 86, 326–338. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.326>
- Killackey, H.P., Sherman, S.M., 2003. Corticothalamic Projections from the Rat Primary Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* 23, 7381–7384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-19-07381.2003>
- Kim, E.J., Juavinett, A.L., Kyubwa, E.M., Jacobs, M.W., Callaway, E.M., 2015. Three Types of Cortical Layer 5 Neurons That Differ in Brain-wide Connectivity and Function. *Neuron* 88, 1253–1267. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.002>
- Klausberger, T., Roberts, J.D.B., Somogyi, P., 2002. Cell Type- and Input-Specific Differences in the Number and Subtypes of Synaptic GABA_A Receptors in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 2513–2521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02513.2002>

- Kleim, J.A., Lussnig, E., Schwarz, E.R., Comery, T.A., Greenough, W.T., 1996. Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 4529–4535.
- Kloc, M., Maffei, A., 2014. Target-Specific Properties of Thalamocortical Synapses onto Layer 4 of Mouse Primary Visual Cortex. *J. Neurosci.* 34, 15455–15465. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2595-14.2014>
- Knott, G., Holtmaat, A., 2008. Dendritic spine plasticity—Current understanding from in vivo studies. *Brain Res. Rev.* 58, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.01.002>
- Knott, G.W., Quairiaux, C., Genoud, C., Welker, E., 2002. Formation of Dendritic Spines with GABAergic Synapses Induced by Whisker Stimulation in Adult Mice. *Neuron* 34, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00663-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00663-3)
- Knuesel, I., 2010. Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.* 91, 257–274. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.002>
- Kolb, B., Fantie, B.D., 2009. Development of the Child’s Brain and Behavior, in: Reynolds, C.R., Fletcher-Janzen, E. (Eds.), *Handbook of Clinical Child Neuropsychology*. Springer US, Boston, MA, pp. 19–46. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78867-8_2
- Konopaske, G.T., Lange, N., Coyle, J.T., Benes, F.M., 2014. Prefrontal Cortical Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry* 71, 1323. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1582>
- Krubitzer, L.A., Seelke, A.M.H., 2012. Cortical evolution in mammals: The bane and beauty of phenotypic variability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10647–10654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201891109>
- Krystal, J.H., 1994. Subanesthetic Effects of the Noncompetitive NMDA Antagonist, Ketamine, in Humans: Psychotomimetic, Perceptual, Cognitive, and Neuroendocrine Responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 199. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1994.03950030035004>
- Kuhlman, S.J., Olivas, N.D., Tring, E., Ikrar, T., Xu, X., Trachtenberg, J.T., 2013. A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* 501, 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature12485>
- Kullmann, D.M., Nicoll, R.A., 1992. Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature* 357, 240–244. <https://doi.org/10.1038/357240a0>
- Kwan, K.Y., Sestan, N., Anton, E.S., 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139, 1535–1546. <https://doi.org/10.1242/dev.069963>
- Lahti, A., 2001. Effects of Ketamine in Normal and Schizophrenic Volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25, 455–467. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00243-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00243-3)

- Lai, C.S.L., Fisher, S.E., Hurst, J.A., Vargha-Khadem, F., Monaco, A.P., 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413, 519–523. <https://doi.org/10.1038/35097076>
- Lambo, M.E., Turrigiano, G.G., 2013. Synaptic and Intrinsic Homeostatic Mechanisms Cooperate to Increase L2/3 Pyramidal Neuron Excitability during a Late Phase of Critical Period Plasticity. *J. Neurosci.* 33, 8810–8819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4502-12.2013>
- Landis, D.M., Reese, T.S., 1983. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol.* 97, 1169–1178. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.4.1169>
- Le Magueresse, C., Alfonso, J., Khodosevich, K., Arroyo Martin, A.A., Bark, C., Monyer, H., 2011. “Small Axonless Neurons”: Postnatally Generated Neocortical Interneurons with Delayed Functional Maturation. *J. Neurosci.* 31, 16731–16747. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4273-11.2011>
- Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zaghera, E., Fishell, G., Rudy, B., 2010. The Largest Group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors. *J. Neurosci.* 30, 16796–16808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1869-10.2010>
- Lehmann, K., Löwel, S., 2008. Age-Dependent Ocular Dominance Plasticity in Adult Mice. *PLoS ONE* 3, e3120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003120>
- Lein, E.S., Shatz, C.J., 2000. Rapid Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA within Eye-Specific Circuits during Ocular Dominance Column Formation. *J. Neurosci.* 20, 1470–1483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-04-01470.2000>
- Lelli, A., Gervais, A., Colin, C., Chéret, C., de Almodovar, C.R., Carmeliet, P., Krause, K.-H., Boillée, S., Mallat, M., 2013. The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex: Microglial Nox2 in Development. *Glia* 61, 1542–1555. <https://doi.org/10.1002/glia.22540>
- Letellier, M., Elramah, S., Mondin, M., Soula, A., Penn, A., Choquet, D., Landry, M., Thoumine, O., Favereaux, A., 2014. miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling. *Nat. Neurosci.* 17, 1040–1042. <https://doi.org/10.1038/nn.3762>
- Lévi-Strauss, M., Mallat, M., 1987. Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 139, 2361–2366.
- Lewis, C.M., Levinson, D.F., Wise, L.H., DeLisi, L.E., Straub, R.E., Hovatta, I., Williams, N.M., Schwab, S.G., Pulver, A.E., Faraone, S.V., Brzustowicz, L.M., Kaufmann, C.A., Garver, D.L., Gurling, H.M.D., Lindholm, E., Coon, H., Moises, H.W., Byerley, W., Shaw, S.H., Mesen, A., Sherrington, R., O’Neill, F.A., Walsh, D., Kendler, K.S., Ekelund, J., Paunio, T., Lönnqvist, J., Peltonen, L., O’Donovan, M.C., Owen, M.J., Wildenauer, D.B., Maier, W., Nestadt, G., Blouin, J.-L., Antonarakis, S.E., Mowry, B.J., Silverman, J.M., Crowe, R.R., Cloninger, C.R., Tsuang, M.T., Malaspina, D., Harkavy-Friedman, J.M., Svrakic, D.M., Bassett, A.S., Holcomb, J., Kalsi, G., McQuillin, A., Brynjolfson, J., Sigmundsson,

- T., Petursson, H., Jazin, E., Zoëga, T., Helgason, T., 2003. Genome Scan Meta-Analysis of Schizophrenia and Bipolar Disorder, Part II: Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 34–48. <https://doi.org/10.1086/376549>
- Lewis, D.A., Levitt, P., 2002. Schizophrenia as a Disorder of Neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 409–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142754>
- Li, D., Collier, D.A., He, L., 2006. Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1995–2002. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl122>
- Li, H., Chou, S.-J., Hamasaki, T., Perez-Garcia, C.G., O’Leary, D.D., 2012. Neuregulin repellent signaling via ErbB4 restricts GABAergic interneurons to migratory paths from ganglionic eminence to cortical destinations. *Neural Develop.* 7, 10. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-10>
- Li, K., Sacks, S.H., Zhou, W., 2007. The relative importance of local and systemic complement production in ischaemia, transplantation and other pathologies. *Mol. Immunol.* 44, 3866–3874. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.006>
- Liao, D., Hessler, N.A., Malinow, R., 1995. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400–404. <https://doi.org/10.1038/375400a0>
- Lissin, D.V., Gomperts, S.N., Carroll, R.C., Christine, C.W., Kalman, D., Kitamura, M., Hardy, S., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., von Zastrow, M., 1998. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 7097–7102. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7097>
- Litvinchuk, A., Wan, Y.-W., Swartzlander, D.B., Chen, F., Cole, A., Propson, N.E., Wang, Q., Zhang, B., Liu, Z., Zheng, H., 2018. Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer’s Disease. *Neuron* 100, 1337-1353.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.031>
- Lorenz, K., 1935. Der Kumpan in der Umwelt des Vogels: Der Artgenosse als auslösendes Moment sozialer Verhaltensweisen. *J. Für Ornithol.* 83, 137–213. <https://doi.org/10.1007/BF01905355>
- Louros, S.R., Hooks, B.M., Litvina, L., Carvalho, A.L., Chen, C., 2014. A Role for Stargazin in Experience-Dependent Plasticity. *Cell Rep.* 7, 1614–1625. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.054>
- Lowery, R.L., Tremblay, M.-E., Hopkins, B.E., Majewska, A.K., 2017. The microglial fractalkine receptor is not required for activity-dependent plasticity in the mouse visual system. *Glia* 65, 1744–1761. <https://doi.org/10.1002/glia.23192>
- Ma, T., Wang, C., Wang, L., Zhou, X., Tian, M., Zhang, Q., Zhang, Y., Li, J., Liu, Z., Cai, Y., Liu, F., You, Y., Chen, C., Campbell, K., Song, H., Ma, L., Rubenstein, J.L., Yang, Z., 2013. Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1588–1597. <https://doi.org/10.1038/nn.3536>

- MacDonald, M.L., Alhassan, J., Newman, J.T., Richard, M., Gu, H., Kelly, R.M., Sampson, A.R., Fish, K.N., Penzes, P., Wills, Z.P., Lewis, D.A., Sweet, R.A., 2017. Selective Loss of Smaller Spines in Schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 174, 586–594. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.16070814>
- Maffei, A., Nataraj, K., Nelson, S.B., Turrigiano, G.G., 2006. Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature* 443, 81–84. <https://doi.org/10.1038/nature05079>
- Maffei, A., Turrigiano, G.G., 2008. Multiple Modes of Network Homeostasis in Visual Cortical Layer 2/3. *J. Neurosci.* 28, 4377–4384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5298-07.2008>
- Magnus, T., Chan, A., Grauer, O., Toyka, K.V., Gold, R., 2001. Microglial Phagocytosis of Apoptotic Inflammatory T Cells Leads to Down-Regulation of Microglial Immune Activation. *J. Immunol.* 167, 5004–5010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5004>
- Majewska, A., Sur, M., 2003. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: Changes during the critical period and effects of visual deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 16024–16029. <https://doi.org/10.1073/pnas.2636949100>
- Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
- Mancini, G., Horvath, T.L., 2018. Viral Vectors for Studying Brain Mechanisms that Control Energy Homeostasis. *Cell Metab.* 27, 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.015>
- Mann, E.O., Paulsen, O., 2006. Keeping Inhibition Timely. *Neuron* 49, 8–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.015>
- Mao, L., Takamiya, K., Thomas, G., Lin, D.-T., Huganir, R.L., 2010. GRIP1 and 2 regulate activity-dependent AMPA receptor recycling via exocyst complex interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19038–19043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013494107>
- Marín, O., 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
- Martin, D.L., Rinvall, K., 1993. Regulation of γ -Aminobutyric Acid Synthesis in the Brain. *J. Neurochem.* 60, 395–407. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03165.x>
- Mataga, N., Mizuguchi, Y., Hensch, T.K., 2004. Experience-Dependent Pruning of Dendritic Spines in Visual Cortex by Tissue Plasminogen Activator. *Neuron* 44, 1031–1041. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.028>
- Mattei, D., Djodari-Irani, A., Hadar, R., Pelz, A., de Cossío, L.F., Goetz, T., Matyash, M., Kettenmann, H., Winter, C., Wolf, S.A., 2014. Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia. *Brain. Behav. Immun.* 38, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.019>
- Mattei, D., Ivanov, A., Ferrai, C., Jordan, P., Guneykaya, D., Buonfiglioli, A., Schaafsma, W., Przanowski, P., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Hesse, S., Patt, M., Sabri, O., Ross, T.L., Eggen, B.J.L., Boddeke, E.W.G.M., Kaminska, B., Beule, D., Pombo, A., Kettenmann, H., Wolf, S.A., 2017. Maternal

immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Transl. Psychiatry* 7, e1120–e1120. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.80>

Mayilyan, K.R., Weinberger, D.R., Sim, R.B., 2008. The complement system in schizophrenia. *Drug News Perspect.* 21, 200. <https://doi.org/10.1358/dnp.2008.21.4.1213349>

McBain, C.J., 1998. A short-term mechanism of plasticity for interneurons? *J. Physiol.* 511, 331–331. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.331bh.x>

Mclin, V.A., Hu, C.-H., Shah, R., Jamrich, M., 2008. Expression of complement components coincides with early patterning and organogenesis in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 1123–1133. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072465v>

Messias, E.L., Chen, C.-Y., Eaton, W.W., 2007. Epidemiology of Schizophrenia: Review of Findings and Myths. *Psychiatr. Clin. North Am.* 30, 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2007.04.007>

Miao, Q., Yao, L., Rasch, M.J., Ye, Q., Li, X., Zhang, X., 2016. Selective Maturation of Temporal Dynamics of Intracortical Excitatory Transmission at the Critical Period Onset. *Cell Rep.* 16, 1677–1689. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.013>

Micheva, K.D., Smith, S.J., 2007. Array Tomography: A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron* 55, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.014>

Milinkeviciute, G., Henningfield, C.M., Muniak, M.A., Chokr, S.M., Green, K.N., Cramer, K.S., 2019. Microglia Regulate Pruning of Specialized Synapses in the Auditory Brainstem. *Front. Neural Circuits* 13, 55. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00055>

Miska, N.J., Richter, L.M., Cary, B.A., Gjorgjieva, J., Turrigiano, G.G., 2018. Sensory experience inversely regulates feedforward and feedback excitation-inhibition ratio in rodent visual cortex. *eLife* 7, e38846. <https://doi.org/10.7554/eLife.38846>

Mitsuhashi, T., Takahashi, T., 2009. Genetic regulation of proliferation/differentiation characteristics of neural progenitor cells in the developing neocortex. *Brain Dev.* 31, 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.05.002>

Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A.W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A.J., Yoshimura, Y., Nabekura, J., 2016. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* 7, 12540. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>

Miyoshi, G., Butt, S.J.B., Takebayashi, H., Fishell, G., 2007. Physiologically Distinct Temporal Cohorts of Cortical Interneurons Arise from Telencephalic Olig2-Expressing Precursors. *J. Neurosci.* 27, 7786–7798. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1807-07.2007>

Miyoshi, G., Fishell, G., 2011. GABAergic Interneuron Lineages Selectively Sort into Specific Cortical Layers during Early Postnatal Development. *Cereb. Cortex* 21, 845–852. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq155>

- Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V.H., Butt, S.J.B., Battiste, J., Johnson, J.E., Machold, R.P., Fishell, G., 2010. Genetic Fate Mapping Reveals That the Caudal Ganglionic Eminence Produces a Large and Diverse Population of Superficial Cortical Interneurons. *J. Neurosci.* 30, 1582–1594. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010>
- Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Koller, B.H., 1999. Mice with Reduced NMDA Receptor Expression Display Behaviors Related to Schizophrenia. *Cell* 98, 427–436. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81972-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81972-8)
- Molnár, Z., Kaas, J.H., de Carlos, J.A., Hevner, R.F., Lein, E., Němec, P., 2014. Evolution and Development of the Mammalian Cerebral Cortex. *Brain. Behav. Evol.* 83, 126–139. <https://doi.org/10.1159/000357753>
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437. <https://doi.org/10.1038/nrn2151>
- Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A.-L., Evrard, P., Gressens, P., Verney, C., 2007. Entry and Distribution of Microglial Cells in Human Embryonic and Fetal Cerebral Cortex: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 372–382. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180517b46>
- Monroy, E., Hernández-Torres, E., Flores, G., 2010. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J. Chem. Neuroanat.* 40, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.05.005>
- Morgenstern, N.A., Bourg, J., Petreanu, L., 2016. Multilaminar networks of cortical neurons integrate common inputs from sensory thalamus. *Nat. Neurosci.* 19, 1034–1040. <https://doi.org/10.1038/nn.4339>
- Moriguchi, S., Mizoguchi, Y., Tomimatsu, Y., Hayashi, Y., Kadowaki, T., Kagamiishi, Y., Katsube, N., Yamamoto, K., Inoue, K., Watanabe, S., Nabekura, J., Nakanishi, H., 2003. Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic responses by microglia. *Mol. Brain Res.* 119, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.09.007>
- Morishita, W., Connor, J.H., Xia, H., Quinlan, E.M., Shenolikar, S., Malenka, R.C., 2001. Regulation of Synaptic Strength by Protein Phosphatase 1. *Neuron* 32, 1133–1148. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00554-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00554-2)
- Mosser, C.-A., Baptista, S., Arnoux, I., Audinat, E., 2017. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog. Neurobiol.* 149–150, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.002>
- Moulder, K.L., Meeks, J.P., Mennerick, S., 2006. Homeostatic Regulation of Glutamate Release in Response to Depolarization. *Mol. Neurobiol.* 33, 133–154. <https://doi.org/10.1385/MN:33:2:133>
- Murcia-Belmonte, V., Erskine, L., 2019. Wiring the Binocular Visual Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3282. <https://doi.org/10.3390/ijms20133282>
- Murmu, M.S., Salomon, S., Biala, Y., Weinstock, M., Braun, K., Bock, J., 2006. Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1477–1487. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05024.x>

- Mychasiuk, R., Gibb, R., Kolb, B., 2012. Prenatal stress alters dendritic morphology and synaptic connectivity in the prefrontal cortex and hippocampus of developing offspring. *Synapse* 66, 308–314. <https://doi.org/10.1002/syn.21512>
- Nathanson, J.L., Yanagawa, Y., Obata, K., Callaway, E.M., 2009. Preferential labeling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropism of adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Neuroscience* 161, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.032>
- Nguyen, H., Sokpor, G., Pham, L., Rosenbusch, J., Stoykova, A., Staiger, J.F., Tuoc, T., 2016. Epigenetic regulation by BAF (mSWI/SNF) chromatin remodeling complexes is indispensable for embryonic development. *Cell Cycle* 15, 1317–1324. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1160984>
- Nikodemova, M., Kimyon, R.S., De, I., Small, A.L., Collier, L.S., Watters, J.J., 2015. Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. *J. Neuroimmunol.* 278, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.11.018>
- Nimmerjahn, A., 2005. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* 308, 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- O'Brien, R.J., Kamboj, S., Ehlers, M.D., Rosen, K.R., Fischbach, G.D., Huganir, R.L., 1998. Activity-Dependent Modulation of Synaptic AMPA Receptor Accumulation. *Neuron* 21, 1067–1078. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80624-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80624-8)
- Okaty, B.W., Miller, M.N., Sugino, K., Hempel, C.M., Nelson, S.B., 2009. Transcriptional and Electrophysiological Maturation of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons. *J. Neurosci.* 29, 7040–7052. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0105-09.2009>
- Olson, C.R., Freeman, R.D., 1980. Profile of the sensitive period for monocular deprivation in kittens. *Exp. Brain Res.* 39. <https://doi.org/10.1007/BF00237065>
- Osimo, E.F., Beck, K., Reis Marques, T., Howes, O.D., 2019. Synaptic loss in schizophrenia: a meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures. *Mol. Psychiatry* 24, 549–561. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0041-5>
- Osten, P., Khatri, L., Perez, J.L., Köhr, G., Giese, G., Daly, C., Schulz, T.W., Wensky, A., Lee, L.M., Ziff, E.B., 2000. Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor. *Neuron* 27, 313–325. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00039-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00039-8)
- Ovtscharoff, W., Braun, K., 2001. Maternal separation and social isolation modulate the postnatal development of synaptic composition in the infralimbic cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience* 104, 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00059-8)
- Paik, S.-B., Ringach, D.L., 2011. Retinal origin of orientation maps in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 14, 919–925. <https://doi.org/10.1038/nn.2824>
- Palacios-García, I., Lara-Vásquez, A., Montiel, J.F., Díaz-Véliz, G.F., Sepúlveda, H., Utreras, E., Montecino, M., González-Billault, C., Aboitiz, F., 2015. Prenatal Stress Down-Regulates Reelin

- Expression by Methylation of Its Promoter and Induces Adult Behavioral Impairments in Rats. *PLOS ONE* 10, e0117680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117680>
- Pan, F., Gan, W.-B., 2008. Two-photon imaging of dendritic spine development in the mouse cortex. *Dev. Neurobiol.* 68, 771–778. <https://doi.org/10.1002/dneu.20630>
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* 333, 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.-B., 2013. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155, 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
- Parras, C.M., 2002. Divergent functions of the proneural genes *Mash1* and *Ngn2* in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* 16, 324–338. <https://doi.org/10.1101/gad.940902>
- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimić, G., Rašin, M.R., Uylings, H.B.M., Rakic, P., Kostović, I., 2011. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 13281–13286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105108108>
- 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. *Nat. Neurosci.* 16, 1068–1076. <https://doi.org/10.1038/nn.3446>
- Pham, T.A., 2004. A semi-persistent adult ocular dominance plasticity in visual cortex is stabilized by activated CREB. *Learn. Mem.* 11, 738–747. <https://doi.org/10.1101/lm.75304>
- Pilaz, L.-J., Silver, D.L., 2015. Post-transcriptional regulation in corticogenesis: how RNA-binding proteins help build the brain: Post-transcriptional regulation in corticogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6, 501–515. <https://doi.org/10.1002/wrna.1289>
- Pinault, D., 2004. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Rev.* 46, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
- Piskorowski, R.A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S.I., Siegelbaum, S.A., Gogos, J.A., Chevalyere, V., 2016. Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron* 89, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.036>
- Pizzorusso, T., 2002. Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science* 298, 1248–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1072699>
- Pollen, A.A., Nowakowski, T.J., Chen, J., Retallack, H., Sandoval-Espinosa, C., Nicholas, C.R., Shuga, J., Liu, S.J., Oldham, M.C., Diaz, A., Lim, D.A., Leyrat, A.A., West, J.A., Kriegstein, A.R., 2015. Molecular Identity of Human Outer Radial Glia during Cortical Development. *Cell* 163, 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.004>

- Potter, G.B., Petryniak, M.A., Shevchenko, E., McKinsey, G.L., Ekker, M., Rubenstein, J.L.R., 2009. Generation of Cre-transgenic mice using *Dlx1/Dlx2* enhancers and their characterization in GABAergic interneurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 167–186. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.10.003>
- Prasad, K.M., Chowdari, K.V., D’Aiuto, L.A., Iyengar, S., Stanley, J.A., Nimgaonkar, V.L., 2018. Neuropil contraction in relation to Complement C4 gene copy numbers in independent cohorts of adolescent-onset and young adult-onset schizophrenia patients—a pilot study. *Transl. Psychiatry* 8, 134. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0181-z>
- Price, D., Ferrer, J., Blakemore, C., Kato, N., 1994. Postnatal development and plasticity of corticocortical projections from area 17 to area 18 in the cat’s visual cortex. *J. Neurosci.* 14, 2747–2762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02747.1994>
- Prönneke, A., Scheuer, B., Wagener, R.J., Möck, M., Witte, M., Staiger, J.F., 2015. Characterizing VIP Neurons in the Barrel Cortex of *VIPcre/tdTomato* Mice Reveals Layer-Specific Differences. *Cereb. Cortex* 25, 4854–4868. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv202>
- Qiu, S., Zhao, L.F., Korwek, K.M., Weeber, E.J., 2006. Differential Reelin-Induced Enhancement of NMDA and AMPA Receptor Activity in the Adult Hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 12943–12955. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2561-06.2006>
- Radley, J., Rocher, A., Janssen, W., Hof, P., McEwen, B., Morrison, J., 2005. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp. Neurol.* 196, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.07.008>
- Rakic, P., Bourgeois, J.-P., Goldman-Rakic, P.S., 1994. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 227–243. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60543-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60543-9)
- Rao, A., Craig, A.M., 1997. Activity Regulates the Synaptic Localization of the NMDA Receptor in Hippocampal Neurons. *Neuron* 19, 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80962-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80962-9)
- Rebsam, A., Bhansali, P., Mason, C.A., 2012. Eye-Specific Projections of Retinogeniculate Axons Are Altered in Albino Mice. *J. Neurosci.* 32, 4821–4826. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5050-11.2012>
- Reemst, K., Noctor, S.C., Lucassen, P.J., Hol, E.M., 2016. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front. Hum. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Reese, B.E., 1988. ‘Hidden lamination’ in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain Res. Rev.* 13, 119–137. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(88\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0165-0173(88)90017-3)
- Rezaie, P., Trillo-Pazos, G., Everall, I.P., Male, D.K., 2002. Expression of γ -chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: Potential role of chemokines in the developing CNS. *Glia* 37, 64–75. <https://doi.org/10.1002/glia.1128>

- Ribic, A., Crair, M.C., Biederer, T., 2019. Synapse-Selective Control of Cortical Maturation and Plasticity by Parvalbumin-Autonomous Action of SynCAM 1. *Cell Rep.* 26, 381-393.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.069>
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D., 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
- Riedemann, T., 2019. Diversity and Function of Somatostatin-Expressing Interneurons in the Cerebral Cortex. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2952. <https://doi.org/10.3390/ijms20122952>
- Rogers, J., Cooper, N.R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P.L., Styren, S.D., Civin, W.H., Brachova, L., Bradt, B., Ward, P., 1992. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10016–10020. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10016>
- Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Poncer, J.-C., Réal, E., Triller, A., Bessis, A., 2008. Prenatal Activation of Microglia Induces Delayed Impairment of Glutamatergic Synaptic Function. *PLoS ONE* 3, e2595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002595>
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., Hjerling-Leffler, J., 2011. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61. <https://doi.org/10.1002/dneu.20853>
- Rumpel, S., Hatt, H., Gottmann, K., 1998. Silent Synapses in the Developing Rat Visual Cortex: Evidence for Postsynaptic Expression of Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 18, 8863–8874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08863.1998>
- Sancho, L., Bloodgood, B.L., 2018. Functional Distinctions between Spine and Dendritic Synapses Made onto Parvalbumin-Positive Interneurons in Mouse Cortex. *Cell Rep.* 24, 2075–2087. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.070>
- Sato, M., Stryker, M.P., 2008. Distinctive Features of Adult Ocular Dominance Plasticity. *J. Neurosci.* 28, 10278–10286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2451-08.2008>
- Scala, F., Kobak, D., Shan, S., Bernaerts, Y., Laternus, S., Cadwell, C.R., Hartmanis, L., Froudarakis, E., Castro, J.R., Tan, Z.H., Papadopoulos, S., Patel, S.S., Sandberg, R., Berens, P., Jiang, X., Tolias, A.S., 2019. Layer 4 of mouse neocortex differs in cell types and circuit organization between sensory areas. *Nat. Commun.* 10, 4174. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12058-z>
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schäfer, M.K.-H., Schwaeble, W.J., Post, C., Salvati, P., Calabresi, M., Sim, R.B., Petry, F., Loos, M., Weihe, E., 2000. Complement C1q Is Dramatically Up-Regulated in Brain Microglia in Response to Transient Global Cerebral Ischemia. *J. Immunol.* 164, 5446–5452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5446>

- Schafer, D.P., Stevens, B., 2013. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1034–1040. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.012>
- Schechter, R.W., Maher, E.E., Welsh, C.A., Stevens, B., Erisir, A., Bear, M.F., 2017. Experience-Dependent Synaptic Plasticity in V1 Occurs without Microglial CX3CR1. *J. Neurosci.* 37, 10541–10553. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2679-16.2017>
- Scheiman, M.M., Hertle, R.W., Beck, R.W., Edwards, A.R., Birch, E., Cotter, S.A., Crouch, E.R., Cruz, O.A., Davitt, B.V., Donahue, S., Holmes, J.M., Lyon, D.W., Repka, M.X., Sala, N.A., Silbert, D.I., Suh, D.W., Tamkins, S.M., Pediatric Eye Disease Investigator Group, 2005. Randomized trial of treatment of amblyopia in children aged 7 to 17 years. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 123, 437–447. <https://doi.org/10.1001/archoph.123.4.437>
- Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D., Eder, C., 2001. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways: Differentiation of microglia by astrocyte-released cytokines. *Eur. J. Neurosci.* 14, 463–473. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01661.x>
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Schuman, B., Machold, R.P., Hashikawa, Y., Fuzik, J., Fishell, G.J., Rudy, B., 2019. Four Unique Interneuron Populations Reside in Neocortical Layer 1. *J. Neurosci.* 39, 125–139. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1613-18.2018>
- Schwaller, B., Meyer, M., Schiffmann, S., 2002. “New” functions for “old” proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum Lond. Engl.* 1, 241–258. <https://doi.org/10.1080/147342202320883551>
- Sekar, A., Bialas, A.R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T.R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., Genovese, G., Rose, S.A., Handsaker, R.E., Daly, M.J., Carroll, M.C., Stevens, B., McCarroll, S.A., 2016. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530, 177–183. <https://doi.org/10.1038/nature16549>
- Sellgren, C.M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J.D., Thanos, J.M., Whittredge, P.B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H.E., Wang, J., Kaykas, A., Karmacharya, R., Goold, C.P., Sheridan, S.D., Perlis, R.H., 2019. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat. Neurosci.* 22, 374–385. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0334-7>
- Shamir, A., Kwon, O.-B., Karavanova, I., Vullhorst, D., Leiva-Salcedo, E., Janssen, M.J., Buonanno, A., 2012. The Importance of the NRG-1/ErbB4 Pathway for Synaptic Plasticity and Behaviors Associated with Psychiatric Disorders. *J. Neurosci.* 32, 2988–2997. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-11.2012>
- Shatz, C.J., Stryker, M.P., 1978. Ocular dominance in layer IV of the cat’s visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J. Physiol.* 281, 267–283. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012421>

- Sierra, A., Paolicelli, R.C., Kettenmann, H., 2019. Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci.* 42, 778–792. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.004>
- Sievers, J., Schmidt Mayer, J., Parwaresch, R., 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* 176, 45–51. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(11\)80414-0](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(11)80414-0)
- Sigurdsson, T., Stark, K.L., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., Gordon, J.A., 2010. Impaired hippocampal–prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature* 464, 763–767. <https://doi.org/10.1038/nature08855>
- Sinagra, M., 2005. Reelin, Very-Low-Density Lipoprotein Receptor, and Apolipoprotein E Receptor 2 Control Somatic NMDA Receptor Composition during Hippocampal Maturation In Vitro. *J. Neurosci.* 25, 6127–6136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1757-05.2005>
- Singh, T.D., Mizuno, K., Kohno, T., Nakamura, S., 1997. BDNF and trkB mRNA Expression in Neurons of the Neonatal Mouse Barrel Field Cortex: Normal Development and Plasticity after Cauterizing Facial Vibrissae. *Neurochem. Res.* 22, 791–797. <https://doi.org/10.1023/A:1022075508176>
- Sipe, G.O., Lowery, R.L., Tremblay, M.-È., Kelly, E.A., Lamantia, C.E., Majewska, A.K., 2016. Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat. Commun.* 7, 10905. <https://doi.org/10.1038/ncomms10905>
- Snow, C.E., Hoefnagel-Hohle, M., 1978. The Critical Period for Language Acquisition: Evidence from Second Language Learning. *Child Dev.* 49, 1114. <https://doi.org/10.2307/1128751>
- Soares, C., Lee, K.F.H., Nassrallah, W., Beique, J.-C., 2013. Differential Subcellular Targeting of Glutamate Receptor Subtypes during Homeostatic Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 33, 13547–13559. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1873-13.2013>
- Somogyi, P., Freund, T.F., Cowey, A., 1982. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7, 2577–2607. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90086-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90086-0)
- Southwell, D.G., Froemke, R.C., Alvarez-Buylla, A., Stryker, M.P., Gandhi, S.P., 2010. Cortical Plasticity Induced by Inhibitory Neuron Transplantation. *Science* 327, 1145–1148. <https://doi.org/10.1126/science.1183962>
- Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Quéraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chédotal, A., Zalc, B., Thomas, J.-L., 2002. Directional Guidance of Oligodendroglial Migration by Class 3 Semaphorins and Netrin-1. *J. Neurosci.* 22, 5992–6004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-14-05992.2002>
- Spatazza, J., Lee, H.H.C., Di Nardo, A.A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T.K., Prochiantz, A., 2013. Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Rep.* 3, 1815–1823. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.014>

- Spivak, B., Radwan, M., Brandon, J., Baruch, Y., Stawski, M., Tyano, S., Weizman, A., 1993. Reduced total complement haemolytic activity in schizophrenic patients. *Psychol. Med.* 23, 315–318. <https://doi.org/10.1017/S0033291700028397>
- Stahel, P.F., Frei, K., Fontana, A., Eugster, H.P., Ault, B.H., Barnum, S.R., 1997. Evidence for intrathecal synthesis of alternative pathway complement activation proteins in experimental meningitis. *Am. J. Pathol.* 151, 897–904.
- Staiger, J.F., 2004. Functional Diversity of Layer IV Spiny Neurons in Rat Somatosensory Cortex: Quantitative Morphology of Electrophysiologically Characterized and Biocytin Labeled Cells. *Cereb. Cortex* 14, 690–701. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh029>
- Steen, V.M., Nepal, C., Ersland, K.M., Holdhus, R., Nævdal, M., Ratvik, S.M., Skrede, S., Håvik, B., 2013. Neuropsychological Deficits in Mice Depleted of the Schizophrenia Susceptibility Gene CSMD1. *PLoS ONE* 8, e79501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079501>
- Stephan, A.H., Madison, D.V., Mateos, J.M., Fraser, D.A., Lovelett, E.A., Coutellier, L., Kim, L., Tsai, H.-H., Huang, E.J., Rowitch, D.H., Berns, D.S., Tenner, A.J., Shamloo, M., Barres, B.A., 2013. A Dramatic Increase of C1q Protein in the CNS during Normal Aging. *J. Neurosci.* 33, 13460–13474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1333-13.2013>
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W.M., Barres, B.A., 2007. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131, 1164–1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
- Streit, W.J., Conde, J.R., Fendrick, S.E., Flanary, B.E., Mariani, C.L., 2005. Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol. Res.* 27, 685–691. <https://doi.org/10.1179/016164105X49463>
- Stryker, M., Harris, W., 1986. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 6, 2117–2133. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-08-02117.1986>
- Stühmer, T., Anderson, S.A., Ekker, M., Rubenstein, J.L.R., 2002. Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Dev. Camb. Engl.* 129, 245–252.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A.A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., Hensch, T.K., 2008. Experience-Dependent Transfer of *Otx2* Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell* 134, 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.054>
- Sun, Y., Ikrar, T., Davis, M.F., Gong, N., Zheng, X., Luo, Z.D., Lai, C., Mei, L., Holmes, T.C., Gandhi, S.P., Xu, X., 2016. Neuregulin-1/ErbB4 Signaling Regulates Visual Cortical Plasticity. *Neuron* 92, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.033>
- Sutton, M.A., Ito, H.T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J.C., Schuman, E.M., 2006. Miniature Neurotransmission Stabilizes Synaptic Function via Tonic Suppression of Local Dendritic Protein Synthesis. *Cell* 125, 785–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.040>

- Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brône, B., Legendre, P., Rigo, J.-M., 2013. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* 61, 150–163. <https://doi.org/10.1002/glia.22421>
- Szabadics, J., 2006. Excitatory Effect of GABAergic Axo-Axonic Cells in Cortical Microcircuits. *Science* 311, 233–235. <https://doi.org/10.1126/science.1121325>
- Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M., Vignali, D.A.A., 2012. Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012, pdb.ip067876-pdb.ip067876. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip067876>
- Takamiya, K., Mao, L., Hugarir, R.L., Linden, D.J., 2008. The glutamate receptor-interacting protein family of GluR2-binding proteins is required for long-term synaptic depression expression in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5752–5755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-08.2008>
- Tan, H.L., Queenan, B.N., Hugarir, R.L., 2015. GRIP1 is required for homeostatic regulation of AMPAR trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 10026–10031. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512786112>
- Tandon, R., 2014. Schizophrenia and other psychotic disorders in diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM)-5: Clinical implications of revisions from DSM-IV. *Indian J. Psychol. Med.* 36, 223. <https://doi.org/10.4103/0253-7176.135365>
- Tang, Y., Stryker, M.P., Alvarez-Buylla, A., Espinosa, J.S., 2014. Cortical plasticity induced by transplantation of embryonic somatostatin or parvalbumin interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18339–18344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421844112>
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsiani, D., Kvitsani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., Miyoshi, G., Shima, Y., Fishell, G., Nelson, S.B., Huang, Z.J., 2011. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995–1013. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.026>
- Telley, L., Govindan, S., Prados, J., Stevant, I., Nef, S., Dermitzakis, E., Dayer, A., Jabaudon, D., 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science* 351, 1443–1446. <https://doi.org/10.1126/science.aad8361>
- Thameem Dheen, S., Kaur, C., Ling, E.-A., 2007. Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189–1197. <https://doi.org/10.2174/092986707780597961>
- The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING), 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568. <https://doi.org/10.1038/nrn2402>
- Thomas, A., Gasque, P., Vaudry, D., Gonzalez, B., Fontaine, M., 2000. Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int. Immunol.* 12, 1015–1023. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.7.1015>

- Tissir, F., Goffinet, A.M., 2003. Reelin and brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 496–505. <https://doi.org/10.1038/nrn1113>
- Torrey, E.F., Barci, B.M., Webster, M.J., Bartko, J.J., Meador-Woodruff, J.H., Knable, M.B., 2005. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol. Psychiatry* 57, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.10.019>
- Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., Svoboda, K., 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788–794. <https://doi.org/10.1038/nature01273>
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., Majewska, A.K., 2010. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol.* 8, e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>
- Turrigiano, G., 2012. Homeostatic Synaptic Plasticity: Local and Global Mechanisms for Stabilizing Neuronal Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a005736–a005736. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005736>
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., Nelson, S.B., 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892–896. <https://doi.org/10.1038/36103>
- Uhlhaas, P.J., Singer, W., 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 100–113. <https://doi.org/10.1038/nrn2774>
- Usrey, W.M., Alitto, H.J., 2015. Visual Functions of the Thalamus. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 1, 351–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-082114-035920>
- Van Beek, J., Bernaudin, M., Petit, E., Gasque, P., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Fontaine, M., 2000. Expression of Receptors for Complement Anaphylatoxins C3a and C5a Following Permanent Focal Cerebral Ischemia in the Mouse. *Exp. Neurol.* 161, 373–382. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7273>
- van der Bourg, A., Yang, J., Stüttgen, M.C., Reyes-Puerta, V., Helmchen, F., Luhmann, H.J., 2019. Temporal refinement of sensory-evoked activity across layers in developing mouse barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 50, 2955–2969. <https://doi.org/10.1111/ejn.14413>
- van Rhijn, J.-R., Fisher, S.E., Vernes, S.C., Nadif Kasri, N., 2018. Foxp2 loss of function increases striatal direct pathway inhibition via increased GABA release. *Brain Struct. Funct.* 223, 4211–4226. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1746-6>
- VanRyzin, J.W., Pickett, L.A., McCarthy, M.M., 2018. Microglia: Driving critical periods and sexual differentiation of the brain: Microglia and Sex Differences in Development. *Dev. Neurobiol.* 78, 580–592. <https://doi.org/10.1002/dneu.22569>
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Copp, A., Mishkin, M., 2005. FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 131–138. <https://doi.org/10.1038/nrn1605>
- Vasek, M.J., Garber, C., Dorsey, D., Durrant, D.M., Bollman, B., Soung, A., Yu, J., Perez-Torres, C., Frouin, A., Wilton, D.K., Funk, K., DeMasters, B.K., Jiang, X., Bowen, J.R., Mennerick, S., Robinson, J.K., Garbow, J.R., Tyler, K.L., Suthar, M.S., Schmidt, R.E., Stevens, B., Klein, R.S., 2016. A

complement–microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* 534, 538–543. <https://doi.org/10.1038/nature18283>

Vasistha, N.A., Pardo-Navarro, M., Gasthaus, J., Weijers, D., Müller, M.K., García-González, D., Malwade, S., Korshunova, I., Pfisterer, U., von Engelhardt, J., Hougaard, K.S., Khodosevich, K., 2019. Maternal inflammation has a profound effect on cortical interneuron development in a stage and subtype-specific manner. *Mol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0539-5>

Veerhuis, R., Janssen, I., De Groot, C.J.A., Van Muiswinkel, F.L., Hack, C.E., Eikelenboom, P., 1999. Cytokines Associated with Amyloid Plaques in Alzheimer’s Disease Brain Stimulate Human Glial and Neuronal Cell Cultures to Secrete Early Complement Proteins, But Not C1-Inhibitor. *Exp. Neurol.* 160, 289–299. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7199>

Veerhuis, R., Janssen, I., Hoozemans, J.J.M., Groot, C.J.A.D., Hack, C.E., Eikelenboom, P., 1998. Complement C1-inhibitor expression in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 96, 287–296. <https://doi.org/10.1007/s004010050896>

Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., Gressens, P., 2010. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants: Microglial colonization of the human forebrain. *J. Anat.* 217, 436–448. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x>

Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., Grayson, D.R., 1998. Functional and Pharmacological Differences Between Recombinant *N*-Methyl- D -Aspartate Receptors. *J. Neurophysiol.* 79, 555–566. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.2.555>

Volk, D.W., Austin, M.C., Pierri, J.N., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2000. Decreased Glutamic Acid Decarboxylase67 Messenger RNA Expression in a Subset of Prefrontal Cortical γ -Aminobutyric Acid Neurons in Subjects With Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 237. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.3.237>

von Engelhardt, J., Khrulev, S., Eliava, M., Wahlster, S., Monyer, H., 2011. 5-HT_{3A} Receptor-Bearing White Matter Interstitial GABAergic Interneurons Are Functionally Integrated into Cortical and Subcortical Networks. *J. Neurosci.* 31, 16844–16854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0310-11.2011>

Walker, D.G., McGeer, P.L., 1993. Complement gene expression in neuroblastoma and astrocytoma cell lines of human origin. *Neurosci. Lett.* 157, 99–102. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90652-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90652-2)

Wamsley, B., Fishell, G., 2017. Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 299–309. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.30>

Wang, H., Wang, M.X.-M., Su, N., Wang, L., Wu, X., Bui, S., Nielsen, A., Vo, H.-T., Nguyen, N., Luo, Y., Ma, X.-J., 2014. RNAscope for In situ Detection of Transcriptionally Active Human Papillomavirus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Vis. Exp.* 51426. <https://doi.org/10.3791/51426>

- Wang, H.-X., Gao, W.-J., 2010. Development of calcium-permeable AMPA receptors and their correlation with NMDA receptors in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex. *J. Physiol.* 588, 2823–2838. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187591>
- Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., Gupta, A., Wu, C., Silberberg, G., Luo, J., Markram, H., 2004. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat: Martinotti cells in somatosensory cortex. *J. Physiol.* 561, 65–90. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.073353>
- Watakabe, A., Ohtsuka, M., Kinoshita, M., Takaji, M., Isa, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Isa, T., Yamamori, T., 2015. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci. Res.* 93, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.09.002>
- Weinberger, D.R., 1987. Implications of Normal Brain Development for the Pathogenesis of Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 44, 660. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800190080012>
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N.L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadasiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., Schwab, Y., Gross, C.T., 2018. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.* 9, 1228. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>
- Weinstock, M., 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65, 427–451. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00018-1)
- Welsh, C.A., Stephany, C.-É., Sapp, R.W., Stevens, B., 2020. Ocular Dominance Plasticity in Binocular Primary Visual Cortex Does Not Require C1q. *J. Neurosci.* 40, 769–783. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1011-19.2019>
- Wible, C.G., Anderson, J., Shenton, M.E., Kricun, A., Hirayasu, Y., Tanaka, S., Levitt, J.J., O'Donnell, B.F., Kikinis, R., Jolesz, F.A., McCarley, R.W., 2001. Prefrontal cortex, negative symptoms, and schizophrenia: an MRI study. *Psychiatry Res.* 108, 65–78. [https://doi.org/10.1016/s0925-4927\(01\)00109-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4927(01)00109-3)
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G., Alvarez-Buylla, A., 1999. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2, 461–466. <https://doi.org/10.1038/8131>
- Wierenga, C.J., 2005. Postsynaptic Expression of Homeostatic Plasticity at Neocortical Synapses. *J. Neurosci.* 25, 2895–2905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5217-04.2005>
- Wiesel, T.N., Hubel, D.H., 1963. SINGLE-CELL RESPONSES IN STRIATE CORTEX OF KITTENS DEPRIVED OF VISION IN ONE EYE. *J. Neurophysiol.* 26, 1003–1017. <https://doi.org/10.1152/jn.1963.26.6.1003>
- Wiesel, T.N., Hubel, D.H., Lam, D.M.K., 1974. Autoradiographic demonstration of ocular-dominance columns in the monkey striate cortex by means of transneuronal transport. *Brain Res.* 79, 273–279. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90416-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90416-8)

- Wolff, A.R., Cheyne, K.R., Bilkey, D.K., 2011. Behavioural deficits associated with maternal immune activation in the rat model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 225, 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.033>
- Wollmer, M.A., Lucius, R., Wilms, H., Held-Feindt, J., Sievers, J., Mentlein, R., 2001. ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J. Neuroimmunol.* 115, 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00257-0)
- Woodruff, A.R., McGarry, L.M., Vogels, T.P., Inan, M., Anderson, S.A., Yuste, R., 2011. State-Dependent Function of Neocortical Chandelier Cells. *J. Neurosci.* 31, 17872–17886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3894-11.2011>
- Wright, A., Vissel, B., 2012. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front. Mol. Neurosci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00034>
- Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G.-Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E., Mucke, L., 2001. TGF- β 1 promotes microglial amyloid- β clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med.* 7, 612–618. <https://doi.org/10.1038/87945>
- Xu, X., Callaway, E.M., 2009. Laminar Specificity of Functional Input to Distinct Types of Inhibitory Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 29, 70–85. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4104-08.2009>
- Yamashita, T., Vavladeli, A., Pala, A., Galan, K., Crochet, S., Petersen, S.S.A., Petersen, C.C.H., 2018. Diverse Long-Range Axonal Projections of Excitatory Layer 2/3 Neurons in Mouse Barrel Cortex. *Front. Neuroanat.* 12, 33. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00033>
- Yamawaki, N., Borges, K., Suter, B.A., Harris, K.D., Shepherd, G.M.G., 2014. A genuine layer 4 in motor cortex with prototypical synaptic circuit connectivity. *eLife* 3, e05422. <https://doi.org/10.7554/eLife.05422>
- Yau, H.-J., 2003. Neural Development of the Neuregulin Receptor ErbB4 in the Cerebral Cortex and the Hippocampus: Preferential Expression by Interneurons Tangentially Migrating from the Ganglionic Eminences. *Cereb. Cortex* 13, 252–264. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.3.252>
- Yuste, R., Bonhoeffer, T., 2001. Morphological Changes in Dendritic Spines Associated with Long-Term Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1071–1089. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1071>
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2014. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
- Zhang, L.I., Bao, S., Merzenich, M.M., 2001. Persistent and specific influences of early acoustic environments on primary auditory cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 1123–1130. <https://doi.org/10.1038/nn745>
- Zhao, M.-G., Toyoda, H., Lee, Y.-S., Wu, L.-J., Ko, S.W., Zhang, X.-H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H., Li, B.-M., Kaang, B.-K., Zhuo, M., 2005. Roles of NMDA NR2B Subtype Receptor in Prefrontal Long-

Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *Neuron* 47, 859–872. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.014>

Zhuang, J., Ng, L., Williams, D., Valley, M., Li, Y., Garrett, M., Waters, J., 2017. An extended retinotopic map of mouse cortex. *eLife* 6, e18372. <https://doi.org/10.7554/eLife.18372>

Ziv, N.E., 2001. Recruitment of Synaptic Molecules during Synaptogenesis. *The Neuroscientist* 7, 365–370. <https://doi.org/10.1177/107385840100700505>

Ziv, N.E., Smith, S.J., 1996. Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron* 17, 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80283-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80283-4)

ANNEXES

ANNEXE 1 : UNE MUTATION ETIOLOGIQUE DU GENE FOXP2 PROVOQUE LA DIMINUTION DU GAIN NEURONAL DES CELLULES CORTICO-THALAMIQUES DE LA COUCHE VI DU CORTEX PAR AUGMENTATION DE LA SIGNALISATION GABA_B/GIRK

Objectif de l'étude

L'étude génétique d'une famille dans laquelle des déficits de l'énonciation et du langage se transmettent de manière autosomale dominante a permis d'identifier une mutation ponctuelle du gène *FOXP2*, codant pour le facteur de transcription Forkhead P2. La séquence de cette protéine est très conservée au cours de l'évolution des vertébrés. FoxP2 a été impliqué dans les fonctions de langage chez l'Homme, du chant chez les oiseaux et de vocalisation chez la souris. Son expression est retrouvée dans différentes régions du SNC dont le striatum, le thalamus, le cervelet, ainsi que dans les cellules corticales des couches profondes. L'étude de souris porteuses de mutations de *FoxP2* identifiées chez des membres des familles affectées par la pathologie a révélé des altérations motrices, ainsi que des défauts de vocalisation. Cependant, l'implication de ces mutations sur le développement et la physiologie neuronale est encore peu connue, notamment dans le cortex.

Nous avons donc décidé d'étudier l'impact d'une mutation de *FoxP2*, la mutation R552H, dans les neurones cortico-thalamiques de la couche VI du cortex auditif sur :

- La morphologie de l'arborisation dendritique de ces cellules ;
- La balance excitation/inhibition ;
- L'excitabilité neuronale et les courants portés par différentes conductances potassiques (delayed rectifier, A-type, et GIRK).

Méthodes utilisées

En l'absence de souris « rapportrice » permettant de visualiser les neurones exprimant Foxp2 (Foxp2+), qui constituent une minorité de neurones dans la couche VI du cortex, nous avons utilisé des souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *Nstr1*, qui est exprimé dans les neurones Foxp2+, afin d'identifier ces neurones *ex vivo*. Ces souris ont été croisées avec des souris portant l'allèle muté de FoxP2 (R552H). Nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de cortex

auditif de souris âgées de 23 à 28 jours. L'étude de la morphologie neuronale a été réalisée après reconstruction des neurones remplis à la biocytine lors des enregistrements électrophysiologiques.

Résultats

Nous avons retrouvé des phénotypes provoqués par la mutation de *FoxP2* dans les neurones pyramidaux du cortex auditif exprimant FoxP2 et notamment :

- Une diminution de la complexité de la dendrite apicale ;
- Une diminution des courants excitateurs sur ces cellules sans modification de l'inhibition ;
- Une diminution de l'excitabilité neuronale intrinsèque ; nous avons montré que cette diminution est due à une augmentation de la signalisation GABA_B/GIRK chez les mutants.

Conclusion

Notre étude démontre que la mutation R552H présente chez les patients affecte la morphologie et les propriétés physiologiques des cellules cortico-thalamiques du cortex auditif. La mutation étiologique R552H entraîne à la fois une perturbation de la balance excitation/inhibition et une diminution du gain neuronal suite à la sur-activation de la voie GABA_B/GIRK. Cette étude est la première à démontrer l'impact d'une mutation étiologique de FoxP2 sur l'excitabilité neuronale et l'activation de la voie GABA_B/GIRK.

An etiological *Foxp2* mutation impairs neuronal gain in layer VI cortico-thalamic cells through increased GABA_B/GIRK signaling

Abbreviated title: *Foxp2* controls GABA_B/GIRK signaling

Mélanie Druart^{1,2,3}, Matthias Groszer^{1,2,3} and Corentin Le Magueresse^{1,2,3}

¹Inserm UMR-S 1270, Paris 75005, France

²Sorbonne Université, Paris 75005, France

³Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin, Paris 75005, France

Correspondence: corentin.le-magueresse@inserm.fr

Acknowledgements

MD was the recipient of a PhD fellowship from the Doctoral School “Brain-Cognition-Behavior” (Sorbonne Université) and of a PhD fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM FDT201904008029). This work was supported by an ATIP/AVENIR grant to MG, and by starting funds from INSERM and by a Marie Curie Career Integration Grant from the European Union (334592) to CLM. We thank Rebecca Piskorowski for valuable comments on the manuscript, Dorthe Kaufhold for her help with morphological reconstructions, and Vincent Robert for providing custom-made procedures for Igor Pro.

Abstract

A rare mutation affecting the Forkhead box protein P2 (FOXP2) transcription factor causes a severe monogenic speech and language disorder. Mice carrying an identical point mutation to that observed in affected patients ($Foxp2^{+/R552H}$ mice) display motor deficits and impaired synaptic plasticity in the striatum. However, the consequences of the mutation on neuronal function, in particular in the cerebral cortex, remain little studied. $Foxp2$ is expressed in a subset of layer VI cortical neurons. Here we used Ntsr1-EGFP mice to identify $Foxp2^+$ neurons in the mouse auditory cortex *ex vivo* and crossed them with $Foxp2^{+/R552H}$ mice to study the functional impact of the R552H mutation on the morphological and functional properties of layer VI cortical neurons. The complexity of apical, but not basal dendrites was significantly lower in $Foxp2^{+/R552H}$ cortico-thalamic neurons than in control $Foxp2^{+/+}$ neurons. Excitatory synaptic inputs, but not inhibitory synaptic inputs were decreased in $Foxp2^{+/R552H}$ mice, reflecting diminished excitation/inhibition (E/I) balance. In response, homeostatic mechanisms would be expected to increase neuronal gain, i.e. the conversion of a synaptic input into a firing output. Yet, the intrinsic excitability of $Foxp2^+$ cortical neurons was lower in $Foxp2^{+/R552H}$ neurons. A-type and delayed-rectifier potassium currents, two putative transcriptional targets of $Foxp2$, were not affected by the mutation. In contrast, GABA_B/GIRK signaling, another presumed target of $Foxp2$, was increased in mutant neurons. Blocking GIRK channels strongly attenuated the difference in intrinsic excitability between wild-type and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons. Our results reveal a novel role for $Foxp2$ in the control of neuronal input/output homeostasis.

Significance statement

Mutations of the Forkhead-box protein 2 (*FOXP2*) gene in humans are the first known monogenic cause of a speech and language disorder. The $Foxp2$ mutation may directly affect neuronal development and function in neocortex, where $Foxp2$ is expressed. Brain imaging studies in patients with a heterozygous mutation in *FOXP2* showed abnormalities in cortical language-related regions relative to the unaffected members of the same family. Yet, the role of $Foxp2$ in neocortical neurons is poorly understood. Using mice with a $Foxp2$ mutation equivalent to that found in patients, we studied functional modifications in auditory cortex neurons *ex vivo*. We found that mutant neurons exhibit alterations of synaptic input and GABA_B/GIRK signaling, reflecting a loss of neuronal homeostasis.

Introduction

The identification of mutations and disruptions of *FOXP2*, the gene coding for the Forkhead-box protein P2 transcription factor, has provided the first example of a gene specifically implicated in a speech and language disorder, initially in the multigenerational KE family. Here around half the members carry a heterozygous *FOXP2* mutation which is inherited in an autosomal dominant manner (Lai et al., 2001). The mutation yields an arginine-to-histidine substitution (R553H) that disturbs the DNA-binding domain of the encoded transcription factor, thereby abolishing transcriptional repression (Lai et al., 2001; Vernes et al., 2006). Affected individuals suffer from developmental verbal dyspraxia, i.e. have difficulty mastering the rapid orofacial motor sequences necessary for fluent speech (Watkins et al., 2002; Vargha-Khadem et al., 2005). Speech deficits are accompanied by other expressive and receptive deficits in both oral and written language in affected members of the KE family (Watkins et al., 2002). It has long been suggested that critical roles of FOXP2 might lie further upstream than the motor system (Vargha-Khadem et al., 2005). Remarkably, fMRI studies revealed that the members of the KE family show significant cortex underactivation relative to the unaffected members in Broca's area and its right homolog, as well as in other cortical language-related regions and in the putamen (Liegeois et al., 2003). The Foxp2 protein sequence is highly similar in many vertebrate species (Enard et al., 2002), and is expressed in comparable regions of the brain (Ferland et al., 2003; Haesler et al., 2004; Teramitsu et al., 2004). This conservation pattern might allow using mouse models to study ancestral neuronal circuits which potentially have been recruited during language evolution (Scharff and Petri, 2011; French and Fisher, 2014). In mice, Foxp2 expression is found prominently in cortical layer VI, striatal medium spiny neurons, thalamus and cerebellar Purkinje cells. Expression starts during mid-embryogenesis and is maintained in the adult brain suggesting roles in both neuronal development and function (Ferland et al., 2003). Based on expression pattern and functional studies, it has been proposed that Foxp2 in common vertebrate ancestors plays important roles in development and/or function of cortico-striatal, cerebello-cortical and thalamo-cortical circuits influencing, in particular, sensory-motor processing (Vargha-Khadem et al., 2005; French et al., 2019). We previously generated a knock-in mouse line carrying an identical mutation to that of the KE family in the mouse homolog of the human *FOXP2* gene (R552H) (Groszer et al., 2008). Homozygous mutants display strong motor impairment and die around three weeks after birth. Heterozygous mutants show motor-skill deficits and altered vocalizations, and field potential recordings revealed impaired long-term depression at striatal glutamatergic inputs (Groszer et al., 2008). Furthermore, transgenic mice carrying the R552H mutation or other loss-of-function mutations in Foxp2 display decreased excitatory inputs and increased inhibitory inputs onto striatal medium spine neurons (Chen et al., 2016; van Rhijn et al., 2018). While Foxp2 plays a limited role on corticogenesis (Kast et al., 2019), the impact of Foxp2 mutations on neuronal development and function remains little studied. In particular, the role of Foxp2 in cortical neurons is largely unknown. Here we studied the impact of the KE family mutation on the morphology and electrophysiological properties of Foxp2-expressing (Foxp2⁺) neurons in the auditory cortex. We focused on the auditory cortex for three main reasons. First,

auditory feedback is crucial for language learning (Tallal et al., 1996; Kuhl, 2010). Second, *Foxp2* mutations in mice impair auditory processing and auditory-motor association learning (Kurt et al., 2009). Third, the structure of the auditory cortex is highly conserved across mammals which makes it well suited to study mouse models of *Foxp2*-associated disorders (Ehret, 1997; Kaas, 2005). We show that the R552H mutation affects neuronal morphology, excitation/inhibition balance as well as neuronal excitability through GABA_B/GIRK signaling, reflecting the loss of several homeostatic checkpoints in *Foxp2*⁺ layer VI cortico-thalamic neurons.

Materials and methods

Animals

We used transgenic *Ntsr1*-EGFP::*Foxp2*^{+/R552H} mice of either sex resulting from the cross of *Ntsr1*-EGFP (Tg(*Ntsr1*-EGFP/*Rpl10a*))TS16Htz (Doyle et al., 2008) and *Foxp2*^{+/R552H} mice. Animal care and procedures were according to local and international regulations for the use of experimental animals.

Immunohistochemistry

Juvenile mice (age P35) were anesthetized with pentobarbital and intracardially perfused with Roti-Histofix 4% (Carl Roth). The brains were removed and fixed overnight in Roti-Histofix. 50 µm sections were cut using a vibratome (Leica VT1000S). Free-floating sections were permeabilized and blocked in 0.2% Triton-PBS, 3% BSA-PBS for 60 min before incubation with the first antibody in 0.2% Triton, 3% BSA-PBS overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with the secondary antibody in PBS for 2h, washed again in PBS, and mounted. Primary antibodies were: goat anti-*Foxp2* (1:500, Santa Cruz), rabbit anti-GFP (1:1000, Sigma). Secondary antibodies were: anti-goat Cy3 (1:250, Jackson Immuno Research Laboratories), anti-rabbit Alexa 488 (1:1000, Invitrogen). The sections were analyzed by confocal microscopy (Leica SP5).

Acute slice preparation

250 µm-thick coronal slices were prepared from brains of *Ntsr1*-EGFP::*Foxp2*^{+/R552H} mice and control *Ntsr1*-EGFP::*Foxp2*^{+/+} littermates. Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg) and perfused transcordially with ice-cold (0–4°C) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) solution containing (in mM): 110 Choline chloride, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 11.6 L-ascorbic acid and 3.1 sodium pyruvate. The brain was extracted and acute coronal slices were cut in the same ice-cold solution using a vibroslicer (HM 650 V, Microm), then stored in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the following (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, and 1 MgCl₂, continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂. Slices were incubated in ACSF at 32°C for 20 minutes and then at room temperature (20-25°C). For patch-

clamp recordings, slices were transferred to the recording chamber where they were continuously superfused with ACSF (30-32°C) containing the following (in mM): 125 NaCl, 3.5 KCl, 1 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 25 glucose (pH 7.2, maintained by continuous bubbling with 95% O₂-5% CO₂). In some experiments, 3.5 mM KCl was changed to 1.5 mM KCl as indicated in the text.

Electrophysiology

Patch-clamp pipettes (4–6 Mohm resistance) were prepared from borosilicate glass (BF150-86-10; Harvard Apparatus) using a DMZ pipette puller (Zeitz).

Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik) using the following intracellular solution (in mM): 105 K-gluconate, 10 HEPES, 10 phosphocreatine-Na, 0.3 Na₃GTP, 4 MgATP, 30 KCl (pH 7.25, adjusted with KOH). To record miniature and evoked excitatory postsynaptic currents (mEPSCs and eEPSCs), the following intracellular solution was used (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Mg, 3 QX 314 (pH 7.25, adjusted with CsOH). mEPSCs were recorded at a holding potential of -70 mV in the presence of tetrodotoxin (TTX, 0.5 μM, Hello Bio) and SR95531 hydrobromide (Gabazine, 10 μM, Hello Bio). eEPSCs were recorded at a holding potential of -70 mV and triggered at a frequency of 0.1 Hz in the presence of GABA_A (10 μM) with a monopolar electrode connected to a constant current stimulator (Master 8, A.M.P.I.), positioned in layer 6 approximately 100 μm away from the recorded neuron. At least 12 consecutive sweeps were acquired and averaged for each experimental condition. To record miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs), we used an intracellular solution containing (in mM): 60 Cs methane sulfate, 70 CsCl, 10 HEPES, 10 Phosphocreatine, 0.2 EGTA, 8 NaCl, 2 ATP-Mg (pH 7.25, adjusted with CsOH). mIPSCs were recorded at a holding potential of -70 mV in the presence of TTX (0.5 μM, Hello Bio), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μM, Biotrend) and D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV, 50 μM, Hello Bio). Delayed-rectifier potassium channels were blocked with tetraethylammonium (TEA, 5 mM, Hello Bio). GIRK-mediated currents were blocked with barium chloride (100 μM, Sigma). Recordings of potassium channel-mediated currents were performed in the presence of CNQX 10 μM, D-APV 50 μM, Gabazine 10 μM to block synaptic activity, TTX 0.5 μM to block voltage-gated sodium channels and CdCl₂ 50 μM to block voltage-gated calcium channels.

Data acquisition and analysis

Stimulus delivery and data acquisition were performed using Patchmaster software (Heka Elektronik). The junction potentials (-14.9 mV for Cs-based intracellular solutions and -5 mV for the K⁺-based intracellular solution) were uncorrected. Signals were sampled at 20 kHz and filtered at 4 kHz. Offline analysis was performed using Clampfit (Molecular Devices) and Igor Pro (Wavemetrics). For the analysis of miniature PSCs, recordings were filtered offline at 2 kHz and analyzed using MiniAnalysis

(Synaptosoft). Series resistance was left uncompensated. Series resistance and input resistance were monitored by voltage steps of -10 mV. Experiments were discarded if the series resistance changed by more than 25% during the recording.

The paired-pulse ratio (PPR) of evoked synaptic currents was calculated as the mean amplitude of the synaptic response evoked by the second stimulation over that evoked by the first stimulation.

Action potential parameters were measured using the first action potential of the voltage response to a 140 pA-depolarizing current injection, which was the minimum current evoking at least one action potential in each recorded neuron.

For calculating delayed-rectifier (DR) and A-Type voltage-gated potassium channel-mediated currents (I_{DR} and I_A), leak subtraction was performed as follows: the current response to the first step of the family of depolarizing voltage command steps was scaled for each step of the family, and subtracted offline. This method was chosen over the classical p/n leak subtraction which is more sensitive to changes in inward-rectifying potassium (e.g. GIRK) channel expression in *Foxp2*^{+R552H} vs WT neurons. I_A was measured in the presence of TEA 5 mM to block DR currents. TEA reduced but did not eliminate the slowly decaying component of voltage-gated potassium currents, as previously reported for layer V pyramidal cells (Bekkers, 2000). Therefore I_A was measured for each voltage step by subtracting the residual I_{DR} (defined as the average residual current measured from 100 ms to 140 ms after the beginning of the depolarizing step) to the peak current.

To measure baclofen-induced currents, changes in holding currents in response to bath application of baclofen (100 μ M) were recorded at -65 mV every 2 s. The plotted values correspond to the difference between the baseline (average of 60 sweeps immediately prior to baclofen application) and the plateau response (average of 60 sweeps, starting 1 min after baclofen application).

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Prism (Graphpad). The normality of data distribution was tested using Shapiro-Wilk's test. Unpaired two-tailed t-tests (for normally distributed datasets) or Mann-Whitney tests (for non-normally distributed datasets) were used for comparisons between two groups. For multiple comparisons we used two-way ANOVA followed by Sidak's test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Morphological reconstructions

Brain slices of P27–P35 mice were prepared as described for electrophysiology. Neurons were patch-clamped for 10–30 min with biocytin in the patch pipette. After the pipette was withdrawn, slices were kept in the recording chamber for an additional 10 min and immersion-fixed in Roti-Histofix 4% (Carl

Roth) for 12–20 h at 4°C. Biocytin-filled cells were incubated with peroxidase-avidin-biotin complex (ABC, Vector Laboratories) and visualized with DAB-nickel sulfate. Subsequently, slices were mounted onto microscope slides and coverslipped with Mowiol. Morphological reconstructions and Sholl analysis were performed with the aid of a NeuroLucida 3D reconstruction system and NeuroExplorer Software package (MicroBrightField).

Results

The vast majority of *Foxp2*⁺ neurons in neocortex are located in layer VI. However, the lack of mice expressing fluorescent proteins under the control of the *Foxp2* promoter precludes the identification of *Foxp2*⁺ neurons *ex vivo* in acute brain slices. The *Ntsr1* promoter has been shown to drive transgene expression in nearly all *Foxp2*⁺ layer VI neurons (Sundberg et al., 2018). We recently reported the co-expression of EGFP and *Foxp2* in the cortex of mice expressing the EGFP-L10a transgene under the control of the *Ntsr1* promoter (*Ntsr1*-EGFP mice) (Doyle et al., 2008; Medvedeva et al., 2018). To confirm that EGFP expression in *Ntsr1*-EGFP mice may enable the identification of *Foxp2*⁺ neurons in the auditory cortex, we performed immunostainings for EGFP and *Foxp2* in brain slices from *Ntsr1*-EGFP mice. EGFP and *Foxp2* strongly co-localized in all cortical areas that were examined including auditory cortex (**Fig.1A-C**). Thus, in the auditory cortex, 95.9 ± 1.1 % of EGFP⁺ neurons expressed *Foxp2*. Conversely, 81.7 ± 2.3 % of *Foxp2*⁺ neurons expressed EGFP (**Fig.1D**). These results indicate that EGFP expression in the *Ntsr1*-EGFP mouse cortex allows the identification and electrophysiological recording of *Foxp2*⁺ cortical neurons *ex vivo*. Next we crossed *Ntsr1*-EGFP mice and *Foxp2*^{+/R552H} mice to study the impact of the R552H mutation on the morpho-functional properties of *Foxp2*⁺ neurons in the auditory cortex. We will henceforth refer to *Ntsr1*-EGFP::*Foxp2*^{+/+} mice as wild-type mice and to *Ntsr1*-EGFP::*Foxp2*^{+/R552H} mice as *Foxp2*^{+/R552H} or mutant mice.

In neocortex, layer VI pyramidal cells are subdivided into cortico-thalamic and cortico-cortical neurons. Cortico-thalamic neurons are upright pyramidal cells with an apical dendrite extending up to layer IV, and sometimes layer II-III. Cortico-cortical neurons constitute the other main excitatory neuron subtype. Their dendritic morphologies comprise inverted pyramids, bipolar cells and short upright pyramids. Their dendrites arborize locally, never extending beyond layer V (Thomson, 2010). To study the anatomy of *Foxp2*⁺ neurons in cortical layer VI, we patch-clamped EGFP⁺ neurons in acute auditory cortex slices from juvenile (P27-P35) wild-type mice. Patched neurons were filled with biocytin through the patch pipette before streptavidin-mediated staining and morphological reconstruction. The apical dendrite of biocytin-filled neurons extended at least up to layer IV, and often beyond layer IV, a characteristic feature of cortico-thalamic projection neurons (Thomson, 2010) (**Fig.2A**). This is consistent with previous studies showing that cortico-thalamic projecting cells in layer VI of the primary visual cortex express *Ntsr1* (Gong et al., 2007; Velez-Fort et al., 2014) and that *Foxp2* expression is restricted to *Ntsr1*-Cre expressing neurons in the visual and somatosensory cortices (Tasic et al., 2016; Sundberg et al., 2018;

Kast et al., 2019). Thus, layer VI Foxp2⁺ neurons in the auditory cortex are mostly cortico-thalamic projection neurons. We next examined the morphology of EGFP⁺ neurons from Foxp2^{+/R552H} mice. While gross neuronal morphology did not differ between wild-type and Foxp2^{+/R552H} neurons (**Fig. 2A**), Sholl analysis revealed that apical dendrites in Foxp2 mutants had fewer intersections at individual Sholl radii than the corresponding dendrites in wild-type controls, indicating decreased dendrite complexity (two-way repeated measures ANOVA, main effect: $F_{(1,25)} = 7.87$, $P = 0.0096$; WT: n = 13 cells from 4 mice; Foxp2^{+/R552H}: n = 14 cells from 3 mice; **Fig.2B**). The complexity of basal dendrites was not affected by the mutation (two-way repeated measures ANOVA, main effect: $F_{(1,25)} = 0.35$, $P = 0.56$; Fig.2B). In the same cells, apical dendrite branches in Foxp2^{+/R552H} neurons also showed a near-significant trend towards reduced length which was not found in basal dendrites (two-way repeated measures ANOVA, main effect, apical: $F_{(1,25)} = 3.83$, $P = 0.062$; basal: $F_{(1,25)} = 0.29$, $P = 0.60$; **Fig.2C**). These data show that the heterozygous R552H mutation decreases the length and complexity of apical dendrites in layer VI cortico-thalamic neurons.

The processing of information by cortical pyramidal neurons is determined by the timing, frequency and amplitude of synaptic inputs, and by neuronal gain, i.e. the conversion of synaptic inputs into a firing output. To identify the neuronal functions compromised in the cortex of Foxp2^{+/R552H} mice, we examined synaptic transmission and intrinsic excitability, i.e. the propensity of a neuron to fire action potentials when subjected to an input current, in Foxp2⁺ neurons of the auditory cortex *ex vivo*.

We first focused on excitatory synapses where the role of Foxp2 is unclear. In striatal medium spiny neurons, loss-of-function mutations in Foxp2 decrease both spine density and the frequency of mEPSCs (Chen et al., 2016; van Rhijn et al., 2018). In contrast, ectopic expression of Foxp2 in cultured cortical neurons resulted in a lower density of excitatory synaptic markers and spines, without a change in the density of inhibitory synapses, suggesting that Foxp2 opposes synapse formation and/or maintenance (Sia et al., 2013). Here we examined spontaneous synaptic activity in Foxp2⁺ neurons from wild-type and Foxp2^{+/R552H} mice in the presence of TTX to block action potential-mediated synaptic transmission. The frequency of mEPSCs was strongly reduced in Foxp2^{+/R552H} neurons while the amplitude of mEPSCs was unchanged (frequency: Mann-Whitney test, $P = 0.0026$; amplitude: t-test, $P = 0.42$; WT: n = 16 cells from 4 mice; Foxp2^{+/R552H}: n = 13 cells from 3 mice; **Fig.3A-B**). Changes in mEPSC frequency may reflect presynaptic changes in the probability of neurotransmitter release, or a decreased number of synaptic contacts. Layer VI cortico-thalamic neurons receive most of their excitatory synaptic inputs from layer IV and layer V (Thomson, 2010), where Foxp2 is little or not expressed, suggesting that presynaptic changes may be unlikely to account for the strong decrease in mEPSC frequency that we observe in Foxp2^{+/R552H} mouse cortex. However, Foxp2 is also expressed in the thalamus (Ferland et al., 2003) and thalamo-cortical axons project onto layer VI pyramidal neurons (Thomson, 2010), raising the possibility that presynaptic alterations might contribute to mEPSC frequency changes. In order to assess presynaptic changes in release probability we measured the paired-pulse ratio of evoked synaptic

currents. The paired-pulse ratio was similar in mutant and wild-type neurons for paired-pulse intervals of 50, 100 and 200 ms (two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,36)} = 0.00021$, $P = 0.99$; WT: $n = 20$ cells from 3 mice; $Foxp2^{+/R552H}$: $n = 18$ cells from 3 mice; **Fig.3C-D**). These results indicate that the mEPSC frequency decrease in $Foxp2^{+/R552H}$ neurons reflects decreased synapse number, rather than presynaptic alterations of neurotransmitter release.

Loss of *Foxp2* function may also affect inhibitory synapses, as indicated by the increase in inhibitory currents in D1 receptor-expressing striatal neurons from mice with a heterozygous *Foxp2* mutation (van Rhijn et al., 2018). Therefore we recorded mIPSCs in WT and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons of the auditory cortex to investigate GABAergic synapse properties. The frequency and amplitude of mIPSCs was similar in $Foxp2^{+/R552H}$ and control neurons (frequency: Mann-Whitney test, $P = 0.66$, amplitude: t-test, $P = 0.47$; WT: $n = 12$ cells from 3 mice, $Foxp2^{+/R552H}$ cells: $n = 14$ cells from 4 mice; **Fig.3E-F**). Taken together, these results indicate an imbalance between excitation and inhibition in layer VI cortico-thalamic neurons in $Foxp2^{+/R552H}$ mice, resulting in reduced neuronal excitability.

To examine intrinsic excitability in *Foxp2*⁺ neurons, we monitored the firing of action potentials in response to 500 ms depolarizing current steps from a membrane potential of -70 mV, in the presence of APV, CNQX and GABAzine to block synaptic activity. We found that intrinsic excitability was significantly reduced in $Foxp2^{+/R552H}$ neurons (two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,64)} = 4.79$, $P = 0.032$; interaction, $F_{(25,1600)} = 5.80$, $P < 0.0001$; WT: $n = 30$ cells from 8 mice, $Foxp2^{+/R552H}$ neurons: $n = 36$ cells from 8 mice; **Fig.4A-B**), in the absence of significant changes in action potential parameters (Mann-Whitney test, threshold: $P = 0.93$; amplitude: $P = 0.11$; half-width: $P = 0.41$; **Fig.4C-E**). The resting membrane potential was comparable in control and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons (WT: -69.4 ± 0.8 mV; $Foxp2^{+/R552H}$: -69.3 ± 0.7 mV; t-test, $P = 0.89$; **Fig.4F**). Neuronal capacitance was also similar (WT: 33.2 ± 3.6 pF; $Foxp2^{+/R552H}$: 35.5 ± 2.9 pF; Mann-Whitney test, $P = 0.40$; **Fig.4G**). The input resistance was slightly, but not significantly, increased in $Foxp2^{+/R552H}$ neurons, possibly as a consequence of their shorter dendritic arbor (WT: 192 ± 10 M Ω ; $Foxp2^{+/R552H}$: 218 ± 13 M Ω ; Mann-Whitney test, $P = 0.09$; **Fig.4H**). Higher input resistance, however, should result in increased intrinsic excitability, while we observed the opposite. We hypothesized that the R552H mutation may alter the expression of specific ion channels, and set out to identify the conductance(s) responsible for the decrease in neuronal excitability. Previous studies using chromatin immunoprecipitation coupled to microarray analysis (ChIP on chip) in heterologous cell lines and in cells from the developing human brain identified two ion channel subunit-encoding genes that are regulated by *Foxp2*, namely *KCNB1* and *KCND1* (Spiteri et al., 2007; Vernes et al., 2007). *KCNB1* encodes $K_{v2.1}$, a delayed-rectifier potassium channel subunit. *KCND1* encodes $K_{v4.1}$, an A-type potassium channel subunit. We hypothesized that increased $K_{v2.1}$ and/or $K_{v4.1}$ expression may contribute to decreased excitability in $Foxp2^{+/R552H}$ neurons. We measured delayed-rectifier and A-type potassium currents using the whole-cell configuration. We found

that delayed-rectifier potassium currents were not significantly altered in *Foxp2*^{+R552H} neurons (WT: n = 24 cells from 4 mice; *Foxp2*^{+R552H}: n = 23 cells from 4 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,45)} = 0.16$, $P = 0.67$; **Fig.5A-C**). A-type potassium currents were also similar in *Foxp2*^{+R552H} and control neurons (WT: n = 21 cells from 3 mice; *Foxp2*^{+R552H} neurons: n = 20 cells from 3 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,39)} = 0.028$, $P = 0.87$; **Fig.5D-F**). These results indicate that neither $K_v2.1$ nor $K_v4.1$ expression is affected by the loss of function of *Foxp2* in layer VI *Foxp2*^{+R552H} neurons.

We then set out to investigate potassium conductances that are not direct transcriptional targets of *Foxp2*. In the aforementioned ChIP on chip experiments, *FOXP2* was also shown to regulate the expression of *GABBR1*, a gene coding for the $\beta 1$ subunit of GABA_B receptors (Spiteri et al., 2007; Vernes et al., 2007). GABA_B receptors are metabotropic GABA receptors that are linked via G-proteins to potassium channels of the G protein-gated inwardly rectifying (GIRK) family. GIRK channels hyperpolarize neurons in response to the activation of G-protein coupled receptors and thus control the excitability of neurons through GIRK-mediated inhibition (Luscher and Slesinger, 2010). We surmised that *Foxp2*-dependent GABA_B/GIRK channel activity may contribute to decrease neuronal excitability in *Foxp2*^{+R552H} neurons. We first sought to confirm that potassium conductances are responsible for the decrease in neuronal excitability in *Foxp2*^{+R552H} mice. We reasoned that if voltage-independent GIRK channels are involved, lowering the extracellular potassium concentration should increase the driving force for potassium and amplify the effect of the R552H mutation on neuronal excitability at lower depolarizing currents, where the equilibrium potential for potassium (-95.7 mV) is close to the membrane potential. Indeed, upon changing the extracellular concentration from 3.5 mM to 1.5 mM, which in our experimental conditions decreased the equilibrium potential for potassium from -95.7 mV to -117.9 mV, we noticed that the difference in firing frequency between control and mutant neurons became significant for lower depolarizing currents (WT: n = 18 cells from 3 mice, *Foxp2*^{+R552H} neurons: n = 22 cells from 3 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,38)} = 10.50$, $P = 0.0025$; Sidak's post-hoc test: $p < 0.05$ at 100 pA for $[K^+] = 1.5$ mM instead of 360 pA for $[K^+] = 3.5$ mM, **Fig.6A-B**; compare with **Fig.4B**). These results supported the hypothesis that voltage-independent potassium channels are upregulated in *Foxp2*^{+R552H} mice.

To assess GABA_B/GIRK signaling, we first examined whether *Foxp2*⁺ neurons in the auditory cortex express GABA_B receptors. In 6 voltage-clamped *Foxp2*⁺ neurons from 4 control mice, bath application of the GABA_B agonist baclofen (30 μ M) evoked an outward current ($I_{Baclofen}$) readily reversed by the specific antagonist CGP-54626 (10 μ M), in line with a previous study demonstrating GABA_B receptor expression in cortical layer 5-6 pyramidal cells (Hearing et al., 2013) (**Fig.7A**). $I_{Baclofen}$ was also abolished in the presence of the GIRK blocker barium (Ba^{2+} , 100 μ M; n = 9 cells from 5 mice; **Fig.7B**). In the presence of baclofen (30 μ M), intrinsic excitability was strongly decreased in wild-type mice, indicating

that activation of GABA_B-R recapitulates the effect of the *Foxp2* mutation on neuronal excitability (control: n = 30 cells from 8 mice, baclofen: n = 15 cells from 3 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,43)} = 10$, $P = 0.0029$; **Fig.7C-D**). We then investigated whether the *Foxp2* mutation changed $I_{Baclofen}$. We found that $I_{Baclofen}$ was significantly higher in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons, consistent with increased GABA_B receptor expression in *Foxp2* mutant neurons with diminished *Foxp2* transcriptional activity (WT: n = 27 cells from 12 mice, *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons: n = 16 cells from 7 mice; Mann-Whitney test, $P = 0.020$; **Fig.7E-F**).}}

The cell surface expression of GIRK channels and GABA_B receptors is co-regulated (Padgett et al., 2012; Hearing et al., 2013). We tested the hypothesis that GIRK channel activity is upregulated as a consequence of increased GABA_B receptor expression in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons. In line with this hypothesis, inward-rectifying potassium currents were larger in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons than in control neurons (WT: n = 25 cells from 4 mice, *Foxp2*^{+/^{R552H} : n = 20 cells from 4 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,43)} = 4.27$, $P = 0.045$; **Fig.8A-C**). Ba²⁺ (100 μM) linearized the i-v curve of potassium currents, confirming that inward-rectifying potassium GIRK channels were blocked (Fig.8D). In the presence of Ba²⁺, the input resistance increased sharply both in *Foxp2*^{+/^{R552H} and in control neurons (Fig.8E; compare with **Fig.4E**). However, the increase in input resistance was more pronounced in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons than in control neurons, resulting in a 24.6% higher mean input resistance in mutant neurons than in WT neurons in the presence of Ba²⁺ (WT: n = 20 cells from 4 mice; *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons: n = 25 cells from 3 mice; Mann-Whitney test, $P = 0.0037$, **Fig.8D-E**). Thus, GIRK channel activity in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons strongly decreases membrane resistance; blocking those channels unmasked the increased input resistance presumably resulting from smaller apical dendrites in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons. Indeed i-v curves in *Foxp2*^{+/^{R552H} and control neurons in the presence of Ba²⁺ became comparable after normalizing for differences in input resistance (**Fig.8F**).}}}}}}}}}

Finally, we tested whether elevated GIRK activity is responsible for the decreased excitability of *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons. In the presence of Ba²⁺, the difference in intrinsic excitability between *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons and control neurons was strongly attenuated (WT: n = 17 cells from 3 mice, *Foxp2*^{+/^{R552H} : n = 16 cells from 3 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,31)} = 0.81$, $P = 0.37$; **Fig.8G-H**).}}}

In summary, increased GABA_B receptor expression and the concomitant increase in GIRK channel activity decreases neuronal excitability in *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons.}

Discussion

In this study, we show that the arginine to histidine substitution in Foxp2 found in affected members of the KE family alters neuronal morphology and function in auditory cortex. We report three major neuronal deficits in heterozygous mutants. First, mutant Foxp2⁺ neurons have less complex apical dendrites. Second, the excitatory/inhibitory balance is disrupted in mutant neurons, as shown by the decrease in the frequency of spontaneous excitatory, but not inhibitory synaptic events. Third, mutant neurons are less excitable, which is largely the consequence of an increase in GABA_B/GIRK signaling. While decreased neurite length and excitatory synapse number were previously shown to be controlled by Foxp2 in striatal neurons, this is the first demonstration of Foxp2-dependent GABA_B and GIRK activation. The etiological R552H mutation results in both decreased E/I balance and decreased neuronal gain through GABA_B/GIRK overactivation, reflecting a loss of homeostasis in Foxp2⁺ cortical neurons.

Reduced dendrite length

We observed a significant reduction in the length and complexity of apical dendrites in Foxp2^{+/R552H} neurons of the auditory cortex. Reduced neurite growth was also found in striatal medium spiny neurons of mutant mice carrying one nonfunctional Foxp2 allele. Conversely, medium spiny neurons show increased dendrite length in mice with a humanized, “gain-of-function” Foxp2 gene (Enard et al., 2009). The humanized Foxp2 also increases dendrite length in layer VI neurons of the motor cortex and neurons in the thalamus (Reimers-Kipping et al., 2011). An unbiased genomic screen in mouse embryos identified Foxp2-dependent gene networks involved in neurite outgrowth in the developing brain (Vernes et al., 2011). Thus, Foxp2-dependent gene expression during early development shapes mature neuronal morphology and hence connectivity. Several direct transcriptional targets of the Foxp2 protein have been associated with neurite growth. For example, the Neuritin-encoding *Nrn1* gene promotes neuritogenesis under the control of neural activity and neurotrophins (Naeve et al., 1997). Other putative mediators of Foxp2 effects on neuronal morphology include *Efnb2* (Ephrin-b2), and *Pak3*, a downstream effector of the Rho family of GTPases, both of which play critical roles in neurite growth (Yue et al., 1999; Huang et al., 2011; Vernes et al., 2011). Therefore the effect of the R552H mutation on neuronal morphology is likely to result from the loss of Foxp2-mediated transcriptional control at multiple loci in the genome of developing neurons, although indirect, activity-dependent morphological changes cannot be ruled out.

Selective loss of excitatory inputs

The selective loss of excitatory, but not inhibitory input in Foxp2^{+/R552H} neurons is consistent with results demonstrating that Foxp2 promotes excitatory synapse formation in the developing striatum by negatively regulating myocyte enhancer factor 2C (*MEF2C*) (Chen et al., 2016), a gene associated with severe mental retardation and cerebral malformations (Le Meur et al., 2010). Chromatin immunoprecipitation coupled to qPCR (ChIP-qPCR) showed direct binding of Foxp2 to the second intron of the *MEF2C* gene (Chen et al., 2016). Other results, however, suggested that Foxp2 opposes

synapse formation. Thus, *Foxp2* was shown to directly repress the expression of *SRPX2*, a language-associated gene that promotes synapse formation in cortical neurons (Sia et al., 2013). Cultured neocortical neurons transfected with *FoxP2* have a decreased density of excitatory synaptic markers and spines, which is rescued by the co-transfection of *Foxp2* and *SRPX2*. In addition, expression of a mutant *Foxp2* protein with the R552H mutation does not change synaptic density, demonstrating that the transcriptional activity of *Foxp2* is necessary for its effect on synaptic density. Interestingly, overexpression of wild-type *Foxp2* in cortical neurons also causes an *SRPX2*-independent decrease in the number of primary dendrites and in total dendritic length (Sia et al., 2013). In summary, *Foxp2* overexpression *in vitro* recapitulates the effects on synaptic density and dendritic branching that we observed in *Foxp2* mutants with decreased transcriptional activity *in vivo*. Thus, a fine balance of *Foxp2* expression appears to be critical for maintaining synapse density and dendritic length. While the discrepancies between studies on the developing striatum and on cultured neocortical neurons had been interpreted as the consequence of a differentiated role for *Foxp2* in distinct brain structures (Chen et al., 2016), our results suggest that *Foxp2* promotes excitatory synapse formation and dendritic length in both striatum and cortex *in vivo*.

Increased GABA_B/GIRK signaling

The overactivation of GABA_B/GIRK signaling in *Foxp2* mutant neurons decreases intrinsic neuronal excitability through elevated GIRK activity. GIRK channels are activated by binding of the G protein subunits Gβγ to their intracellular domains following the activation of GABA_B receptors, but they also show constitutive activity even in the absence of GABA_B signaling, due to direct binding of the Gα subunit (Peleg et al., 2002; Lujan et al., 2009). Since GIRK channels are voltage-independent potassium channels, basal GIRK channel activity decreases membrane resistance, and thus decreases excitability, even at membrane potentials that are close to the resting membrane potential. Heightened GABA_B/GIRK signaling in *Foxp2*^{+R552H} mutant mice has also other implications for cortical neurotransmission. It has been proposed that GABA_B receptors/GIRK channels complexes may be located in the vicinity of postsynaptic GABA_A receptors or in a neighboring dendritic spine (Luscher and Slesinger, 2010). Strong or repetitive stimulation of GABAergic axons, for example in conditions of rhythmic activity, activates GABA_B receptors through GABA spillover from nearby inhibitory synapses and mediates a slow, GIRK-mediated synaptic current (Scanziani, 2000). This suggests that *Foxp2*^{+R552H} neurons may receive increased inhibitory inputs in conditions of elevated network activity.

Loss of homeostasis

The identification of genomic variants associated with neurodevelopmental syndromes is rapidly advancing. It has been proposed that disease-associated variants converge on common molecular networks mediating distinct endophenotypes, such as speech and language, across clinically distinct syndromes. Disrupted neuronal homeostasis may precipitate at the network level leading to common clinical endpoints (Ramocki and Zoghbi, 2008). Here we show that the R552H mutation disrupts two

distinct homeostatic mechanisms. First, the excitation/inhibition (E/I) ratio which is tightly regulated during normal brain development (Liu, 2004; Zhang et al., 2011) is altered in mutant cortex due to a selective decrease in the number of functional excitatory synapses, in the absence of inhibitory synapse alteration. This is consistent with the decreased E/I ratio observed in the striatum of loss-of-function *Foxp2* mutant mice, although we did not detect in cortical *Foxp2*⁺ neurons the increase in mIPSC amplitude found in D1 receptor-expressing (*Foxp2*⁺) striatal neurons (van Rhijn et al., 2018). Other homeostatic mechanisms allow neural networks to maintain stability of activity in the face of changing inputs. For instance, blocking excitatory synaptic activity results in a homeostatic decrease in neuronal intrinsic excitability (Desai et al., 1999). Conversely, lowering neuronal excitability increases excitatory synaptic input (Turrigiano et al., 1998). Thus, homeostatic mechanisms compensate a lack of excitatory inputs by increasing intrinsic neuronal excitability, and vice versa. Here we show that the R552H mutation in *Foxp2* decreases both excitatory inputs and intrinsic excitability, indicating that the homeostatic control of neuronal gain is disrupted. Interestingly, our results show that in the presence of barium, a GIRK channel blocker, *Foxp2*^{+/R552H} neurons have a much higher input resistance than control neurons. Increased input resistance should counteract the loss of excitatory inputs by increasing neuronal gain. However, increased GIRK signaling shifts neuronal gain in the other direction by decreasing intrinsic excitability in mutant neurons. In summary, the combined loss of excitatory synapses and increased GABA_B/GIRK signaling leads to decreased excitability of *Foxp2*⁺ neurons. *Foxp2*^{+/R552H} neurons are thus unable to achieve homeostatic compensation of either intrinsic excitability through increased excitatory input or of synaptic function through increased gain.

Relevance for cortical activity

A concurrent decrease in E/I ratio and neuronal gain in cortical layer VI is susceptible to alter cortical function. Layer VI cortico-thalamic neurons send collaterals to deep cortical layers in addition to their axonal projection onto thalamic nuclei (Thomson, 2010). Pharmacological experiments in visual cortex *in vivo* revealed that layer VI neurons predominantly recruit inhibitory networks that control “end inhibition” in layer IV, i.e. the propensity of some neurons to respond more strongly to short stimuli than to long ones (Bolz and Gilbert, 1986). More recent studies using optogenetics showed that the selective activation of layer VI cortico-thalamic neurons recruits fast-spiking inhibitory interneurons to modulate the strength of cortical responses in all cortical layers (Olsen et al., 2012; Bortone et al., 2014). In addition, layer VI cortico-thalamic neurons exert a suppressive effect on the thalamus, via their projection to the thalamus reticular nucleus which exclusively consists of inhibitory neurons (Olsen et al., 2012). While these studies were performed in visual cortex, the conservation of basic connectivity patterns in different cortices suggests that the recruitment of cortical *Foxp2*⁺ neurons tends to decrease upper cortex activity and, to a lesser extent, thalamic activity. Therefore our findings suggest that loss-of-function *Foxp2* mutations promote the excitability of upper cortical layers and thalamic nuclei, which may be relevant for the pathological consequences of loss-of-function *Foxp2* mutations.

Figures and legends

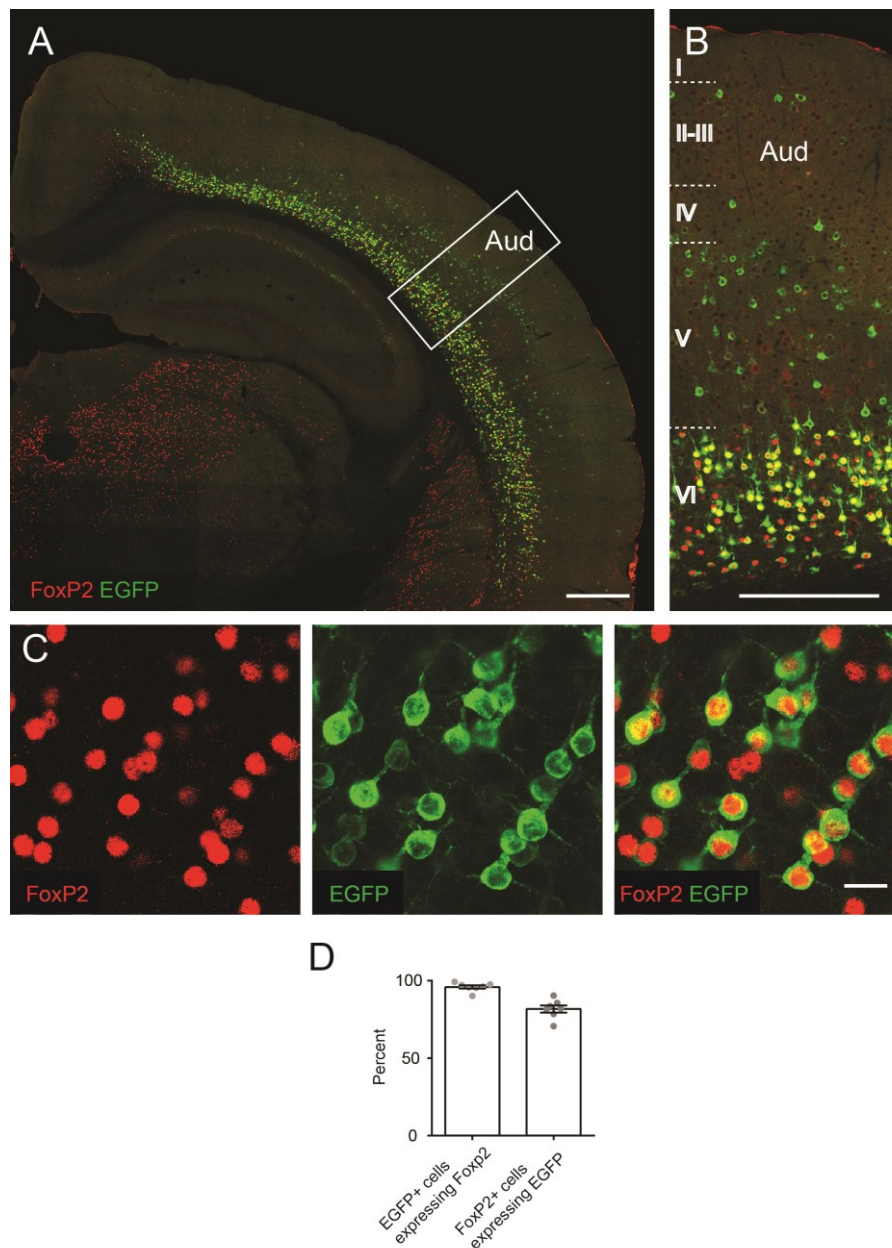


Figure 1. Transgenic approach to study auditory cortex Foxp2+ neurons in mice carrying the R552H mutation

A, Double immunostaining for EGFP (in green) and Foxp2 (in red) in a coronal brain slice from an NTSR1-EGFP mouse; scale bar, 500 μ m. **B**, Enlargement of the boxed area in **A**, showing the expression of Foxp2 predominantly in layer VI in auditory cortex (dashed white lines delineate cortical layers); scale bar, 250 μ m. **C**, Layer VI EGFP+ neurons in Ntsr1-EGFP mice also express Foxp2; scale bar, 20 μ m. **D**, Quantification of EGFP-Foxp2 colocalization in layer VI (n=7 slices from 3 mice); histograms represent the mean \pm SEM; full circles show individual recordings.

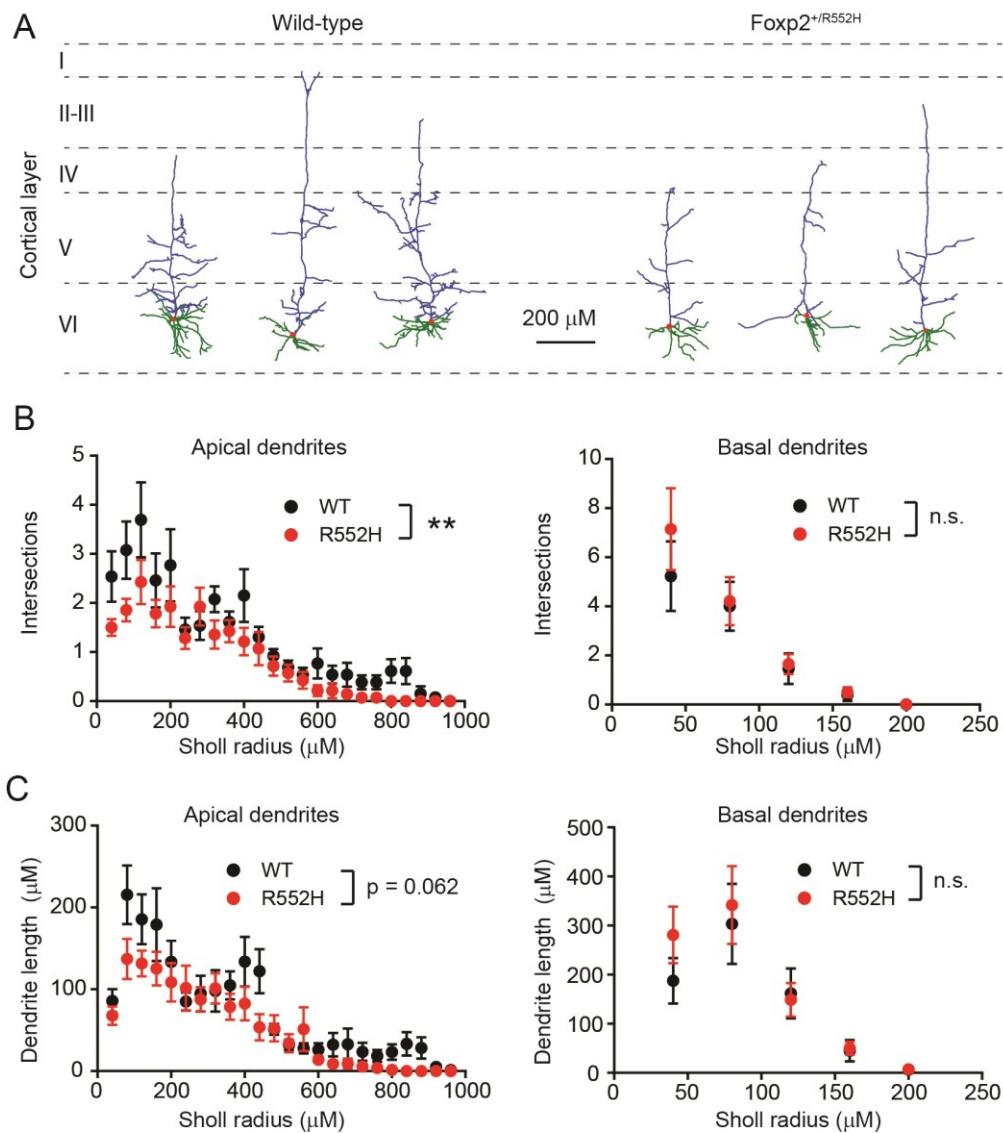


Figure 2. Sholl analysis demonstrating decreased apical dendrite arborisation of Foxp2^{+/R552H} cortical neurons

A, Representative examples of the dendritic trees of control and Foxp2^{+/R552H} neurons. The apical dendrite is in blue, basal dendrites are in green. **B-C**, Sholl analysis of auditory cortex neurons showing less complex dendritic arbour (B) and decreased length of apical dendrite branches (C) in Foxp2^{+/R552H} neurons; two-way repeated measures ANOVA, main effect, apical dendrite intersections: $F_{(1,25)} = 7.87$, $P = 0.0096$, basal dendrite intersections: $F_{(1,25)} = 0.35$, $P = 0.56$, apical dendrite length: $F_{(1,25)} = 3.83$, $P = 0.062$, basal dendrite length: $F_{(1,25)} = 0.29$, $P = 0.60$; WT: n = 13 cells from 4 mice; Foxp2^{+/R552H}: n = 14 cells from 3 mice. Data are represented as mean ± SEM.

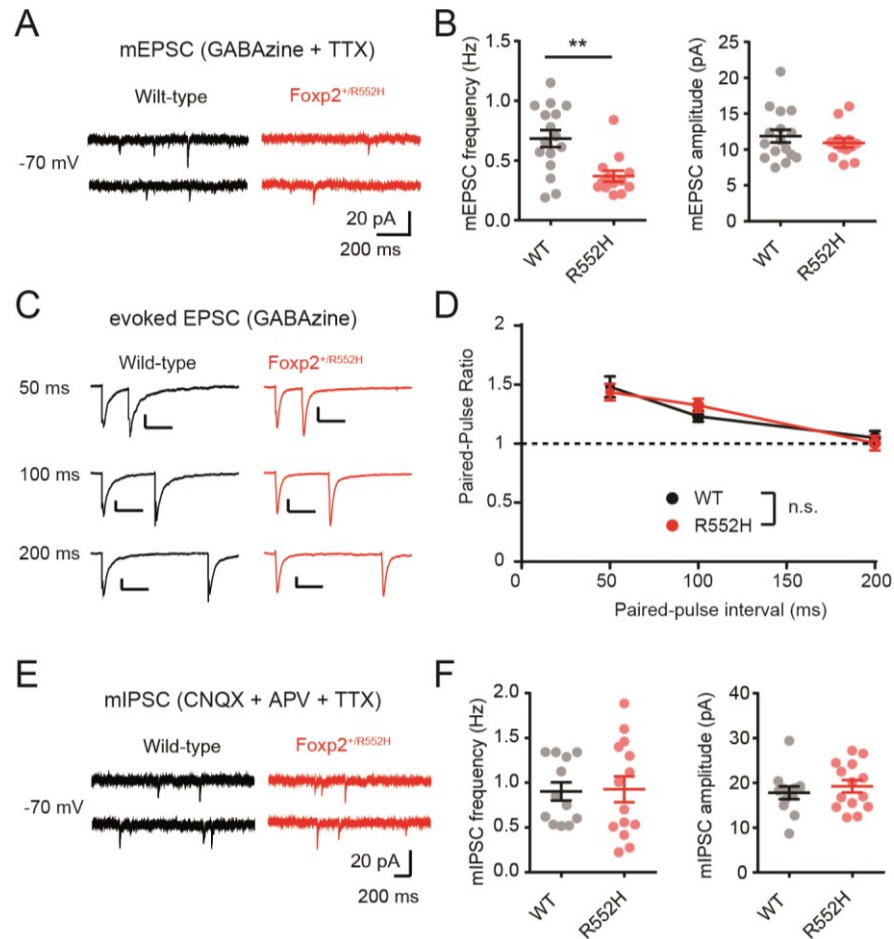


Figure 3. Decrease in excitatory, but not inhibitory synaptic transmission in Foxp2^{+R552H} cortical neurons

A, Sample traces of mEPSCs from WT and Foxp1 KO cells recorded at -70 mV in the presence of TTX and GABA_A. **B**, mean mEPSC frequency and amplitude in control and Foxp2^{+R552H} neurons (frequency: Mann-Whitney test, $P = 0.0026$; amplitude: t-test, $P = 0.42$, WT: $n = 16$ cells from 4 mice; Foxp2^{+R552H}: $n = 13$ cells from 3 mice). **C**, Average traces of EPSCs evoked by paired-pulse stimulation with 50 ms, 100 ms and 200 ms interpulse intervals, recorded from a control neuron (left traces) and a Foxp2^{+R552H} neuron (right traces). **D**, Unchanged paired-pulse ratio (PPR) for interpulse intervals of 50 ms, 100 ms and 200 ms, indicating an absence of presynaptic release alterations in Foxp2^{+R552H} neurons. WT: $n = 20$ cells from 3 mice; Foxp2^{+R552H}: $n = 18$ cells from 3 mice; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,36)} = 0.00021$, $P = 0.99$. **E**, Example traces of miniature IPSCs from each genotype recorded at -70 mV in the presence of TTX, APV and CNQX using a high chloride intracellular solution. **F**, Mean mIPSC frequency and amplitude in WT ($n = 12$ cells from 3 mice) and Foxp2^{+R552H} cells ($n = 14$ cells from 4 mice); frequency: Mann-Whitney test, $P = 0.66$, amplitude: t-test, $P = 0.47$. Throughout, data are represented as mean \pm SEM.

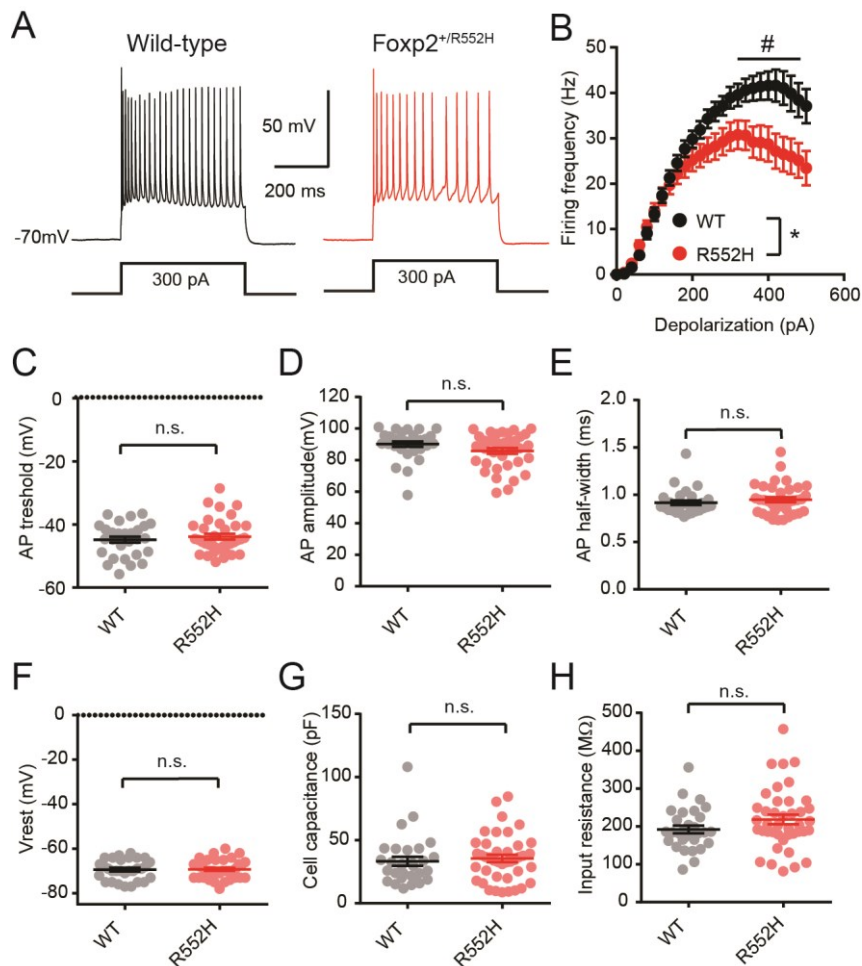


Figure 4. Decreased intrinsic excitability in $Foxp2^{+/R552H}$ cortical neurons

A, Sample spike trains evoked by a 300 pA somatic current injection in a wild-type (left) and a $Foxp2^{+/R552H}$ neuron (right). **B**, mean f-i curve for control (n = 30 cells from 8 mice) and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons (n = 36 cells from 8 mice). * two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,64)} = 4.79$, * $P = 0.032$; interaction, $F_{(25,1600)} = 5.80$, $P < 0.0001$; # $P < 0.05$, Sidak's post-hoc test. **C-E**, Action potential (AP) parameters in WT and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons. **F-H**, Resting membrane voltage (V_{rest}), Cell capacitance (C_m) and input resistance (R_{input}) in control and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons. Bars represent the mean \pm SEM; full circles show individual recordings. n.s., not significant.

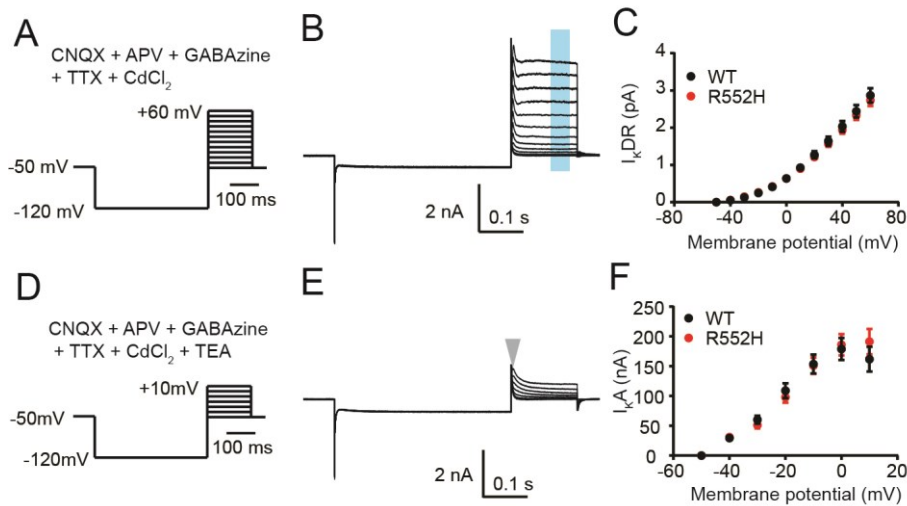


Figure 5. Unchanged delayed-rectifier and A-type potassium currents, two putative transcriptional targets of *Foxp2*, in *Foxp2*^{+/^{R552H} cortical neurons}

A, activation protocol for delayed-rectifier (DR) potassium channels. Following a 400 ms prepulse to -120 mV, the membrane potential was stepped to a test potential ranging from -50 to +60 mV in 10 mV increments, in the presence of synaptic blockers (APV, CNQX, Gabazine), and Na⁺ and Ca²⁺ channel blockers (TTX and CdCl₂). **B**, Representative current responses to the protocol illustrated in **A**. I_{DR} was measured as the average current over the duration indicated by the blue area, after leak current subtraction. **C**, I_{DR} after leak current subtraction in control ($n = 24$ cells from 4 mice) and *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons ($n = 23$ cells from 4 mice); two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,45)} = 0.16$, $P = 0.67$. **D**, activation protocol for A-type potassium channels. The membrane potential was stepped to a test potential ranging from -50 to +10 mV in 10 mV increments from an initial prepulse value of -120 mV in the presence of TEA 5 mM to block DR currents. **E**, Representative current responses to the protocol illustrated in **D**. I_A was measured for each voltage step as the peak current (arrowhead) minus the residual DR current, after leak current subtraction. **F**, I_A after leak current subtraction in WT ($n = 21$ cells from 3 mice) and *Foxp2*^{+/^{R552H} neurons ($n = 20$ cells from 3 mice); two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,39)} = 0.028$, $P = 0.87$.}}

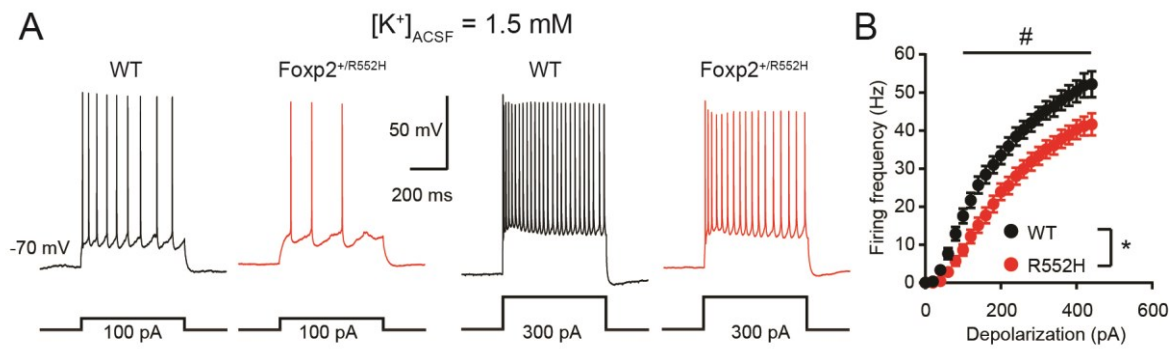


Figure 6. Enhanced effect of the R552H mutation on the firing response to small depolarizing currents by decreasing extracellular potassium concentration

A, Example spike trains evoked by somatic current injections in a WT (black traces) and a Foxp2^{+/R552H} neuron (red traces) for [K⁺]_{ACSF} = 1.5 mM instead of [K⁺]_{ACSF} = 3.5 mM which shifts the equilibrium potential for potassium from -95.7 mV to -117.9 mV. Note that in this condition Foxp2^{+/R552H} neurons already fire fewer action potentials than control WT neurons in response to small (100 pA) depolarizations. **B**, f-i curve (mean ± SEM) for control (n = 18 cells from 3 mice) and Foxp2^{+/R552H} neurons (n = 22 cells from 3 mice) in 1.5 mM potassium conditions; ** two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,38)} = 10.50$, $P = 0.0025$; # $P < 0.05$, Sidak's post-hoc test. The firing frequency of control and Foxp2^{+/R552H} neurons differed in response to lower depolarizing current injections than in the [K⁺]_{ACSF} = 3.5 mM condition (Figure 4B), consistent with the implication of voltage-independent potassium channels.

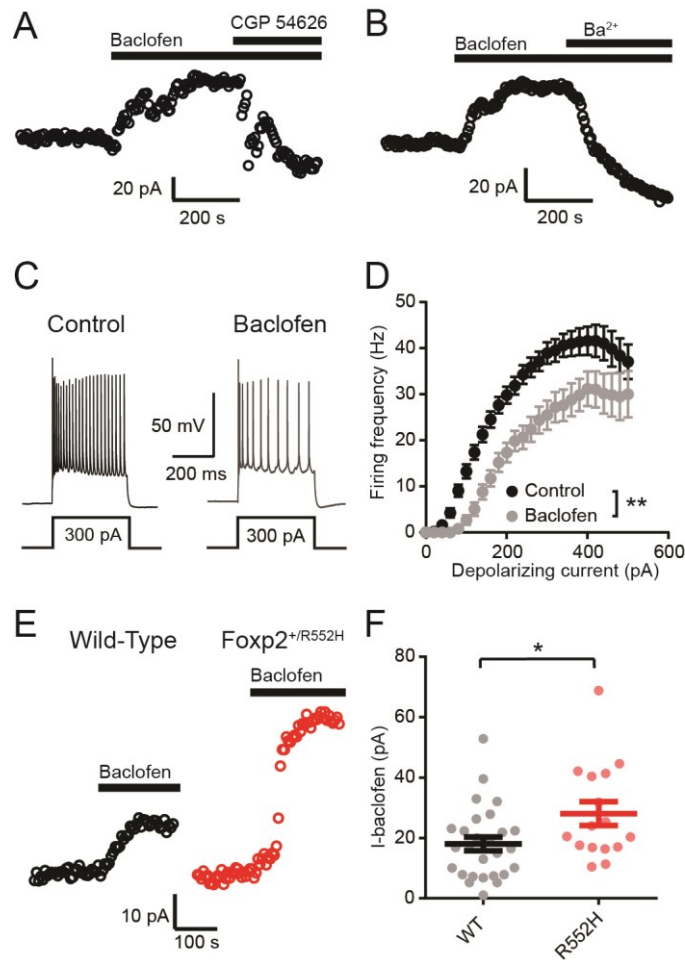


Figure 7. Increased GABA_B-mediated currents in Foxp2^{+/R552H} cortical neurons

A, Representative current activated by 30 μ M baclofen (I_{Baclofen}) and blocked by CGP54626 (10 μ M), an antagonist of GABA_B receptors, in a Foxp2⁺ layer VI neuron. **B**, Example trace showing that I_{Baclofen} is inhibited by barium (100 μ M), a blocker of GIRK channels, in a Foxp2⁺ layer VI neuron. **C**, Sample spike trains evoked by a 300 pA somatic current injection in the absence (left) or presence of baclofen (right). **D**, f-i curve (mean \pm SEM) for Foxp2⁺ neurons in the absence (n = 30 cells from 8 mice, same recordings as WT in Fig.4B) or presence of baclofen (n = 15 cells from 3 mice), showing that baclofen recapitulates the effect of the R552H mutation on intrinsic excitability; **two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,43)} = 10$, $P = 0.0029$. **E**, Representative recordings of I_{Baclofen} in a WT control and in a Foxp2^{+/R552H} neuron. **F**, I_{Baclofen} in WT (n = 27 cells from 12 mice) and Foxp2^{+/R552H} neurons (n = 16 cells from 7 mice); * Mann-Whitney test, $P = 0.020$; bars represent the mean \pm SEM; full circles show individual recordings.

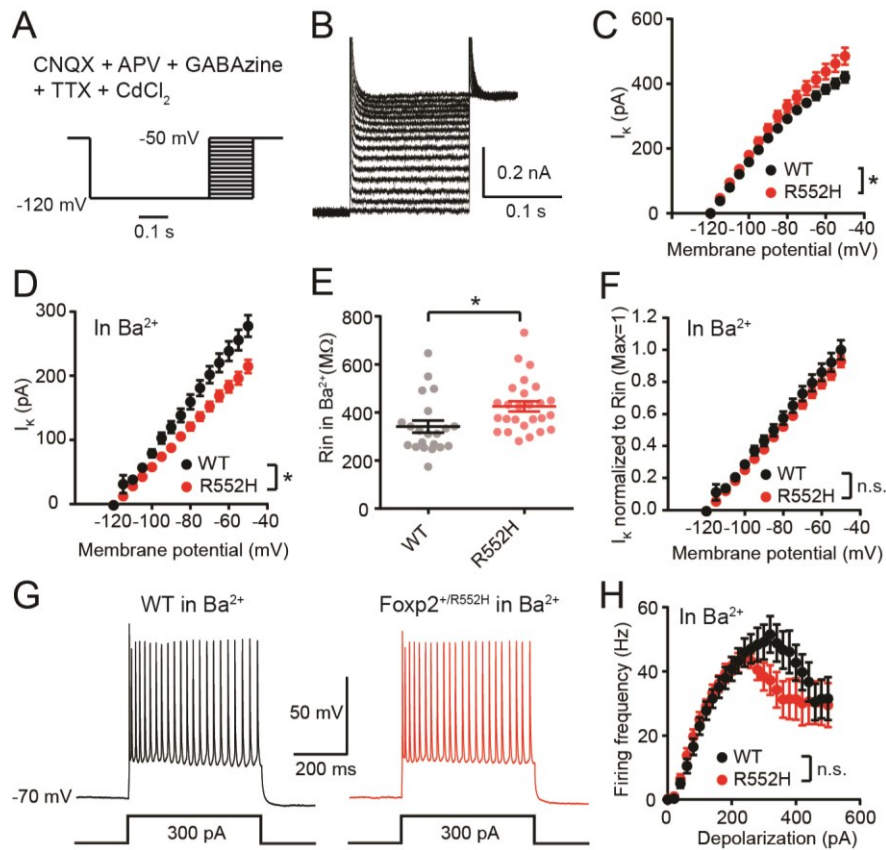


Figure 8. GIRK channel-dependent effect of the R552H mutation on intrinsic neuronal excitability

A, Activation protocol for voltage-independent potassium channels. Following a prepulse to -120 mV, the membrane potential was stepped to a test potential ranging from -120 to -50mV in 10 mV increments. **B**, Representative current responses to the protocol illustrated in A. **C**, mean i-v curves (\pm SEM) for WT ($n = 25$ cells from 4 mice) and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons ($n = 20$ cells from 4 mice); * two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,43)} = 4.27$, $P = 0.045$. **D**, mean i-v curves (\pm SEM) for WT ($n = 20$ cells from 4 mice) and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons ($n = 25$ cells from 3 mice) in the presence of barium (100 μ M); two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,43)}=11.3$, $P = 0.0016$. Note that in the presence of barium, potassium currents are weaker in $Foxp2^{+/R552H}$ neurons than in control WT neurons, in contrast to currents shown in C. **E**, Input resistance in WT and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons (same recordings as in D) in the presence of barium (100 μ M); bars represent the mean \pm SEM; full circles show individual recordings; ** Mann-Whitney test, $P = 0.0037$. **F**, mean i-v curves (\pm SEM) for WT and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons (same recordings as in D and E) in the presence of barium (100 μ M), normalized for the mean input resistance in each condition; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,43)} = 1.84$, $P = 0.18$. **G**, Sample spike trains evoked by a 300 pA somatic current injection in a WT (left) and a $Foxp2^{+/R552H}$ neuron (right) in the presence of barium (100 μ M). **H**, mean f-i curve (\pm SEM) for WT ($n = 17$ cells from 3 mice) and $Foxp2^{+/R552H}$ neurons ($n = 16$ cells from 3 mice) in the presence of barium; two-way repeated measures ANOVA, main effect, $F_{(1,31)} = 0.81$, $P = 0.37$.

References

- Bekkers JM (2000) Properties of voltage-gated potassium currents in nucleated patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol* 525 Pt 3:593-609.
- Bolz J, Gilbert CD (1986) Generation of end-inhibition in the visual cortex via interlaminar connections. *Nature* 320:362-365.
- Bortone DS, Olsen SR, Scanziani M (2014) Translaminar inhibitory cells recruited by layer 6 corticothalamic neurons suppress visual cortex. *Neuron* 82:474-485.
- Chen YC, Kuo HY, Bornschein U, Takahashi H, Chen SY, Lu KM, Yang HY, Chen GM, Lin JR, Lee YH, Chou YC, Cheng SJ, Chien CT, Enard W, Hevers W, Paabo S, Graybiel AM, Liu FC (2016) Foxp2 controls synaptic wiring of corticostriatal circuits and vocal communication by opposing Mef2c. *Nat Neurosci* 19:1513-1522.
- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG (1999) Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2:515-520.
- Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, Schmidt EF, Stevens TR, Ma G, Bupp S, Shrestha P, Shah RD, Doughty ML, Gong S, Greengard P, Heintz N (2008) Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135:749-762.
- Ehret G (1997) The auditory cortex. *J Comp Physiol A* 181:547-557.
- Enard W, Przeworski M, Fisher SE, Lai CS, Wiebe V, Kitano T, Monaco AP, Paabo S (2002) Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature* 418:869-872.
- Enard W et al. (2009) A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell* 137:961-971.
- Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrissey EE, Walsh CA (2003) Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol* 460:266-279.
- French CA, Fisher SE (2014) What can mice tell us about Foxp2 function? *Curr Opin Neurobiol* 28:72-79.
- French CA, Vinuesa Veloz MF, Zhou K, Peter S, Fisher SE, Costa RM, De Zeeuw CI (2019) Differential effects of Foxp2 disruption in distinct motor circuits. *Mol Psychiatry* 24:447-462.
- Gong S, Doughty M, Harbaugh CR, Cummins A, Hatten ME, Heintz N, Gerfen CR (2007) Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J Neurosci* 27:9817-9823.
- Groszer M et al. (2008) Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. *Curr Biol* 18:354-362.

Haesler S, Wada K, Nshdejan A, Morrisey EE, Lints T, Jarvis ED, Scharff C (2004) FoxP2 expression in avian vocal learners and non-learners. *J Neurosci* 24:3164-3175.

Hearing M, Kotecki L, Marron Fernandez de Velasco E, Fajardo-Serrano A, Chung HJ, Lujan R, Wickman K (2013) Repeated cocaine weakens GABA(B)-Girk signaling in layer 5/6 pyramidal neurons in the prelimbic cortex. *Neuron* 80:159-170.

Huang W, Zhou Z, Asrar S, Henkelman M, Xie W, Jia Z (2011) p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties. *Molecular and cellular biology* 31:388-403.

Kaas JH (2005) From mice to men: the evolution of the large, complex human brain. *J Biosci* 30:155-165.

Kast RJ, Lanjewar AL, Smith CD, Levitt P (2019) FOXP2 exhibits projection neuron class specific expression, but is not required for multiple aspects of cortical histogenesis. *eLife* 8.

Kuhl PK (2010) Brain mechanisms in early language acquisition. *Neuron* 67:713-727.

Kurt S, Groszer M, Fisher SE, Ehret G (2009) Modified sound-evoked brainstem potentials in Foxp2 mutant mice. *Brain Res* 1289:30-36.

Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP (2001) A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413:519-523.

Le Meur N, Holder-Espinasse M, Jaillard S, Goldenberg A, Joriot S, Amati-Bonneau P, Guichet A, Barth M, Charollais A, Journel H, Auvin S, Boucher C, Kerckaert JP, David V, Manouvrier-Hanu S, Saugier-Veber P, Frebourg T, Dubourg C, Andrieux J, Bonneau D (2010) MEF2C haploinsufficiency caused by either microdeletion of the 5q14.3 region or mutation is responsible for severe mental retardation with stereotypic movements, epilepsy and/or cerebral malformations. *J Med Genet* 47:22-29.

Liegeois F, Baldeweg T, Connelly A, Gadian DG, Mishkin M, Vargha-Khadem F (2003) Language fMRI abnormalities associated with FOXP2 gene mutation. *Nat Neurosci* 6:1230-1237.

Liu G (2004) Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat Neurosci* 7:373-379.

Lujan R, Maylie J, Adelman JP (2009) New sites of action for GIRK and SK channels. *Nat Rev Neurosci* 10:475-480.

Luscher C, Slesinger PA (2010) Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11:301-315.

Medvedeva VP, Rieger MA, Vieth B, Mombereau C, Ziegenhain C, Ghosh T, Cressant A, Enard W, Granon S, Dougherty JD, Groszer M (2018) Altered social behavior in mice carrying a cortical Foxp2 deletion. *Hum Mol Genet*.

Naeve GS, Ramakrishnan M, Kramer R, Hevroni D, Citri Y, Theill LE (1997) Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2648-2653.

Olsen SR, Bortone DS, Adesnik H, Scanziani M (2012) Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature* 483:47-52.

Padgett CL, Lalive AL, Tan KR, Terunuma M, Munoz MB, Pangalos MN, Martinez-Hernandez J, Watanabe M, Moss SJ, Lujan R, Luscher C, Slesinger PA (2012) Methamphetamine-evoked depression of GABA(B) receptor signaling in GABA neurons of the VTA. *Neuron* 73:978-989.

Peleg S, Varon D, Ivanina T, Dessauer CW, Dascal N (2002) G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron* 33:87-99.

Ramocki MB, Zoghbi HY (2008) Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature* 455:912-918.

Reimers-Kipping S, Hevers W, Paabo S, Enard W (2011) Humanized Foxp2 specifically affects cortico-basal ganglia circuits. *Neuroscience* 175:75-84.

Scanziani M (2000) GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron* 25:673-681.

Scharff C, Petri J (2011) Evo-devo, deep homology and FoxP2: implications for the evolution of speech and language. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:2124-2140.

Sia GM, Clem RL, Hujanir RL (2013) The human language-associated gene SRPX2 regulates synapse formation and vocalization in mice. *Science* 342:987-991.

Spiteri E, Konopka G, Coppola G, Bomar J, Oldham M, Ou J, Vernes SC, Fisher SE, Ren B, Geschwind DH (2007) Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *Am J Hum Genet* 81:1144-1157.

Sundberg SC, Lindstrom SH, Sanchez GM, Granseth B (2018) Cre-expressing neurons in visual cortex of Ntsr1-Cre GN220 mice are corticothalamic and are depolarized by acetylcholine. *J Comp Neurol* 526:120-132.

Tallal P, Miller SL, Bedi G, Byrna G, Wang X, Nagarajan SS, Schreiner C, Jenkins WM, Merzenich MM (1996) Language comprehension in language-learning impaired children improved with acoustically modified speech. *Science* 271:81-84.

Tasic B et al. (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci* 19:335-346.

Teramitsu I, Kudo LC, London SE, Geschwind DH, White SA (2004) Parallel FoxP1 and FoxP2 expression in songbird and human brain predicts functional interaction. *J Neurosci* 24:3152-3163.

- Thomson AM (2010) Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat* 4:13.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896.
- van Rhijn JR, Fisher SE, Vernes SC, Nadif Kasri N (2018) Foxp2 loss of function increases striatal direct pathway inhibition via increased GABA release. *Brain structure & function* 223:4211-4226.
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Copp A, Mishkin M (2005) FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat Rev Neurosci* 6:131-138.
- Velez-Fort M, Rousseau CV, Niedworok CJ, Wickersham IR, Rancz EA, Brown APY, Strom M, Margrie TW (2014) The Stimulus Selectivity and Connectivity of Layer Six Principal Cells Reveals Cortical Microcircuits Underlying Visual Processing. *Neuron* 84:238.
- Vernes SC, Spiteri E, Nicod J, Groszer M, Taylor JM, Davies KE, Geschwind DH, Fisher SE (2007) High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. *Am J Hum Genet* 81:1232-1250.
- Vernes SC, Nicod J, Elahi FM, Coventry JA, Kenny N, Coupe AM, Bird LE, Davies KE, Fisher SE (2006) Functional genetic analysis of mutations implicated in a human speech and language disorder. *Hum Mol Genet* 15:3154-3167.
- Vernes SC, Oliver PL, Spiteri E, Lockstone HE, Puliyadi R, Taylor JM, Ho J, Mombereau C, Brewer A, Lowy E, Nicod J, Groszer M, Baban D, Sahgal N, Cazier JB, Ragoussis J, Davies KE, Geschwind DH, Fisher SE (2011) Foxp2 regulates gene networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. *PLoS genetics* 7:e1002145.
- Watkins KE, Dronkers NF, Vargha-Khadem F (2002) Behavioural analysis of an inherited speech and language disorder: comparison with acquired aphasia. *Brain* 125:452-464.
- Yue Y, Widmer DA, Halladay AK, Cerretti DP, Wagner GC, Dreyer JL, Zhou R (1999) Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J Neurosci* 19:2090-2101.
- Zhang Z, Jiao YY, Sun QQ (2011) Developmental maturation of excitation and inhibition balance in principal neurons across four layers of somatosensory cortex. *Neuroscience* 174:10-25.

ANNEXE 2 : « ROLES EMERGENTS DU SYSTEME DU
COMPLEMENT DANS LES MALADIES PSYCHIATRIQUES »



Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders

Mélanie Druart^{1,2,3} and Corentin Le Magueresse^{1,2,3*}

¹INSERM UMR-S 1270, Paris, France, ²Science and Engineering Faculty, Sorbonne Université, Paris, France, ³Institut du Fer à Moulin, Paris, France

The complement system consists of more than 30 proteins that have long been known to participate to the immune defence against pathogens and to the removal of damaged cells. Their role, however, extends beyond immunity and clearance of altered “self” components in the periphery. In particular, complement proteins can be induced by all cell types in the brain. Recent discoveries highlight the role of complement in normal and pathological brain development. Specifically, the complement system mediates synaptic pruning, a developmental process whereby supernumerary synapses are eliminated in the immature brain. The complement system has been implicated in pathological synapse elimination in schizophrenia, West Nile virus infection, and lupus, all of which are associated with psychiatric manifestations. Complement also contributes to synapse loss in neurodegenerative conditions. This review provides a brief overview of the well-studied role of complement molecules in immunity. The contribution of complement to embryonic and adult neurogenesis, neuronal migration, and developmental synaptic elimination in the normal brain is reviewed. We discuss the role of complement in synapse loss in psychiatric and neurological diseases and evaluate the therapeutic potential of complement-targeting drugs for brain disorders.

Keywords: brain development, schizophrenia, synapse elimination, synaptic pruning, microglia

OPEN ACCESS

Edited by:

Iris E. Sommer,
University Medical Center Groningen,
Netherlands

Reviewed by:

Ju Wang,
Tianjin Medical University, China
Stefania Schiavone,
University of Foggia, Italy

*Correspondence:

Corentin Le Magueresse
corentin.le-magueresse@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Psychiatry,
a section of the journal
Frontiers in Psychiatry

Received: 04 December 2018

Accepted: 22 July 2019

Published: 21 August 2019

Citation:

Druart M and Le Magueresse C
(2019) Emerging Roles of
Complement in Psychiatric Disorders.
Front. Psychiatry 10:573.
doi: 10.3389/fpsy.2019.00573

INTRODUCTION

The link between immunogenetics, inflammation, and several major psychiatric disorders such as Schizophrenia (SZ), Bipolar Disorder (BD), and Autism Spectrum Disorder (ASD) is now well substantiated (1–5). The molecular and cellular mechanisms that mediate immunity-related neurodevelopmental alterations in psychiatric diseases are gradually coming to light, and the complement system appears to be a key player in these complex processes. The complement system is an ensemble of proteins that collectively participate to host defense against infections by opsonizing antigens, promoting inflammation, and lysing pathogens, and has been well characterized in the periphery. Unexpectedly, complement was shown to control synaptic pruning, a development process whereby supernumerary synapses are eliminated during the course of normal brain maturation (6). Recently, the complement system has received much attention in the field of psychiatry after Sekar et al. demonstrated that distinct genetic variants of C4, a gene encoding a protein of the classical complement pathway, predispose to SZ (7). This landmark study provided a solid basis for establishing a causal relationship between complement-mediated synaptic pruning and cortical thinning frequently associated with SZ. Furthermore, complement-mediated synapse loss was also implicated in Lupus and West Nile virus infection, two immune disorders that can induce psychosis and cognitive impairment, respectively. In this review, we briefly summarize the

known functions of the complement system in the periphery and highlight its newly discovered roles in brain maturation and in psychiatric disorders.

The Three Complement Cascades in Innate and Acquired Immunity

The complement system consists of more than 30 proteins present in the blood plasma or on the cell surface. These proteins are mainly produced by the liver, although multiple cell types in different organs, including the brain, express and secrete complement molecules (8). The complement system has been extensively studied, and numerous reviews cover complement pathways in depth (9–12). Complement molecules have three major functions in the immune system: i) opsonization of “foreign” molecules, bacteria, or damaged cells, i.e., promotion of their phagocytosis by neutrophils or monocytes, ii) increase of the inflammatory response via short peptides called anaphylatoxins (C3a, C4a, and C5a) resulting from enzymatic cleavage of complement proteins, and iii) lysis of pathogenic micro-organisms via the formation of a pore in the lipid membrane.

Complement proteins are soluble and circulate in the blood in an inactive form. In response to an activating mechanism, some complement proteins are transformed into proteases and cleave other specific complement members, initiating amplification cascades (**Figure 1**). Complement activation results from the activation of one or several of three distinct pathways: the classical pathway, the lectin pathway, and the alternative pathway. The three pathways converge to cause cleavage of C3, which is the most abundant complement protein, resulting in the formation of the anaphylatoxin C3a and the C3b fragment. Factor I, in the presence of its co-factor and C3b receptor CR1, cleaves C3b into iC3b and a small peptide of 17 amino-acids (C3f). The resulting conformational rearrangement of iC3b generates binding surfaces for the interaction with complement receptors CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) located on leukocytes, which down-regulates inflammation and increases B cell sensitivity, thus forming a link between the innate and adaptive immune systems (13, 14). The C3b fragment can also directly label antigens for opsonization or bind to other complement peptides to form the C5 convertase. The resulting cleavage of C5 is the beginning of the terminal pathway of the complement: C5 is cleaved into C5a, the most potent anaphylatoxin, and C5b. The latter forms a complex with C6 and C7, which then binds with C8. The resulting change in C8 conformation allows the insertion of an alpha chain and anchoring in the target membrane. The combination of the C5b678 complex with one to 18 C9 molecules, termed membrane attack complex, forms a pore that lyses the target pathogen.

The Classical Pathway

The classical pathway is activated by the C1 complex, composed of the C1q protein recognizing antibodies bound to their antigen, associated with the C1r and C1s proenzymes. Through C1q, the complex can also recognize non-immunoglobulin activators, particularly surface proteins of bacteria and viruses. The binding of C1q to its target results in a conformational change of C1q which activates C1r, which in turn cleaves and activates the

two C1s molecules of the C1 complex to form the activated C1s serine protease. Activated C1s cleaves C4 and C2, whose cleavage products combine to form the C3 convertase C4b2b which activates C3.

The Lectin Pathway

The lectin pathway is activated by the binding of pattern recognition receptors such as mannose-binding lectins, ficolins, or collectin 11 to specifically arranged carbohydrates present on damaged cell surfaces or on invading pathogens. This results in the activation of associated serine proteinases (MASP1/2) and cleavage of C4 and C2. The formation of the C3 convertase C4b2b then cleaves C3 as in the classical pathway.

The Alternative Pathway

Unlike the other two pathways, the alternative pathway is not initiated by binding of complement molecules to antigens or antibodies. Spontaneous hydrolysis of C3 results in the cleavage of an intramolecular thioester bond and leads to the formation of reactive molecules C3(H₂O) and C3b. When C3(H₂O) or C3b binds to positively charged surfaces present in microorganisms, it reacts with Factor B in the presence of Factor D to form a C3 convertase (C3(H₂O)Bb or C3bBb) that is strongly stabilized by properdin (Factor P). The convertase then generates additional C3b molecules, initiating a positive feedback loop amplification.

Complement Proteins in Normal Brain Development

Expression of Complement Components in the Brain
Studies conducted since the 1990s have shown extrahepatic production of complement proteins by several organs and cell types (8) and, in particular, by neurons and glial cells (15). This local production in the CNS is all the more important as the brain-blood barrier prevents circulating macromolecules, including complements proteins, to penetrate into the brain tissue (16).

In the past two decades, expression of complement components has been documented in primary cultures of astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and neurons (17–20). More recent studies have shown that neural cells express complement molecules throughout embryonic and postnatal development in rodent and human brain tissue (**Table 1**) (25, 33–35). Importantly, complement components are released into the extracellular space, suggesting that a given brain cell type can participate to complement activation without expressing the full range of complement molecules (7).

Complement expression by neural cells was first demonstrated using immunoprecipitation in cultured astrocytes (17). This observation was compatible with the macrophagic function of astrocytes and their role in the brain's immune system (36). Astrocytes express components of the classical pathway (C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4), the alternative pathway (factors B, D, I, H, P), and the terminal pathway (C5–C9) (19, 21, 26, 28). They also express complement receptors CR1, CR2, C3aR, and C5aR (29, 30). These initial studies relied on cultured cell lines. In the mouse brain, astrocytes are the main source of C3 (37). Like astrocytes, microglia are considered part of the immune system of the brain

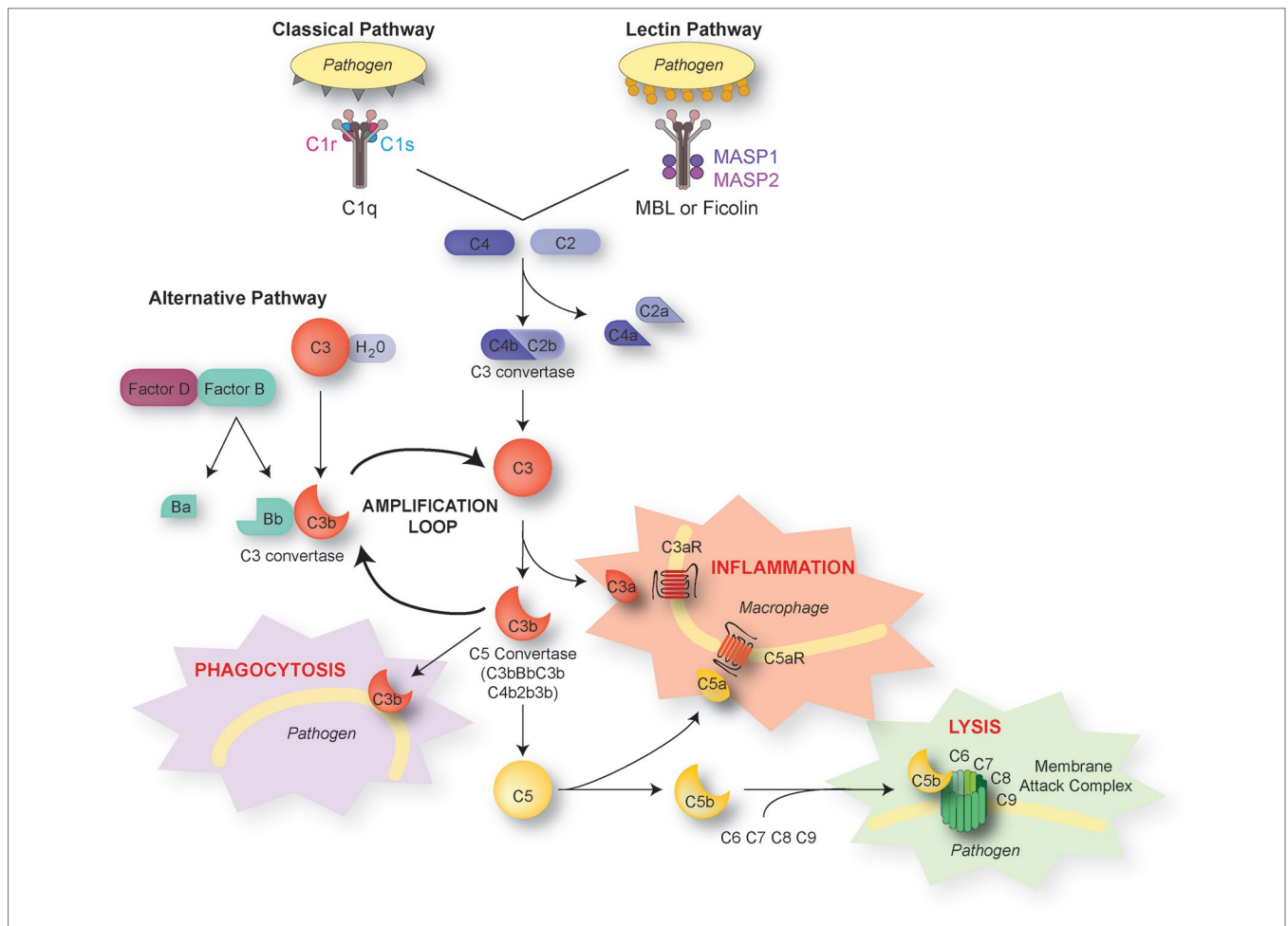


FIGURE 1 | The complement pathways. There are three distinct activation pathways in the complement system: the classical and lectin pathway that are activated by pathogens or damaged cells, and the alternative pathway that is activated by the spontaneous hydrolysis of C3. All lead to the sequential recruitment of complement components to form a C3 convertase (C4bC2b or C3bBb). The C3 convertase cleaves C3 into C3a and C3b. The C3b fragment binds to the surface of antigens, targeting them for opsonization (phagocytosis). C3b also induces a positive-feedback loop (“amplification loop”) leading to the generation of additional C3 convertase. C3b can also be recruited to become part of the C5 convertase, which cleaves C5 into C5a and C5b. The short C3a and C5a fragments, also known as anaphylatoxins, foster immune responses and inflammation. C5b initiates the assembly of C6, 7, 8, and 9 into the membrane attack complex, which forms a membrane pore resulting in the lysis of the pathogen.

because of their ability to secrete pro-inflammatory factors such as chemokines and cytokines and for their macrophagic function (38, 39). Microglial cells express classical pathway components (C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4) and complement receptors C1qR, CR2, C3aR, and C5aR (19, 22, 40–43). Microglial cells have been shown to be the dominant source of C1q in the mouse brain (44). Oligodendrocytes also express members of the classical pathway (C1q, C2, C3, C4), factor H, as well components of the terminal pathway (C5–C9) (23, 24).

Finally, neurons also express complement molecules. In culture, they can produce a complete complement system (20). mRNA coding for C1q, C2, C3, C4, and terminal complement components (C5–C9) was also detected in human neurons using *in situ* hybridization in *post mortem* brain tissue (25). Immunohistochemical experiments using human cortical neurons in culture showed the presence of the C4 protein in neurons and in the extracellular medium, confirming that neurons express and release C4 (7). Altogether, these results

suggest that both neurons and glial cells express complement components and their receptors. Given the pro-inflammatory role of anaphylatoxins C3a and C5a, the expression of their receptors by glial cells was not surprising. In contrast, expression of these receptors in neurons was more unexpected. Yet, neuronal expression of C3aR and C5aR at a low level has been shown in the cortex, cerebellum, and hippocampus in the adult mouse brain (31, 32, 45).

Complement expression varies according to the brain’s inflammatory status. In response to infection or inflammation such as in bacterial meningitis, elevated levels of complement proteins are detected in the cerebro-spinal fluid (46). Regulation of complement receptor expression was shown in an ischemic brain model where C3aR and C5aR are more expressed in both neurons and glial cells following blood vessel occlusion (47). Interestingly, a cell type-specific upregulation of complement expression has been observed in a model of transient ischemia where C1q expression increases specifically in microglia but not

TABLE 1 | Complement molecules expressed by brain cells.

	Astrocytes	References	Microglia	References	Oligodendrocytes	References	Neurons	References
Classical pathway	C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4	Barnum et al. (21) Veerhuis et al. (19)	C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4	Walker et al. (18) Haga et al. (22) Veerhuis et al. (19)	C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4	Hosokawa et al. (23) Gasque and Morgan (24)	C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4	Shen et al. (25) Thomas et al. (20)
Alternative pathway	C3, Factors B, D, I, H	Barnum et al. (21) Gordon et al. (26)	C3	Veerhuis et al. (19)	C3, Factor H	Hosokawa et al. (23) Gasque and Morgan (24)	C3, Factors B and D	Thomas et al. (20)
Lectin pathway							(embryonic neurons) MASP1, MASP2	Gorelik et al. (27)
Terminal pathway	C5, C6, C7, C8, C9	Gasque et al. (28)			C5, C6, C7, C8, C9	Hosokawa et al. (23) Gasque and Morgan (24)	C5, C6, C7, C9	Shen et al. (25) Thomas et al. (20)
Receptors	CR1, CR2, C3aR, C5aR	Gasque and Morgan (24) Gasque et al. (29) Gasque et al. (30)	CR2, C3aR, C5aR	Gasque et al. (30) Davoust et al. (31)			C3aR, C5aR	Davoust et al. (31) Stahel et al. (32) Benard et al. (33)

in neurons (48). Expression of complement components and receptors also varies during the course of brain development (33). For example in the mouse hippocampus, C3 expression is much lower at postnatal day 30 (P30) than at P2 (35). In the rat cerebellum, C3aR and C5aR expression in granule cells peaks around postnatal day 12 (33). This fine developmental regulation of complement expression has led to the study of its role in brain maturation.

Embryogenesis and Neuronal Proliferation

A study conducted in *Xenopus laevis* highlighted the expression of complement components already during gastrula/early neurula stage. In particular, properdin, C1qA, C3, and C9 are expressed in the neural plate and in neural precursors, while C1qR and C6 are expressed at the periphery of the neural plate, in the presumptive neural crest (49). Based on the observation that there is a chronological and tissue specification of complement expression, the hypothesis of the complement's involvement in developmental processes independently of inflammation has been put forward. In mammals, C5 and C5aR are also expressed early in development. C5 and C5aR are located in neuroepithelium in mice in the early stages of neurulation and also in human neuroepithelium. C5aR-deficient mice do not display overt congenital anomalies but have more neural tube malformations than wild-type controls after maternal folate deficiency (50). These observations suggest a degree of functional redundancy of developmentally expressed complement proteins, with the role of C5aR in neurulation only becoming apparent under conditions of environmental stress.

The C5a-C5aR axis is involved in neurogenesis, but only at embryonic stages of development. A recent study showed that C5aR activation increases neural precursor cell (NPC) proliferation *in vivo* in the embryonic ventricular zone through PKC ζ /ERK signaling and that conversely,

pharmacological blockade of C5aR decreases proliferation (51). In contrast, mice lacking C5aR do not show altered adult neurogenesis (52). Similarly, C5aR antagonists do not alter neural NPC proliferation within the external granular layer of the early postnatal rat cerebellum. However, C5aR agonists promote the proliferation of NPCs in the granular layer at the same developmental stage, suggesting that C5aR is expressed but not activated (53). The effect of C5aR activation at embryonic, but not postnatal stages, can be explained by the developmental time course of C5a expression. Indeed, the concentration of C5a is higher in embryonic than in adult cerebro-spinal fluid, suggesting that neuroepithelium secretes high quantities of C5a to promote NPC proliferation (51). The transient disruption of C5a-C5aR signaling during embryonic development alters adult cerebral organization and causes behavioral deficits (51), highlighting the crucial role of this pathway for the establishment of functional neuronal circuits. Interestingly, *Serp1*, a gene encoding a C1 inhibitor known to block the initiation of the classical and lectin pathways, negatively regulates neural proliferation in the embryonic ventricular zone by decreasing C5aR activation (54). Thus, C5aR activation must be precisely balanced for adequate NPC proliferation in the embryonic ventricular zone.

Complement molecules other than C5a are also involved in the control of adult neurogenesis. Thus, complement receptor CR2 is expressed by neural progenitors in the adult dentate gyrus (DG) and its activation by C3d or interferon-alpha reduces NPC proliferation and decreases the formation of new neurons in the adult hippocampus. Conversely, *Cr2*^{-/-} mice exhibit increased neurogenesis in the adult DG (55). C3a is also implicated in normal and ischemia-induced adult neurogenesis. C3aR is expressed by neural progenitor cells (NPC) in adult mice. Basal adult neurogenesis is decreased both in C3-deficient mice and

in mice lacking C3aR. Furthermore, C3-deficient mice have impaired ischemia-induced neurogenesis in the subventricular zone, the main source of neural progenitor cells in the adult mouse brain (56).

Neuronal Migration

The complement system also plays a role in neuronal migration. During brain development, cells can migrate in a coordinated way in the same direction, a process termed collective migration that requires chemoattraction between cells. In neural ridge cells from *Xenopus laevis* and zebrafish, collective migration is dependent on the C3a fragment and its receptor C3aR. Disruption of the interaction between the ligand and its receptor prevents proper cellular migration and causes neuronal dispersion (57). A possibly related mechanism has been reported in adult brain-derived NPCs in which C3a and SDF-1 induce ERK phosphorylation, which in turn causes differentiation and neuronal migration *in vitro* (58).

Furthermore, knockdown of C1q inhibitor-encoding *Serp1* impairs radial migration. Interestingly, *Serp1* affects both cell autonomous and non-cell autonomous radial migration in mouse embryos, indicating that C1q inhibitor is secreted and influences neighboring neurons. This effect can be rescued C3aR agonists, demonstrating that C3aR signaling is required for the proper migration of cortical plate neurons (54). Further experiments have shown that the lectin pathway controls neuronal migration in the developing neocortex. Indeed, in mouse embryos knocking down C3, but also MASP1 or MASP2, which are critically involved in the lectin pathway, impairs migration of neuroblasts derived from the ventricular zone. This effect can be reversed by co-electroporating molecular mimics of C3 cleavage products, suggesting that the activity of the complement pathway, and not only the presence of the C3 protein, is required for proper migration of neuroblasts in the developing cortex (27).

Synaptic Pruning

In the past decade, a key role of the complement in the postnatal maturation of brain circuits has been uncovered. At birth, the mammalian brain is characterized by an excess of synaptic connections. Over the course of postnatal development, extra synapses are eliminated to establish functional mature neuronal networks (59, 60). This process called synaptic pruning is activity-dependent and has been documented in different regions such as the cortex (61, 62), cerebellum (63), retinogeniculate system (59), and neuromuscular junction (64).

The role of complement in synaptic pruning has been first demonstrated in the retinogeniculate system (Figure 2A, B). Early in development, retinal ganglion cells (RGC) project exuberant axons onto neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) of the thalamus. During postnatal development, retinogeniculate synapses are eliminated to ensure a good segregation between ipsi and contralateral inputs to dLGN neurons. Activity-dependent pruning that occurs in the first postnatal week in mice is necessary to provide a functional binocular vision in adults (65, 66). Using array tomography on thin brain sections, Stevens and colleagues showed that C1q and C3 are abundantly expressed and colocalize with excitatory synapses in the dLGN at P5 but not at P30. Consistent with a role of complement in synaptic pruning, C1q-,

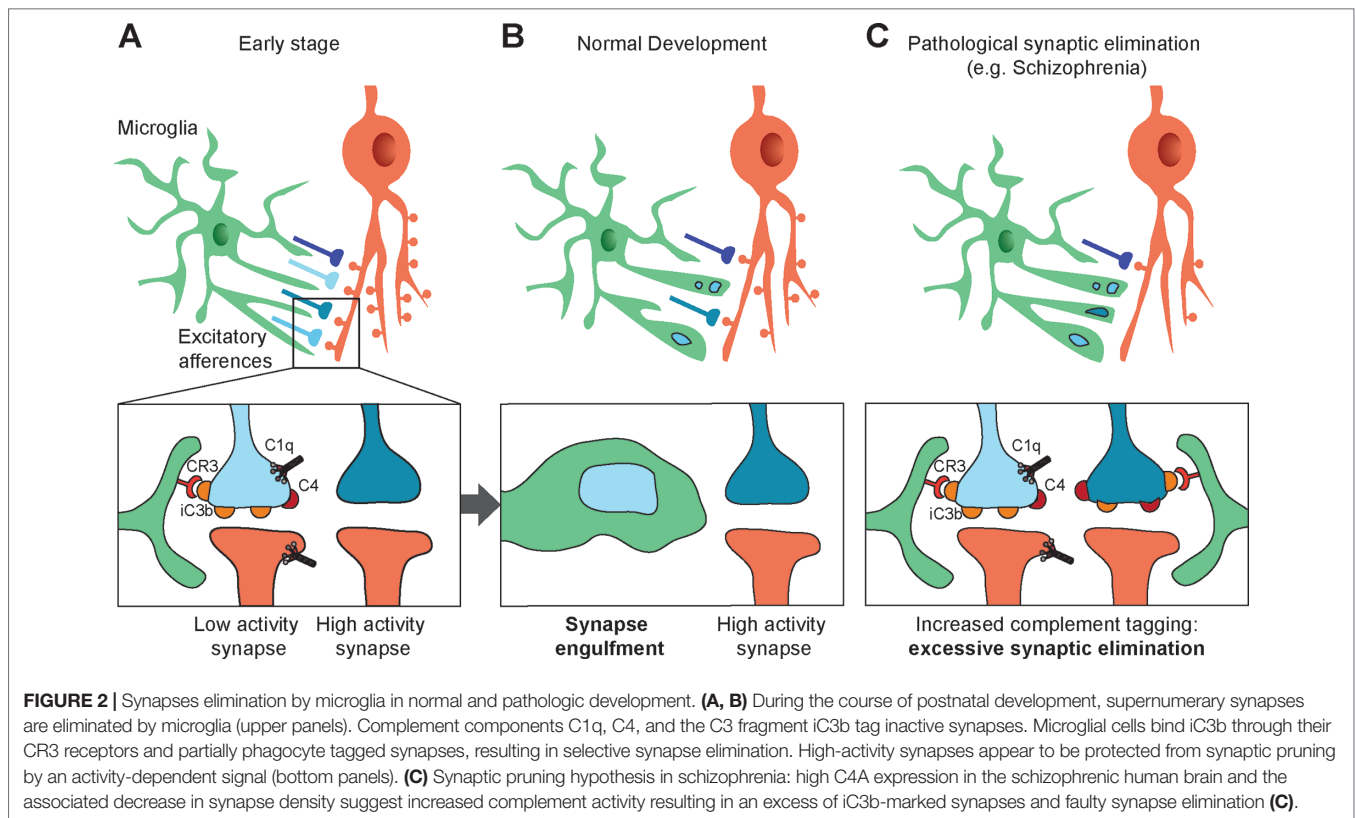
C3-, and C4-deficient mice display higher densities of excitatory synapses in the dLGN and abnormalities in eye-specific segregation (6, 7). The colocalization between C3 and excitatory synapses suggests that C3 or its cleavage products act like tags of synapses to be eliminated by microglia. Indeed, if the interaction between iC3b and its receptor CR3 is blocked, synaptic pruning is impaired (67). CR3 is selectively expressed by microglial cells during postnatal development and anterograde tracer injection in the retina showed that presynaptic elements are engulfed by microglial cells in the developing dLGN, indicating that microglial cells are key players in complement-mediated synaptic pruning (67). C1q and C4 also colocalize at synapses in the developing dLGN (6, 7). However, it is unclear whether they directly participate in microglia-dependent synaptic elimination by tagging synapses, or whether they indirectly promote synapse elimination by allowing the cleavage of C3 and the generation of iC3b.

Consistent with numerous studies highlighting that synaptic pruning is activity-dependent, microglia-mediated engulfment of RGC inputs is regulated by the activity of presynaptic neurons (67). This further suggests that inactive synapses are those that are tagged by complement molecules and targeted for microglia-mediated pruning, although the mechanisms underlying activity-dependent complement binding remain unknown.

The role of complement in synaptic pruning has also been demonstrated in other brain regions. Thus, the complement system contributes to pruning of axonal boutons in layer V pyramidal neurons of the somatosensory cortex (68). A role of microglia in synaptic pruning has also been demonstrated in the hippocampus (69, 70), suggesting that complement-dependent synaptic pruning may be widespread in the developing brain. A recent study shed light on microglia-neuron interactions in the developing hippocampus at the ultrastructural level, showing that presynaptic structures in developing hippocampal neurons are not entirely phagocytosed by microglia but rather “trogocytosed,” a term originally used to describe membrane transfer in immune cells and later extended to refer to partial phagocytosis (71). Of note, microglia-independent processes also participate to synaptic pruning. Thus, astrocytes contribute to synapse elimination in the developing and adult dLGN through the MEGF10 and MERTK phagocytic pathways (72). The contribution of complement to astrocyte-mediated pruning is unclear, but the identification of MEGF10 as an astrocytic receptor for C1q in the developing mouse cerebellum (73) raises the possibility that astrocytes recognize C1q-tagged synapses for elimination.

C1q Family

Interestingly, proteins that have homology with C1q but are not involved in the leptin, classical, or alternative pathways are expressed in the brain and participate in synapse formation, maintenance, and function. These proteins of the C1q family include precerebellin (Cbln1), which is released by cerebellar granule cells. Cbln1 promotes synapse formation between granule cell axons (parallel fibers) and Purkinje cells through binding to glutamate receptor delta 2 (GluRD2) on postsynaptic site and to Neurexin on presynaptic sites. C1q-like (C1ql) proteins, another subtype of C1q family proteins, also regulate synapse formation and function in the cerebellum and in the forebrain. For example, in the cerebellum, C1ql1 controls



the formation and maintenance of synapses between axons of the inferior olivary nucleus (climbing fibers) and Purkinje cells through binding to the postsynaptic receptor Bai3 (74–76). Two other C1q proteins, C1q12 and C1q13, are strongly expressed by dentate granule cells in the hippocampus and recruit postsynaptic kainate receptors at mossy fiber-CA3 synapses (77). However, proteins of the C1q family other than C1q do not participate in the molecular cascades resulting in the cleavage of C3, and hence are not part of the complement system per se.

The Complement System in Psychiatric Diseases

Schizophrenia

Compelling evidence links the complement system and SZ (Figure 2C). Following the demonstration that synaptic density in neocortex peaks in early childhood, then decreases before reaching a plateau in adolescence (61), Feinberg proposed that SZ may result from faulty synapse elimination in the postnatal period based in particular on age at onset (78). Several observations corroborated Feinberg's hypothesis. First, spine density is decreased in upper cortical layers in SZ patients (79, 80). Second, MRI studies revealed that cortical thinning that takes place during normal postnatal development in humans is exacerbated in SZ patients, possibly reflecting an excess of pruning (81, 82). Given the now well-established role of complement in developmental synaptic pruning, it is not surprising, in retrospect, that alterations in complement genetics or complement expression have been associated with SZ. Early studies of the complement system in SZ showed altered expression or activity of complement molecules

in SZ, although the results were inconsistent. In particular, increased hemolytic activity of the complement C1, C2, C4 components in SZ had been reported by several studies (83, 84) [for a thorough review, see (85)]. However, the small scale of these studies prevented firm conclusions. A more robust association between the complement system and SZ has been made possible by large-scale genome-wide association studies of SZ. A significant association was found on chromosome 8 near *CSMD1* (86, 87), which encodes a complement-regulating protein (88). *CSMD1*-deficient mice display behaviors that are reminiscent of SZ-associated blunted emotional responses, anxiety, and depression (89). Furthermore, several GWAS have indicated that the Major Histocompatibility Complex (MHC) genomic region on chromosome 6 is implicated in SZ. Given that the strongest association within the MHC lies near the genomic region encoding complement component 4 (*C4*), Sekar et al. explored in detail the *C4* complement cluster of the MHC in SZ patients and control individuals. They demonstrated a strong relationship between the *C4* region and SZ (7). The tandemly arranged *C4A* and *C4B* genes in the MHC class III region are polymorphic in terms of copy number variation (CNV) and structure. They have over 95% sequence homology but encode functionally distinct proteins with different molecular targets. Further complexity stems from the fact that both *C4A* and *C4B* can be found in either “long” or “short” forms depending on the presence of human endogenous retroviral (HERV) indels (6.5 kb in size) in the intron 9 of the *C4* genes. High copy number and the presence of HERV elements increase the mRNA levels of *C4A* and *C4B*. Importantly, the presence of multiple copies of *C4A* and of long forms of *C4A* was shown to increase the risk for SZ, suggesting that higher *C4A* expression predisposes to SZ.

Indeed, in a separate set of experiments Sekar et al. used postmortem expression analysis to demonstrate that C4A is significantly more expressed in the brain of SZ patients than in the brain of control individuals (7). A subsequent brain imaging study using phosphorus magnetic resonance spectroscopy directly confirmed the association between C4A gene repeats and neuropil contraction in two cohorts of SZ patients. Increased neuropil contraction was observed in the prefrontal and parietal regions among adult-onset schizophrenia patients with high C4A gene copy numbers, whereas adolescent-onset SZ patients showed increased neuropil contraction in the prefrontal cortex and thalamus (90).

Immune Disorders With Psychiatric Manifestations

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a relatively rare chronic autoimmune disease. In most patients with SLE, anti-nuclear autoantibodies cause chronic inflammation which damages tissues, leading to a variety of symptoms. Lupus can affect many organs such as the kidneys, heart, lungs, blood vessels, and brain. Neuropsychiatric manifestations are present in two-thirds of the patients with SLE and include anxiety, depression, and psychosis, the latter being present in about 5% of patients (91). Gray matter atrophy was reported in SLE patients (92), which may be an indicator of synapse loss. In the 564Igi mouse model of SLE, a B-cell-receptor insertion model with known autoantibody specificity, behavioral phenotypes including anxiety, cognitive alterations, and social deficits correlate with synapse loss and the presence of reactive microglia. Treating 564Igi mice with an antibody against type I interferon receptor prevented reactive microglia, synapse loss, and behavioral phenotypes, suggesting that microglia-dependent synaptic elimination is involved in the behavioral alterations in SLE (93). Since the classical complement pathway is involved in microglia-dependent synaptic pruning in the healthy brain, it has been proposed that the complement system may directly or indirectly stimulate the type I interferon pathway to promote synapse engulfment and elimination by microglia in SLE (94).

The complement system has also been implicated in neuroinvasive infection with West Nile Virus. Cognitive decline including memory dysfunction is present in at least 50% of patients that survive following West Nile virus infection (95, 96). Using a mouse model of West Nile virus neuroinvasive infection, Vasek et al. showed that several complement proteins are significantly upregulated in the hippocampus, including C1q, C2, C3, and C4b (97). West Nile virus infection was accompanied by synaptic terminal elimination, which was blocked in C3-deficient mice and C3aR-deficient mice. Surprisingly, virus-induced synaptic elimination was still present in CR3-deficient mice, in which developmental synaptic pruning is strongly decreased (67). These results suggest that several distinct complement-dependent mechanisms may promote pathological pruning.

Neurodegenerative Disorders

While this review's emphasis is on psychiatric disorders, it is noteworthy that the complement has also been implicated in neuron and synapse loss in neurodegenerative disorders. Increased expression of the complement has been noted in the brain following injury and neurodegeneration (98, 99). In Alzheimer's

disease (AD), the accumulation of extracellular Amyloid-beta ($A\beta$) peptides contributes to pathogenesis (100). Aggregated $A\beta$ binds to C1q and C3b/iC3b and activates both the classical and alternative complement pathways in vitro (101, 102). Transcriptome studies showed that complement gene expression is increased in the disease, indicating activation of the complement system (103). Furthermore, several studies have demonstrated that the membrane attack complex colocalizes with amyloid plaques and tangle-bearing neurons, suggesting that complement activation in AD contributes to neurotoxicity (104–107). Indeed, C1q-deficient mouse models of AD display decreased levels of activated glia surrounding amyloid plaques, and slower decline of synaptic markers (108). Aged C3-deficient mice also show reduced age-dependent synapse and neuronal loss in hippocampal CA3, together with enhanced long-term potentiation and cognition (35). A recent study investigated in detail the role of the complement in synapse loss in the familial AD-mutant human amyloid precursor protein transgenic mouse model. In this model, C1q expression increases and C1q localizes to synapses before amyloid plaque deposition. Moreover, C1q-deficient mice are protected from $A\beta$ -dependent synapse loss. These data suggested that the developmental pruning pathway is re-activated at the preplaque in AD, prompting the authors to test whether $A\beta$ -dependent synapse loss is present in mice lacking CR3, a complement receptor only expressed by microglia in the brain. Synapse loss and microglial engulfment are prevented in CR3 KO mice (109). Another study has uncovered the contribution of C3aR, another complement receptor mainly expressed by microglia. Expression of C3 and C3aR is positively correlated with cognitive decline in human AD brains. In the PS19 mouse model, which is used to study neurofibrillary tangles in neurodegenerative tauopathies like AD, a significant increase in C3 and C3aR expression correlates with synapse loss and microglial activation. Crossing PS19 mice with C3aR KO mice attenuates both synaptic impairment and microglial activation (110). Altogether, these results demonstrate the role of microglia and complement axis C3/CR3 and C3/C3aR in pathological synapse elimination. While research on complement activation in the AD brain has focused primarily on the classical complement pathway, it should be noted that mRNA for a critical alternative pathway component, Factor B, is present in the cortex of AD patients and that split products of Factor B, Bb and Ba, are significantly increased, indicating alternative pathway activation (111).

Pathological complement-mediated synapse loss is involved not only in AD but also in other neurodegenerative disorders. In a progranulin-deficient mouse model of frontotemporal dementia, increased complement production and synaptic pruning activity by microglia preferentially eliminate inhibitory synapses in the ventral thalamus, which is prevented in progranulin-deficient C1q KO mice (112). C1q upregulation and C1q-dependent synapse loss were also observed in a mouse model of glaucoma, a neurodegenerative disease characterized by the progressive dysfunction and loss of retinal ganglion cells (113).

Complement molecules also participate indirectly in synapse loss and neurodegeneration in disorders such as Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's, Amyotrophic lateral sclerosis, and Multiple Sclerosis by inducing reactive astrocytes. Upon microglial activation, C1q is released by microglial cells together with Il-1 α and TNF α . The combined action of these three factors is sufficient to convert resting

astrocytes into reactive “A1” astrocytes with impaired ability to promote synapse formation, decreased phagocytic capacity, and neurotoxicity (114).

It is remarkable that complement molecules participate to synapse loss in animal models of several distinct neurodegenerative disorders. While the neurotoxic effect of the complement may be less relevant for psychiatric disorders than for neurodegenerative disorders, similar complement-dependent mechanisms appear to induce synapse loss in both types of diseases (Table 2). Deciphering the underlying mechanisms in animal models of neurological disorders will help understand complement-dependent synaptic alterations in neurodevelopmental psychiatric disorders.

Perspectives

Is the Complement System Involved in Bipolar Disorder and Autism Spectrum Disorder?

Collectively, the studies discussed above have identified the classical complement pathway as a key contributor to pathological synapse elimination in the context of SZ and other disorders with psychosis or cognitive dysfunction. While the main emphasis has been on SZ, other psychiatric disorders such as BD and ASD are also associated with immune activation/inflammation (2–5) and altered synaptic pruning. Increased cortical thinning during adolescence has been observed in BD patients (115) and may reflect excessive synaptic pruning. Conversely, ASD has been associated with decreased synaptic pruning. Thus, in postmortem brain tissue, dendritic spine density was found to be increased in the cortex of ASD patients (116), which appears to result from decreased synaptic pruning as another study confirmed these results and showed that spine density decreased by ~45% in control subjects from childhood through adolescence, but only by ~16% in ASD patients (117).

Given the well-established role of complement molecules in both immune processes and synaptic pruning, these observations raise the question of whether the complement system may be

causally involved in BD or ASD but with a different phenotypic expression than in SZ. The answer to this intriguing question may be multifold. First, clinically distinct psychiatric disorders sometimes display partly overlapping symptoms, which may reflect shared cellular endophenotypes including complement-mediated alterations at the synaptic level. Second, synaptic dysfunctions in SZ, BD, and ASD may rely on distinct mechanisms. The MHC region, which includes the C2, C4, and Factor B complement genes, has been associated with BD in genome-wide association studies (118), although the link between complement expression and BP is not straightforward (119). In contrast, preliminary results from a genome-wide association study on about 6500 ASD patients, a number that was sufficient to associate the MHC region in SZ (118), failed to reveal an association between the MHC and ASD (120). These results suggest that the MHC, which includes complement genes, might contribute to synapse elimination in BD, but seems less likely to be involved in ASD. Other mechanisms controlling spine density, such as autophagy, may underlie connectivity defects in some forms of ASD (117). Third, immune activation during brain development interacts with a genetic program that varies from one individual to another. Thus, genetic predisposition leading to strong expression of C4A could interact with brain inflammation to induce excessive synaptic pruning in SZ and possibly BD, while other variants, or other predisposition genes, would promote a different consequence of inflammation in ASD.

Types of Synapses Subject to Complement-Mediated Elimination

It is unclear whether complement-mediated synapse elimination targets both glutamatergic synapses and other synapses, such as GABAergic synapses, or even sites of neuromodulator (e.g., dopamine, acetylcholine, serotonin, noradrenaline) release. Microglia- and complement-mediated pruning has been extensively studied in hippocampal and thalamic excitatory neurons that bear dendritic spines (6, 7, 67, 69, 71). Moreover, developmental

TABLE 2 | Complement pathways involved in selected brain disorders.

	Neurodevelopmental disorder		Neuro-immune disorder	Neurodegenerative disorder	
	Schizophrenia		West Nile Virus	Alzheimer's disease	
Complement pathway	Classical	Lectin	Classical	Classical	Alternative
Putative complement activation	Increased expression of C4A	Unknown	C1q binds to WNV antigen-positive neurons	C1q binds to Aβ	C3b/iC3b binds to Aβ
Changes in complement components	Increased C4 mRNA expression (human brain)	Increased MBL/MASP-2 complex activation (human serum)	Increased C1q, C2, C3 and C4b mRNA expression in the brain (mouse model)	Increased C1q, C3, C4, C9 mRNA expression (human brain) and increased C1q, C3, C3aR protein expression in the brain (mouse models)	Increased expression of split products of Factor B (Ba and Bb) (human brain)
Cellular mechanisms involved	Excess of microglia-dependent synaptic pruning	Unknown	Excess of C3/C3aR-dependent synaptic pruning	Excess of microglia-dependent synaptic pruning through the C3/CR3 and C3/C3aR axis	Unknown
References	Sekar et al. (7)	Mayilyan et al. (84)	Vasek et al. (97)	Jiang et al. (101) Blalock et al. (103) Hong et al. (109) Litvinchuk et al. (110)	Bradt et al. (102) Strohmeier et al. (111)

synaptic pruning in the primate cortex as well as excessive synaptic pruning in the schizophrenic cortex have been mostly studied, at the cellular level, using spine density as a readout (61, 79). Does this mean that dendritic spines are the physical substrate for complement-mediated pruning? Accumulating evidence shows that complement-mediated synapse pruning involves the elimination of presynaptic elements, but not postsynaptic material, by microglia (67, 71), although microglial engulfment of postsynaptic structures has also been reported (121). Thus, the disappearance of dendritic spines may follow the elimination of presynaptic elements, but is unlikely to be directly caused by complement-mediated microglial trophocytosis. Is complement-mediated synaptic pruning limited to glutamatergic synapses on dendritic spines? In this case, glutamatergic afferences onto GABAergic interneurons, which are almost deprived of dendritic spines, should be spared by complement-mediated pruning. Conversely, medium spiny neurons in the striatum, which bear numerous spines, may be particularly prone to undergo elevated synaptic pruning. This is important in the context of SZ, since typical antipsychotics primarily exert their function by blocking dopamine D2 receptors which are strongly expressed in medium spiny neurons. Interestingly, there is evidence that hippocampal GABAergic synapses are not affected by genetic manipulations altering microglia-neuron communication, suggesting that the mechanisms of pruning are different at excitatory and inhibitory synapses (70). In line with these findings, early electron microscopy studies in the macaque cortex showed a decrease in asymmetric (glutamatergic) synapse density, but not in symmetric (mostly GABAergic) synapse density during postnatal development (122). Furthermore C1q-deficient mice, which display alterations of synaptic pruning at excitatory synapses, show no significant change in inhibitory connectivity to layer V cortical pyramidal neurons (68). These studies supported the concept that complement- and microglia-dependent pruning preferentially affects excitatory synapses during postnatal development. However, C1q-dependent pruning of inhibitory, but not excitatory, synapses was recently demonstrated in the thalamus of progranulin-deficient mice (112). Moreover, the density of excitatory synapses on parvalbumin interneurons is lower in postpubertal relative to prepubertal monkeys, suggesting some degree of pruning at excitatory synapses onto spiny neurons, although the role of complement was not investigated (123). Thus, different types of synapses may undergo complement-dependent pruning. Further studies are now needed to evaluate normal and pathological synaptic pruning in different neuronal types, brain areas, and neurotransmitter systems. If specific types of synapses are predominantly targeted by complement-mediated elimination, it will be important to decipher the molecular mechanisms that underlie this selectivity.

Effect on the Brain of Complement Molecules Generated Outside the Brain

Do complement molecules from outside the brain influence the central nervous system? Since most complement proteins do not cross the blood-brain barrier (BBB), it is likely that only complement molecules generated locally by neurons and glial

cells shape normal brain development and function. Moreover, in SZ and AD, changes in complement levels in the brain are associated with upregulated complement expression by brain cells (7, 34). Nevertheless, pathological activation of complement in the periphery, for example, following immune challenges, may indirectly contribute to inflammation and physio-pathological processes in the brain by i) increasing the production of cytokines that cross the BBB and ii) compromising the BBB, which allows complement molecules of the periphery to enter the brain. Thus, BBB disruption is present in patients with SLE and the elevated level of C3 in the patients' cerebro-spinal fluid was suggested to be, at least in part, attributable to the transfer of C3 from the systemic circulation (124). On the contrary, complement activation in the periphery can protect against brain-damaging infections. For example, the complement system controls West Nile virus infection by inducing a protective antibody response (125).

The Complement System as a Target for Therapeutic Intervention in Psychiatric Disorders

The first anti-complement drug used in the clinic, eculizumab, is the humanized form of a C5-specific monoclonal antibody. As early as 2004, clinical trials demonstrated its efficacy in treating paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH), a hematological disorder that involves complement-dependent intravascular hemolysis (126). Chronic eculizumab treatment substantially reduces mortality and improves quality of life for patients with PNH (127). After the US Food and Drug Administration (FDA) approval of eculizumab for PNH treatment in 2007, eculizumab also received FDA approval for the kidney disease atypical haemolytic uraemic syndrome in 2011. In addition, four C1 inhibitors (Berinert, Ruconest, Cetor, and Cinryze) are currently approved for the treatment of hereditary angioedema (128). These successes renewed interest in complement-targeted drug discovery. Given the role of complement in innate immunity, the use of complement-targeting drugs has raised concerns about potential adverse side-effects. Indeed, patients with complement deficiencies are more likely to suffer from serious infections (129, 130). The infectious risk decreases when patients with complement deficiencies reach adulthood, suggesting that complement therapeutics may be safer past adolescence (131). Moreover, the long-term clinical use of eculizumab has allowed to gather favourable safety data, which has contributed to enhance the interest for complement therapeutics. Thus, several anti-complement drugs are in advanced-stage clinical trials, and many more are in development (128, 132). These compounds target several distinct complement proteins, including C1q, C1s, C2, Factor B, Factor D, C3, C5, C5a, and C5aR. Few target the central nervous system, for the role of complement in brain disorders has been established relatively recently and because of specific requirements for brain-targeting drugs. In particular, crossing the blood-brain barrier requires small lipophilic molecules, or molecules that can access carrier-mediated transport systems within the blood-brain barrier. A few recently developed anti-complement molecules have been shown to be effective in crossing the blood-brain barrier (133). Preclinical studies support the use of anti-complement drugs to prevent synapse loss in brain trauma and neurological disorders, but these findings have yet to translate into

the clinic (134). Nevertheless, these investigations may pave the way for complement-based therapies in psychiatric disorders.

CONCLUSIONS

In conclusion, our review outlines recent discoveries that link the complement system and psychiatric disorders. In the brain, the role of complement appears fundamentally different from its role in innate immunity, although key elements of the signaling cascades well described in the immune system are preserved. Indeed, most complement molecules of the three complement pathways, including those that form the membrane attack complex, are expressed in the brain. The specificity of complement actions in the brain seems to result from the specificity of the neural mechanisms involved, such as synaptic pruning, and from the expression of molecular targets that may not exist outside the brain, such as those located at synapses. These complement-binding molecules remain to be fully identified.

Early studies into the antibacterial action of serum complement can be traced back to the early 1790s and were continued by generations of scientific luminaries including Ilya Metchnikoff and

Jules Bordet, as discussed by Sim et al. in a recent historical review (135). It is striking that research on the complement is still a source of major discoveries today and will provide exciting insight into normal and pathological brain development, a research area that might have seemed unlikely to the pioneers of the 18th, 19th, and 20th centuries.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD and CLM jointly wrote the article.

FUNDING

MD was the recipient of a PhD fellowship from the doctoral school “Brain-Cognition-Behavior” (ED3C), Sorbonne Université, Paris. This work was supported by a grant from the BioPsy Laboratory of Excellence to CLM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr L. Maroteaux for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Khandaker GM, Cousins L, Deakin J, Lennox BR, Yolken R, Jones PB. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. *Lancet Psychiatry* (2015) 2(3):258–70. doi: 10.1016/S2215-0366(14)00122-9
- Meltzer A, Van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology* (2017) 42(1):284–98. doi: 10.1038/npp.2016.158
- Oliveira J, Oliveira-Maia AJ, Tamouza R, Brown AS, Leboyer M. Infectious and immunogenetic factors in bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand* (2017) 136(4):409–23. doi: 10.1111/acps.12791
- Rosenblat JD, McIntyre RS. Bipolar disorder and immune dysfunction: epidemiological findings, proposed pathophysiology and clinical implications. *Brain Sci* (2017) 7(11):144. doi: 10.3390/brainsci7110144
- Siniscalco D, Schultz S, Brigida AL, Antonucci N. Inflammation and neuro-immune dysregulations in autism spectrum disorders. *Pharmaceuticals (Basel)* (2018) 11(2):56. doi: 10.3390/ph11020056
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* (2007) 131(6):1164–78. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036
- Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* (2016) 530(7589):177–83. doi: 10.1038/nature16549
- Li K, Sacks SH, Zhou W. The relative importance of local and systemic complement production in ischaemia, transplantation and other pathologies. *Mol Immunol* (2007) 44(16):3866–74. doi: 10.1016/j.molimm.2007.06.006
- Walport MJ. Complement. first of two parts. *N Engl J Med* (2001) 344(14):1058–66. doi: 10.1056/NEJM200104053441406
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* (2010) 11(9):785–97. doi: 10.1038/ni.1923
- Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev* (2011) 63(12):965–75. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.005
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* (2015) 6:262. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262
- Alcorlo M, Martinez-Barricarte R, Fernandez FJ, Rodriguez-Gallego C, Round A, Vega MC, et al. Unique structure of iC3b resolved at a resolution of 24 Å by 3D-electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(32):13236–40. doi: 10.1073/pnas.1106746108
- Kieslich CA, Morikis D. The two sides of complement C3d: evolution of electrostatics in a link between innate and adaptive immunity. *PLoS Comput Biol* (2012) 8(12):e1002840. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002840
- Woodruff TM, Ager RR, Tenner AJ, Noakes PG, Taylor SM. The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system. *Neuromolecular Med* (2010) 12(2):179–92. doi: 10.1007/s12017-009-8085-y
- Alexander JJ. Blood-brain barrier (BBB) and the complement landscape. *Mol Immunol* (2018) 102:26–31. doi: 10.1016/j.molimm.2018.06.267
- Levi-Strauss M, Mallat M. Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. *J Immunol* (1987) 139(7):2361–6.
- Walker DG, McGeer PL. Complement gene expression in neuroblastoma and astrocytoma cell lines of human origin. *Neurosci Lett* (1993) 157(1):99–102. doi: 10.1016/0304-3940(93)90652-2
- Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol* (1999) 160(1):289–99. doi: 10.1006/exnr.1999.7199
- Thomas A, Gasque P, Vaudry D, Gonzalez B, Fontaine M. Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int Immunol* (2000) 12(7):1015–23. doi: 10.1093/intimm/12.7.1015
- Barnum SR, Ishii Y, Agrawal A, Volanakis JE. Production and interferon-gamma-mediated regulation of complement component C2 and factors B and D by the astrogloma cell line U105-MG. *Biochem J* (1992) 287(Pt 2):595–601. doi: 10.1042/bj2870595
- Haga S, Aizawa T, Ishii T, Ikeda K. Complement gene expression in mouse microglia and astrocytes in culture: comparisons with mouse peritoneal macrophages. *Neurosci Lett* (1996) 216(3):191–4. doi: 10.1016/0304-3940(96)13040-8
- Hosokawa M, Klegeris A, Maguire J, McGeer PL. Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. *Glia* (2003) 42(4):417–23. doi: 10.1002/glia.10234
- Gasque P, Morgan BP. Complement regulatory protein expression by a human oligodendrocyte cell line: cytokine regulation and comparison with astrocytes. *Immunology* (1996) 89(3):338–47. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-756.x

25. Shen Y, Li R, McGeer EG, McGeer PL. Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res* (1997) 769(2):391–5. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00850-0
26. Gordon DL, Avery VM, Adrian DL, Sadlon TA. Detection of complement protein mRNA in human astrocytes by the polymerase chain reaction. *J Neurosci Methods* (1992) 45(3):191–7. doi: 10.1016/0165-0270(92)90076-P
27. Gorelik A, Sapir T, Haffner-Krausz R, Olender T, Woodruff TM, Reiner O. Developmental activities of the complement pathway in migrating neurons. *Nat Commun* (2017a) 8:15096. doi: 10.1038/ncomms15096
28. Gasque P, Fontaine M, Morgan BP. Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol* (1995) 154(9):4726–33.
29. Gasque P, Chan P, Mauger C, Schouff MT, Singhrao S, Dierich MP, et al. Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol* (1996) 156(6):2247–55.
30. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Gotze O, Morgan BP. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* (1997) 150(1):31–41.
31. Davoust N, Jones J, Stahel PF, Ames RS, Barnum SR. Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells. *Glia* (1999) 26(3):201–11. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199905)26:3<201::AID-GLIA2>3.0.CO;2-M
32. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, Barnum SR, Eugster H, Trentz O, et al. Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol* (2000) 109(2):164–72. doi: 10.1016/S0165-5728(00)00304-0
33. Benard M, Gonzalez BJ, Schouff MT, Falluel-Morel A, Vaudry D, Chan P, et al. Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation. Neuroprotective effect of C5a against apoptotic cell death. *J Biol Chem* (2004) 279(42):43487–96. doi: 10.1074/jbc.M404124200
34. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* (1999) 154(3):927–36. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65340-0
35. Shi Q, Colodner KJ, Matousek SB, Merry K, Hong S, Kenison JE, et al. Complement C3-deficient mice fail to display age-related hippocampal decline. *J Neurosci* (2015) 35(38):13029–42. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1698-15.2015
36. Verkhratsky A, Parpura V. Recent advances in (patho)physiology of astroglia. *Acta Pharmacol Sin* (2010) 31(9):1044–54. doi: 10.1038/aps.2010.108
37. Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H. Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* (2016) 36(2):577–89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016
38. Thomas WE. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* (1992) 17(1):61–74. doi: 10.1016/0165-0173(92)90007-9
39. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* (2001) 36(2):180–90. doi: 10.1002/glia.1107
40. Walker DG, Kim SU, McGeer PL. Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. *J Neurosci Res* (1995a) 40(4):478–93. doi: 10.1002/jnr.490400407
41. Walker DG, Yasuhara O, Patston PA, McGeer EG, McGeer PL. Complement C1 inhibitor is produced by brain tissue and is cleaved in Alzheimer disease. *Brain Res* (1995b) 675(1-2):75–82. doi: 10.1016/0006-8993(95)00041-N
42. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Wang P, Sayah S, Fontaine M, et al. The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J Immunol* (1998) 160(7):3543–54.
43. Webster SD, Park M, Fonseca MI, Tenner AJ. Structural and functional evidence for microglial expression of C1qR(P), the C1q receptor that enhances phagocytosis. *J Leukoc Biol* (2000) 67(1):109–16. doi: 10.1002/jlb.67.1.109
44. Fonseca MI, Chu SH, Hernandez MX, Fang MJ, Modarresi L, Selvan P, et al. Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J Neuroinflammation* (2017) 14(1):48. doi: 10.1186/s12974-017-0814-9
45. Stahel PF, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC, Hans VH, Barnum SR. Experimental diffuse axonal injury induces enhanced neuronal C5a receptor mRNA expression in rats. *Brain Res Mol Brain Res* (1997a) 50(1-2):205–12. doi: 10.1016/S0169-328X(97)00189-7
46. Stahel PF, Nadal D, Pfister HW, Paradis PM, Barnum SR. Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet* (1997b) 349(9069):1886–7. doi: 10.1016/S0140-6736(05)63877-9
47. Van Beek J, Bernaudin M, Petit E, Gasque P, Nouvelot A, MacKenzie ET, et al. Expression of receptors for complement anaphylatoxins C3a and C5a following permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Exp Neurol* (2000) 161(1):373–82. doi: 10.1006/exnr.1999.7273
48. Schafer MK, Schwaeble WJ, Post C, Salvati P, Calabresi M, Sim RB, et al. Complement C1q is dramatically up-regulated in brain microglia in response to transient global cerebral ischemia. *J Immunol* (2000) 164(10):5446–52. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5446
49. McLin VA, Hu CH, Shah R, Jamrich M. Expression of complement components coincides with early patterning and organogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* (2008) 52(8):1123–33. doi: 10.1387/ijdb.072465v
50. Denny KJ, Coulthard LG, Jeanes A, Ligo S, Simmons DG, Callaway LK, et al. C5a receptor signaling prevents folate deficiency-induced neural tube defects in mice. *J Immunol* (2013) 190(7):3493–9. doi: 10.4049/jimmunol.1203072
51. Coulthard LG, Hawksworth OA, Li R, Balachandran A, Lee JD, Sepelband F, et al. Complement C5aR1 signaling promotes polarization and proliferation of embryonic neural progenitor cells through PKCzeta. *J Neurosci* (2017) 37(22):5395–407. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0525-17.2017
52. Bogestal YR, Barnum SR, Smith PL, Mattisson V, Pekny M, Pekna M. Signaling through C5aR is not involved in basal neurogenesis. *J Neurosci Res* (2007) 85(13):2892–7. doi: 10.1002/jnr.21401
53. Benard M, Raoult E, Vaudry D, LePrince J, Falluel-Morel A, Gonzalez BJ, et al. Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol Immunol* (2008) 45(14):3767–74. doi: 10.1016/j.molimm.2008.05.027
54. Gorelik A, Sapir T, Woodruff TM, Reiner O. Serping1/C1 inhibitor affects cortical development in a cell autonomous and non-cell autonomous manner. *Front Cell Neurosci* (2017b) 11:169. doi: 10.3389/fncel.2017.00169
55. Moriyama M, Fukuhara T, Britschgi M, He Y, Narasimhan R, Villeda S, et al. Complement receptor 2 is expressed in neural progenitor cells and regulates adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* (2011) 31(11):3981–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3617-10.2011
56. Rahpeymai Y, Hietala MA, Wilhelmsson U, Fotheringham A, Davies I, Nilsson AK, et al. Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J* (2006) 25(6):1364–74. doi: 10.1038/sj.emboj.7601004
57. Carmona-Fontaine C, Theveneau E, Tzekou A, Tada M, Woods M, Page KM, et al. Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev Cell* (2011) 21(6):1026–37. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.012
58. Shinjyo N, Stahlberg A, Dragunow M, Pekny M, Pekna M. Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells* (2009) 27(11):2824–32. doi: 10.1002/stem.225
59. Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* (1996) 274(5290):1133–8. doi: 10.1126/science.274.5290.1133
60. Nenkinskyte U, Gross CT. Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurosci* (2017) 18(11):658–70. doi: 10.1038/nrn.2017.110
61. Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res* (1979) 163(2):195–205. doi: 10.1016/0006-8993(79)90349-4
62. Walhovd KB, Fjell AM, Giedd J, Dale AM, Brown TT. Through thick and thin: a need to reconcile contradictory results on trajectories in human cortical development. *Cereb Cortex* (2017) 27(2):1472–81. doi: 10.1093/cercor/bhv301
63. Hashimoto K, Kano M. Synapse elimination in the developing cerebellum. *Cell Mol Life Sci* (2013) 70(24):4667–80. doi: 10.1007/s00018-013-1405-2
64. Darabid H, Perez-Gonzalez AP, Robitaille R. Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* (2014) 15(11):703–18. doi: 10.1038/nrn3821
65. Hooks BM, Chen C. Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse. *Neuron* (2006) 52(2):281–91. doi: 10.1016/j.neuron.2006.07.007

66. Huberman AD, Feller MB, Chapman B. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci* (2008) 31:479–509. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125533
67. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* (2012) 74(4):691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026
68. Chu Y, Jin X, Parada I, Pestic A, Stevens B, Barres B, et al. Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(17):7975–80. doi: 10.1073/pnas.0913449107
69. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* (2011) 333(6048):1456–8. doi: 10.1126/science.1202529
70. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* (2014) 17(3):400–6. doi: 10.1038/nn.3641
71. Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Nenkinskyte U, et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun* (2018) 9(1):1228. doi: 10.1038/s41467-018-03566-5
72. Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* (2013) 504(7480):394–400. doi: 10.1038/nature12776
73. Iram T, Ramirez-Ortiz Z, Byrne MH, Coleman UA, Kingery ND, Means TK, et al. Megf10 is a receptor for C1Q that mediates clearance of apoptotic cells by astrocytes. *J Neurosci* (2016) 36(19):5185–92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3850-15.2016
74. Bolliger MF, Martinelli DC, Sudhof TC. The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(6):2534–9. doi: 10.1073/pnas.1019577108
75. Lanoue V, Usardi A, Sigoillot SM, Talleur M, Iyer K, Mariani J, et al. The adhesion-GPCR BAI3, a gene linked to psychiatric disorders, regulates dendrite morphogenesis in neurons. *Mol Psychiatry* (2013) 18(8):943–50. doi: 10.1038/mp.2013.46
76. Sigoillot SM, Iyer K, Binda F, Gonzalez-Calvo I, Talleur M, Vodjdani G, et al. The secreted protein C1QL1 and its receptor BAI3 control the synaptic connectivity of excitatory inputs converging on cerebellar Purkinje cells. *Cell Rep.* (2015) 10(5):820–32. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.034
77. Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W, et al. Transsynaptic modulation of kainate receptor functions by C1q-like proteins. *Neuron* (2016) 90(4):752–67. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.001
78. Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res* (1982) 17(4):319–34. doi: 10.1016/0022-3956(82)90038-3
79. Glantz LA, Lewis DA. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* (2000) 57(1):65–73. doi: 10.1001/archpsyc.57.1.65
80. Sweet RA, Henteloff RA, Zhang W, Sampson AR, Lewis DA. Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* (2009) 34(2):374–89. doi: 10.1038/npp.2008.67
81. McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, et al. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry* (1999) 45(9):1099–119. doi: 10.1016/S0006-3223(99)00018-9
82. Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry* (2005) 162(12):2233–45. doi: 10.1176/appi.ajp.162.12.2233
83. Hakobyan S, Boyajyan A, Sim RB. Classical pathway complement activity in schizophrenia. *Neurosci Lett* (2005) 374(1):35–7. doi: 10.1016/j.neulet.2004.10.024
84. Mayilyan KR, Arnold JN, Presanis JS, Soghoyan AF, Sim RB. Increased complement classical and mannan-binding lectin pathway activities in schizophrenia. *Neurosci Lett* (2006) 404(3):336–41. doi: 10.1016/j.neulet.2006.06.051
85. Mayilyan KR, Weinberger DR, Sim RB. The complement system in schizophrenia. *Drug News Perspect* (2008) 21(4):200–10. doi: 10.1358/dnp.2008.21.4.1213349
86. Havik B, Le Hellard S, Rietschel M, Lybaek H, Djurovic S, Mattheisen M, et al. The complement control-related genes CSMD1 and CSMD2 associate to schizophrenia. *Biol Psychiatry* (2011) 70(1):35–42. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.01.030
87. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters, JT, Farh K, et al., et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* (2014) 511(7510):421–7. doi: 10.1038/nature13595
88. Escudero-Esparza A, Kalchishkova N, Kurbasic E, Jiang WG, Blom AM. The novel complement inhibitor human CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1) protein promotes factor I-mediated degradation of C4b and C3b and inhibits the membrane attack complex assembly. *FASEB J* (2013) 27(12):5083–93. doi: 10.1096/fj.13-230706
89. Steen VM, Nepal C, Erslund KM, Holdhus R, Naevdal M, Ratvik SM, et al. Neuropsychological deficits in mice depleted of the schizophrenia susceptibility gene CSMD1. *PLoS One* (2013) 8(11):e79501. doi: 10.1371/journal.pone.0079501
90. Prasad KM, Chowdari KV, D'Aiuto LA, Iyengar S, Stanley JA, Nimgaonkar VL. Neuropil contraction in relation to Complement C4 gene copy numbers in independent cohorts of adolescent-onset and young adult-onset schizophrenia patients—a pilot study. *Transl Psychiatry* (2018) 8(1):134. doi: 10.1038/s41398-018-0181-z
91. Brey RL, Holliday SL, Saklad AR, Navarrete MG, Hermsillo-Romo D, Stallworth CL, et al. Neuropsychiatric syndromes in lupus: prevalence using standardized definitions. *Neurology* (2002) 58(8):1214–20. doi: 10.1212/WNL.58.8.1214
92. Cagnoli PC, Sundgren PC, Kairys A, Graft CC, Clauw DJ, Gebarski S, et al. Changes in regional brain morphology in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (2012) 39(5):959–67. doi: 10.3899/jrheum.110833
93. Bialas AR, Presumey J, Das A, van der Poel CE, Lapchak PH, Mesin L, et al. Microglia-dependent synapse loss in type I interferon-mediated lupus. *Nature* (2017) 546(7659):539–43. doi: 10.1038/nature22821
94. Presumey J, Bialas AR, Carroll MC. Complement system in neural synapse elimination in development and disease. *Adv Immunol* (2017) 135:53–79. doi: 10.1016/bs.ai.2017.06.004
95. Sadek JR, Pergam SA, Harrington JA, Echevarria LA, Davis LE, Goade D, et al. Persistent neuropsychological impairment associated with West Nile virus infection. *J Clin Exp Neuropsychol* (2010) 32(1):81–7. doi: 10.1080/13803390902881918
96. Petersen LR, Carson PJ, Biggerstaff BJ, Custer B, Borchardt SM, Busch MP. Estimated cumulative incidence of West Nile virus infection in US adults, 1999–2010. *Epidemiol Infect* (2013) 141(3):591–5. doi: 10.1017/S0950268812001070
97. Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, Soung A, et al. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* (2016) 534(7608):538–43. doi: 10.1038/nature18283
98. D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES. The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med* (2001) 7(6):367–82. doi: 10.1007/BF03402183
99. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2(1):a006346. doi: 10.1101/cshperspect.a006346
100. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* (2016) 8(6):595–608. doi: 10.15252/emmm.201606210
101. Jiang H, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ. beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol* (1994) 152(10):5050–9.
102. Bradt BM, Kolb WP, Cooper NR. Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *J Exp Med* (1998) 188(3):431–8. doi: 10.1084/jem.188.3.431
103. Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(7):2173–8. doi: 10.1073/pnas.0308512100
104. Eikeleboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC. Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* (1989) 56(4):259–62. doi: 10.1007/BF02890024

105. Itagaki S, Akiyama H, Saito H, McGeer PL. Ultrastructural localization of complement membrane attack complex (MAC)-like immunoreactivity in brains of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* (1994) 645(1-2):78–84. doi: 10.1016/0006-8993(94)91640-3
106. Webster S, Lue LF, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, Terai K, et al. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* (1997) 18(4):415–21. doi: 10.1016/S0197-4580(97)00042-0
107. Shen Y, Lue L, Yang L, Roher A, Kuo Y, Strohmeyer R, et al. Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (2001) 305(3):165–8. doi: 10.1016/S0304-3940(01)01842-0
108. Fonseca MI, Zhou J, Botto M, Tenner AJ. Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* (2004) 24(29):6457–65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0901-04.2004
109. Hong S, Beja-Glasser VE, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* (2016) 352(6286):712–6. doi: 10.1126/science.aad8373
110. Litvinchuk A, Wan YW, Swartzlander DB, Chen F, Cole A, Propson NE, et al. Complement C3aR inactivation attenuates tau pathology and reverses an immune network deregulated in tauopathy models and Alzheimer's disease. *Neuron* (2018) 100(6):1337–1353 e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.031
111. Strohmeyer R, Shen Y, Rogers J. Detection of complement alternative pathway mRNA and proteins in the Alzheimer's disease brain. *Brain Res Mol Brain Res* (2000) 81(1-2):7–18. doi: 10.1016/S0169-328X(00)00149-2
112. Lui H, Zhang J, Makinson SR, Cahill MK, Kelley KW, Huang HY, et al. Progranulin deficiency promotes circuit-specific synaptic pruning by microglia via complement activation. *Cell* (2016) 165(4):921–35. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.001
113. Williams PA, Tribble JR, Pepper KW, Cross SD, Morgan BP, Morgan JE, et al. Inhibition of the classical pathway of the complement cascade prevents early dendritic and synaptic degeneration in glaucoma. *Mol Neurodegener* (2016) 11:26. doi: 10.1186/s13024-016-0091-6
114. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* (2017) 541(7638):481–7. doi: 10.1038/nature21029
115. Hibar DP, Westlye LT, Doan NT, Jahanshad N, Cheung JW, Ching CRK, et al. Cortical abnormalities in bipolar disorder: an MRI analysis of 6503 individuals from the ENIGMA bipolar disorder working group. *Mol Psychiatry* (2018) 23(4):932–42. doi: 10.1038/mp.2017.73
116. Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* (2010) 1309:83–94. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.120
117. Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* (2014) 83(5):1131–43. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.040
118. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* (2009) 460(7256):748–52. doi: 10.1038/nature08185
119. Akcan U, Karabulut S, Ismail Kucukali C, Cakir S, Tuzun E. Bipolar disorder patients display reduced serum complement levels and elevated peripheral blood complement expression levels. *Acta Neuropsychiatr* (2018) 30(2):70–8. doi: 10.1017/neu.2017.10
120. Ruzzo EK, Geschwind DH. Schizophrenia genetics complements its mechanistic understanding. *Nat Neurosci* (2016) 19(4):523–5. doi: 10.1038/nn.4277
121. Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* (2010) 8(11):e1000527. doi: 10.1371/journal.pbio.1000527
122. Bourgeois JP, Rakic P. Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J Neurosci* (1993) 13(7):2801–20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-07-02801.1993
123. Chung DW, Wills ZP, Fish KN, Lewis DA. Developmental pruning of excitatory synaptic inputs to parvalbumin interneurons in monkey prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(4):E629–37. doi: 10.1073/pnas.1610077114
124. Asano T, Ito H, Kariya Y, Hoshi K, Yoshihara A, Ugawa Y, et al. Evaluation of blood-brain barrier function by quotient alpha2 macroglobulin and its relationship with interleukin-6 and complement component 3 levels in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *PLoS One* (2017) 12(10):e0186414. doi: 10.1371/journal.pone.0186414
125. Mehlhop E, Whitby K, Oliphant T, Marri A, Engle M, Diamond MS. Complement activation is required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. *J Virol* (2005) 79(12):7466–77. doi: 10.1128/JVI.79.12.7466-7477.2005
126. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* (2004) 350(6):552–9. doi: 10.1056/NEJMoa031688
127. Hillmen P, Muus P, Roth A, Elebute MO, Risitano AM, Schrezenmeier H, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* (2013) 162(1):62–73. doi: 10.1111/bjh.12347
128. Ricklin D, Mastellos DC, Reis ES, Lambris JD. The renaissance of complement therapeutics. *Nat Rev Nephrol* (2018) 14(1):26–47. doi: 10.1038/nrneph.2017.156
129. Falcao DA, Reis ES, Paixao-Cavalcante D, Amano MT, Delcolli MI, Florido MP, et al. Deficiency of the human complement regulatory protein factor H associated with low levels of component C9. *Scand J Immunol* (2008) 68(4):445–55. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02152.x
130. Audemard-Verger A, Descloux E, Ponard D, Deroux A, Fantin B, Fieschi C, et al. Infections revealing complement deficiency in adults: a French nationwide study enrolling 41 patients. *Medicine (Baltimore)* (2016) 95(19):e3548. doi: 10.1097/MD.0000000000003548
131. Lachmann PJ, Smith RA. Taking complement to the clinic—has the time finally come? *Scand J Immunol* (2009) 69(6):471–8. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02258.x
132. Morgan BP, Harris CL. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* (2015) 14(12):857–77. doi: 10.1038/nrd4657
133. Ricklin D, Lambris JD. New milestones ahead in complement-targeted therapy. *Semin Immunol* (2016) 28(3):208–22. doi: 10.1016/j.smim.2016.06.001
134. Brennan FH, Lee JD, Ruitenber MJ, Woodruff TM. Therapeutic targeting of complement to modify disease course and improve outcomes in neurological conditions. *Semin Immunol* (2016) 28(3):292–308. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.015
135. Sim RB, Schwaebler W, Fujita T. Complement research in the 18th–21st centuries: Progress comes with new technology. *Immunobiology* (2016) 221(10):1037–45. doi: 10.1016/j.imbio.2016.06.011

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Druart and Le Magueresse. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.