université de BORDEAUX

THESE PRESENTEE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEURE DE

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE NEUROSCIENCES

Par **Anna SAINT-JEAN**

Plasticité électrophysiologique, transcriptomique et morphologique des interneurones spinaux GABAergiques pour déchiffrer les mécanismes de perception mécanosensorielle atypique dans l'autisme

Sous la direction du Dr. Yves LE FEUVRE

Soutenue le jeudi 4 décembre 2025

Membres du jury :

Mr Alexandre FAVEREAUX, Professeur de l'Université de Bordeaux, IINS Bordeaux	Président
Mme Ingrid BUREAU, Chargée de Recherche, IBDM Marseille	Rapportrice
Mr Eric LINGUEGLIA, Directeur de Recherche, IPMC Nice	Rapporteur
Mr Amaury FRANCOIS, Chargé de Recherche, IGF Montpellier	Examinateur
Mme Graziella DI CRISTO, Professeure de l'Université de Montréal, CHU Sainte-Justine	Examinatrice
Mme Matilde CORDERO-ERAUSQUIN, Directrice de Recherche, INCI Strasbourg	Examinatrice
Mr Yves LE FEUVRE, Chargé de Recherche, Neurocentre Magendie Bordeaux	Directeur de thèse

Titre :

Plasticité électrophysiologique, transcriptomique et morphologique des interneurones spinaux GABAergiques pour déchiffrer les mécanismes de perception mécanosensorielle atypique dans l'autisme

Résumé :

L'autisme se caractérise par des altérations de la communication et des interactions sociales, ainsi que par des comportements répétitifs. La plupart des personnes autistes présentent également une réactivité atypique aux stimuli sensoriels, notamment tactiles. En plus d'être une source majeure d'inconfort, des recherches récentes suggèrent que la dysfonction tactile pourrait en réalité contribuer au développement des autres symptômes centraux. C'est pourquoi comprendre les mécanismes neuronaux de cette dysfonction tactile est si important. Les informations tactiles sont perçues en périphérie et traitées dans la moelle épinière sous le contrôle d'interneurones inhibiteurs avant d'être transmises vers les structures cérébrales supérieures. Cependant, les altérations fonctionnelles éventuelles de ces neurones spinaux inhibiteurs dans les modèles murins de l'autisme restent encore largement méconnues. Pour explorer la plasticité fonctionnelle des interneurones spinaux GABAergiques (ISG) dans l'autisme, nous avons utilisé des souris *Fmr1*$^{-/y}$ croisées avec des lignées rapportrices *Gad1-GFP*. Ces souris présentent une haplo-insuffisance du gène *Gad1*, susceptible d'interférer avec le développement de phénotypes caractéristiques de l'autisme. Nous montrons ici, que les souris *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1*-GFP présentent des déficits de réactivité tactiles (latences plus longues au test de retrait de la bande adhésive, diminution de la réactivité à la stimulation par pinceau), une anxiété réduite dans le labyrinthe en croix surélevé, et des déficits sociaux, tels qu'on les observe typiquement dans les modèles d'autisme. Ensuite, afin de caractériser les propriétés électrophysiologiques, transcriptomiques et morphologiques des ISG dans des coupes aiguës de moelle épinière, nous avons utilisé la technique du patch-seq. Nous avons observé que les ISG présentent une excitabilité altérée, caractérisée par une fréquence accrue de potentiels d'action (PA) pour de faibles stimulations en courant, mais une fréquence réduite pour de fortes intensités par rapport aux souris WT. Cela conduit à une plage dynamique fonctionnelle plus étroite, décalée vers les stimulations de faible intensité. De manière importante, l'analyse transcriptomique des neurones enregistrés révèle que ces changements sont restreints à une sous-population d'ISG exprimant la parvalbumine (Pvalb) et le neuropeptide Y (NPY). Ensemble, nos résultats suggèrent que les altérations fonctionnelles des ISG, en particulier des neurones Pvalb et NPY dans les modèles d'autisme, perturbent le traitement des informations tactiles en amont du cerveau et pourraient jouer un rôle critique dans le développement des déficits sensoriels et sociaux caractéristiques de l'autisme, soulignant leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques.

Mots clés : Autisme, moelle épinière, interneurones GABAergiques, patch-seq, électrophysiologie, Syndrome de l'X Fragile

Title:

Electrophysiologic, transcriptomic and morphologic plasticity of spinal GABAergic interneurons to decipher atypical mechanosensory perception in Autism.

Abstract:

Autism is characterized by impairments in social communication and interactions, as well as repetitive behaviours. Most people with autism also exhibit aberrant reactivity to sensory stimuli including tactile stimuli. In addition to being a major source of discomfort for autistic people, recent research suggests that tactile dysfunction may actually contribute to the development of the others core symptoms. This is why understanding the neural mechanisms behind tactile dysfunction is so important. Tactile information is perceived in the periphery and processed in the spinal cord under the control of inhibitory interneurons before being sent to higher brain structures. However, whether these inhibitory neurons undergo functional alterations in autistic models remain poorly understood. To explore the functional plasticity of spinal GABAergic interneurons (SGI) in autism, we used *Fmr1*$^{-/y}$ mice crossed with *Gad1-GFP* reporter lines. These mice exhibit haploinsufficiency for the *Gad1* gene, which may interfere with the development of characteristic autistic phenotypes. We show that *Fmr1*$^{-/y}$-*Gad1-GFP* mice display tactile deficits (longer latencies in tape removal test, decreased reactivity to brush stimulation), decreased anxiety in elevated plus maze, and social deficits, as typically observed in autistic models. Then, to characterize electrophysiologic, transcriptomic and morphologic properties of SGI in acute spinal slices we used the patch-seq technique. We observed that SGI exhibit altered excitability, characterized by an increased firing frequency of action potentials (AP) at low current injections, but a reduced frequency at high intensities compared to WT mice. This results in a narrower functional dynamic range, shifted toward lower-intensity stimulations. Importantly, transcriptomic analysis of recorded neurons reveals that these changes are restricted to a subpopulation of SGI expressing the parvalbumin (Pvalb) and the neuropeptide Y (NPY) marker. Altogether, we suggest that functional alterations of SGI, particularly Pvalb and NPY neurons in autism models disrupt tactile information processing upstream of the brain and may play a critical role in the development of sensory and social deficits characteristic of autism, underscoring their potential as therapeutic targets.

Keywords : Autism, spinal cord, GABAergic interneurons, patch-seq, electrophysiology, Fragile X Syndrome

---

Unité de recherche :

Neurocentre Magendie, INSERM U1215

146 Rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux Cedex

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Neurocentre Magendie INSERM U1215 dirigé par le Dr. Stéphane Oliet dans l'équipe « Plasticité corticale » dirigé par le Dr. Andreas Frick. Cette thèse a été conduite sous la direction du Dr. Yves Le Feuvre. Ce travail a été financé par l'ANR EMT-Sens.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **4**
TABLE DES FIGURES **6**
REMERCIEMENTS **7**
ABBREVIATIONS **9**
INTRODUCTION **12**
I – Troubles Neurodéveloppementaux **12**
I.A) Autisme 13
I.A-1) Caractéristiques cliniques & Diagnostic 14
I.A-2) Prévalence & Epidémiologie 17
I.A-3) Etiologie 18
I.A-4) Neurobiologie 21
I.A-5) Approches thérapeutiques 22
I.B) Syndrome de l'X fragile 23
I.B-1) Caractéristiques cliniques & Diagnostic 24
I.B-2) Etiologie 24
I.B-3) Epidémiologie / Prévalence 26
I.B-4) Neurobiologie 26
I.B-5) Approches thérapeutiques 27
I.C) Modèles expérimentaux de l'autisme : Focus sur le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$ 29
I.C-1) Mécanismes 29
I.C-2) Comportement 30
I.C-3) Altérations neurobiologiques sous-jacentes aux altérations de sensibilité tactile 32
II – Transmission et traitement de l'information tactile **36**
II.A) Afférences primaires 37
II.A-1) Mécanorécepteurs à bas seuil d'activation (LTMRs) 38
II.A-2) Nocicepteurs ou Mécanorécepteurs à Haut seuil d'activation (HTMRs) 43
II.A-3) Thermorécepteurs 45
II.A-4) ***Focus autisme*** : altérations reconnues au niveau des mécanorécepteurs et plus particulièrement des LTMRs 46
II.B) Intégration dans les cornes dorsales de la moelle épinière 47
II.B-1) Organisation laminaire et projection des afférences sensorielles primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière 48
II.B-2) Populations neuronales de la CDME 53
II.B-3) Connectivité et rôle fonctionnel des différentes sous-populations d'interneurones ... 65

II.C) Voies ascendantes 68
III – Le système GABAergique 71
III.A) Généralités 72
III.A-1) Synthèse, libération et recapture du GABA 72
III.A-2) Récepteurs GABA 73
III.B) Transmission synaptique GABAergique dans le système somatosensoriel spinale 75
III.B-1) Emergence des neurones $GABA^+$ 75
III.B-2) Maturation fonctionnelle du GABA 76
III.C) Focus autisme : dysfonctions GABAergiques connues 78
III.C-1) Dans la moelle épinière 79
Objectifs de l'étude 80
ARTICLE 83
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 157
Le modèle *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* 158
Avantages et limites de la technique de patch-seq 159
La réduction de l'activité des canaux HCN n'est pas suffisante pour expliquer les altérations d'excitabilité intrinsèque des interneurones spinaux GABAergiques des souris *Fmr1*$^{-/y}$ 161
L'hyperexcitabilité des interneurones spinaux GABAergiques pour les faibles intensités de stimulation ne semble pas affecter la transmission synaptique inhibitrice *ex vivo* 162
Les interneurones spinaux GABAergiques des souris *Fmr1*$^{-/y}$ ne subissent pas de remodelage de l'arborisation dendritique 164
Lien entre la diminution de précision du codage de l'information tactile par les interneurones spinaux GABAergiques et les altérations de sensibilité tactiles observées dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$ 164
L'hypothèse Parvalbumine de l'autisme 167
BIBLIOGRAPHIE 170

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma illustrant la localisation et le rôle des protéines dont les mutations sont associées à l'autisme 20
Figure 2 : Schéma récapitulant les effets de l'expansion de la répétition du trinucléotide CGG dans le chromosome X fragile. 25
Figure 3 : Vue globale des canalopathies liées au SXF et leurs conséquences biologiques et comportementales. 28
Figure 4 : Schéma général et simplifié du trajet de l'information sensorielle tactile. 36
Figure 5 : Caractéristiques des trois types de fibres 38
Figure 6 : Organisation et structure des mécanorécepteurs cutanées 41
Figure 7 : Récapitulatif des caractéristiques individuelles des différents mécanorécepteurs. 44
Figure 8 : Organisation laminaire de la substance grise de la moelle épinière et projection des afférences primaires dans les cornes dorsales 49
Figure 9 : Les deux types de glomérules synaptiques 50
Figure 10 : La théorie du portillon proposé par Melzack et Wall en 1965. 51
Figure 11 : Dépolarisation afférente primaire (PAD : *Primary Afference Depolarisation*) 52
Figure 12 : Classification morphologique des neurones de la lamina I 55
Figure 13: Morphologie des interneurones des laminae II-III 56
Figure 14 : Profils de décharge des interneurones des laminae II-III et les courants associés en configuration voltage imposé 58
Figure 15 : Différentes sous-populations de neurones inhibiteurs sur la base neurochimique. 61
Figure 16 : Différentes sous-populations de neurones excitateurs identifiées sur la base neurochimique 64
Figure 17 : Microcircuit entre les interneurones inhibiteurs Pvalb et les interneurones excitateurs PKCγ 66
Figure 18 : Rôle des interneurones inhibiteurs NPY^+ et Dyn^+ dans le contrôle de la démangeaison 68
Figure 19 : Voies ascendantes du toucher léger 70
Figure 20 : Synthèse, libération et recapture du GABA 74
Figure 21 : L'expression précoce de NKCC1 et l'expression tardive de KCC2 déterminent les changements développementaux de la $[Cl^-]_i$ 77

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres de mon jury : le Dr. Ingrid Bureau et le Dr. Eric Lingueglia d'avoir accepté d'évaluer et commenter ce manuscrit, ainsi que le Dr. Amaury François, le Pr. Graziella Di Cristo, le Dr. Matilde Cordero-Erausquin, et le Pr. Alexandre Favereaux d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Dr. Andreas Frick de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

J'exprime ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Yves, pour ta confiance et pour l'immense patience dont tu as fait preuve avec mon petit cerf-volant au cours de ces trois années. Merci également pour tous les savoirs et savoirs-faires scientifiques que tu m'as transmis : l'art délicat et subtil du patch-seq, quelle idée ! Merci d'avoir fini par accepter mon absence totale d'amour pour le comportement, tu avais raison au final… j'ai réussi à finir cette thèse sans jamais faire le PPI, je n'en suis pas fière et même désolée mais bon, l'envie de m'y mettre ne m'a jamais percuté. Merci d'avoir toujours pris le temps de rassurer Saint-Thomas et ses nombreux doutes. Merci d'avoir passé tant de temps à corriger avec beaucoup d'attention et de commentaires assassins mes différentes présentations, demandes de financement ou autres rapports tels que ce fameux manuscrit. Avec tout ça, j'espère avoir presque réussi à convaincre le jury que ce qu'on a fait ce n'était pas complètement idiot ! Puisqu'on parle des relectures : un grand merci aussi à Valérie, souvent présente dans ces moments de corrections, pour sa patience et sa bienveillance. Au-delà de la science, merci Yves pour ton accompagnement, ton écoute, tes encouragements et ta présence tout au long de cette aventure.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe Frick qui ont été présents au quotidien et tout au long de cette aventure, Senka, Marie, Jacob, Théo, Mélanie, Nicolas, Sarra. Celien, merci pour ta bonne humeur constante et ta joie de vivre communicative, qui ont apporté une vraie bouffée d'air frais au quotidien du labo. Ourania, merci pour ton soutien, tes conseils et ton aide dans le projet, particulièrement avec le comportement, faire du comportement avec toi c'est faire du comportement comme je l'aime : sans toucher aucune souris. Niki my chocolate sharing partner, always available to share a bueno for the good of the mood, thank you for always checking on me and my beautiful spiking neurons and obviously thank you for all the pranks. Dhurga thank you for being this calm in the storm, but also this storm of laugher, for always bringing this warm atmosphere in the office but also this (literally) cold hand on my shoulder. Paulita, my partner in crime, thank you for teaching me the benefits of a good floor time, for bringing a lot of laughs, gossipitos and good bad bunny music in my setup. Maria, thank you for the laughter, the oversharing, the bad and terrible advices (c'est sympas ça!), thank you my friend for being my number one support since day one in this PhD.

Merci aux personnes qui ont contribué à ce projet : Alexandre Favereaux et Vanessa Rouglan pour la construction des librairies, Isabelle Matias pour le dosage des neurotransmetteurs, l'équipe bioinformatique : Florian Specque, Alexis Groppi et Macha Nikolski pour leurs conseils avisés.

Merci aux zootechniciens et personnels d'animalerie qui se sont occupés avec beaucoup d'attention de nos petites souris. Mention spéciale à Meghane pour sa gentillesse et son aide précieuse, merci d'avoir supporté et accepté mes nombreuses demandes de sortie en retard (pour ma défense midi c'est terrible comme horaire).

Merci à ma première famille au sein de l'institut qui est toujours restée présente : l'équipe Oliet. Mention spéciale à Sarah, merci ma caille pour ton soutien, tes conseils et ta présence rassurante durant ces (presque) 4 dernières années. Merci à Elena de m'avoir toujours poussé à sortir de ma zone de confort avec des petits défis divers et variés.

J'en reviens à Vanessa, merci pour ta présence constante et ton soutien indéfectible tout au long de cette aventure, pour avoir supporté mes innombrables *« je finis bientôt »,* mes sautes d'humeurs (particulièrement pendant la rédaction de ce manuscrit, mais pas que). Merci pour ton écoute, ton énergie positive, tes encouragements et ta presque patience qui m'ont aidé à garder le cap. Merci d'avoir toujours accepté de m'écouter répéter mes présentations… encore et encore, et c'est pas fini, avec un peu de chance le jour de la soutenance tu pourras présenter à ma place (Good job me) !

Merci à mes copains de toujours Axelle, Karine et Romain, Eko & Didou, ainsi que mes copains du master Cassandre, Valentine, Aude, Florian, Hélène, Achille, Lysiane et Juanito pour leur soutien sans faille.

Merci à ma famille et particulièrement mes parents et mon frère pour m'avoir toujours encouragé dans mes études et mes projets.

Merci à tous !

ABBREVIATIONS

[Cl-]i : concentration intracellulaire en ions chlorure
4-AP : 4-aminopyridine
ADI-R : Autism Diagnostic Interview-Revised
ADOS-2 : Autism Diagnostic Observation Schedule-2nd Edition
ARNm : Acide Ribonucléique messager
BKCa : Canaux potassiques de grande conductance activés par le calcium
CCK : Cholecystokinine
CDME : Cornes dorsales de moelle épinière
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide
CN : Cuneate Nucleus
CR : Calrétinine
DCN : Dorsal Column Nuclei
DREADD : Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs
DRG : Dorsal Root Ganglia
DRP : Dorsal Root Potential
DSM-III : Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders – 3rd edition
DSM-V : Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders – 5th edition
Dyn : Dynorphine
E/I : excitation/inhibition
EAAC : Excitatory amino acid carrier
EEG : Electroencéphalogramme
EPSP : Excitatory Post-Synaptic Potential
FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein
GABA : γ-aminobutyric acid
$GABA_A$: récepteur ionotropique au GABA
$GABA_B$: récepteur métabotropique au GABA
GABA-T : GABA transaminase
Gad1 : Glutamate-décarboxylase de type 1
Gad2 : Glutamate-décarboxylase de type 2
GAD65 : Enzyme Glutamate-décarboxylase (codée par Gad2)
GAD67 : Enzyme Glutamate-décarboxylase (codée par Gad1)
Gal : Galanine
GAT : Gaba transporter
GDNF : Glial cell-line derived neurotrophic factor
GlyT2 : Glycine Transporter 2
GN : Gracile Nucleus
GRP : Gastrin releasing peptide
HCN : Canaux activés par l'hyperpolarisation, modulés par les nucléotides cycliques et non sélectifs aux cations
HTMRs : High Threshold Mechanoreceptors
IB4 : Isolectine-B4

mIPSC : Miniature inhibitory postsynaptic currents
sIPSC : Spontaneous inhibitory postsynaptic currents
KCC2 : cotransporteur K^+-Cl^-
LCN : Lateral Cervical Nucleus
LTMRs : Low Threshold Mechanoreceptors
Mrgprd : Mas related G protein coupled receptors
NGF : Nerve Growth Factor
NKB : Neurokinine B
NKCC1 : co-transporteur Na^+-K^+-$2Cl^-$
Nos1 ou **nNos** : Nitric Oxyde Synthase 1 neuronale
NPY : Neuropeptide Y
PA : Potentiel d'Action
PAD : Primary Afferent Depolarisation
PKCγ : enzyme Protein kinase C gamma
PSDC : PostSynaptic Dorsal Column
Pvalb ou **PV** : Parvalbumine
S1 : Cortex somatosensoriel primaire
SCT : SpinoCervical Tract
sEPSC : Spontaneous Excitatory Post-Synaptic Current
SFARI : Simons Foundation Autism Research
SGI : Spinal Gabaergic Interneurones
SST : Somatostatine
Sst2a : Récepteur à la somatostatine
SXF : Syndrome de l'X Fragile
TDAH : Troubles déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
TND : Troubles du Neurodéveloppement
TrkA : Tropomyosin receptor kinase A
TRP : Transient Receptor Potential
TRPA : Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPM : Transient Receptor Potential Melastatin
TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid
TSA : Troubles du Spectre de l'Autisme
UTR : Untranslated region
VGAT : Vesicular GABA transporter
Vglut2 : Vesicular Glutamate Transporter
VIAAT : Vesicular inhibitory amino acid transporter
VPN : Ventral Posterior Nuclear

INTRODUCTION : CHAPITRE I

LES TROUBLES NEURODEVELOPPEMENTAUX

INTRODUCTION

I – Troubles Neurodéveloppementaux

Les « Troubles du Développement » ont été introduits pour la première fois dans la 3e version du « Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders » DSM-III (American Psychiatric Association, 1980), en tant que catégorie comprenant notamment les troubles autistiques. Ce n'est toutefois qu'avec le DSM-V (American Psychiatric Association, 2013) que les Troubles du Neurodéveloppement (TND) ont été définis comme catégorie générale venant remplacer un chapitre intitulé « Troubles généralement diagnostiqués pour la première fois pendant la petite enfance, l'enfance ou l'adolescence » (Morris-Rosendahl and Crocq, 2020).

Avec une prévalence mondiale estimée entre 2 et 4% les TND regroupent un ensemble de troubles hétérogènes affectant le développement cérébral et les fonctions cognitives, incluant le handicap intellectuel, les troubles du spectre de l'autisme (TSA), les troubles déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), les troubles de l'apprentissage et les troubles moteurs (tels que les tics et le syndrome de Gilles de la Tourette) (American Psychiatric Association, 2013; Morris-Rosendahl and Crocq, 2020; Sabariego-Navarro et al., 2022). Les TND apparaissent précocement, souvent avant l'entrée à l'école, et se traduisent par des déficits hétérogènes touchant la communication sociale, l'impulsivité, le langage, le fonctionnement intellectuel, l'attention, le traitement sensoriel, l'apprentissage et le contrôle moteur. Ils entrainent des limitations significatives du fonctionnement personnel, social, scolaire et professionnel (American Psychiatric Association, 2013; Thapar et al., 2017; Ismail and Shapiro, 2019; Bölte et al., 2023), et constituent un enjeu majeur de santé publique en raison de leur coût économique et de leur impact familial (Shahat and Greco, 2021; Schoentgen et al., 2025).

La grande diversité phénotypique et le chevauchement important des caractéristiques cliniques compliquent le diagnostic notamment dans le cas des TSA, souvent confondus avec d'autres TND. A l'inverse, certains syndromes tels que le syndrome de Down (trisomie 21) ou le syndrome de Rett, présentent des phénotypes plus distincts bien que les mécanismes pathogéniques sous-jacents restent encore mal compris (Sabariego-Navarro et al., 2022).

Les TND sont fortement héréditaires (Tick et al., 2016; Faraone and Larsson, 2019) mais leur origine est multifactorielle, impliquant des interactions complexes entre facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. Une disparité marquée selon le sexe est observée, avec une prévalence globalement plus élevée chez les garçons que chez les filles (ratios garçons/filles allant de 1,2:1 à 4:1 selon le trouble) (Bölte et al., 2023). Cette disparité selon le sexe est particulièrement plus prononcée pendant l'enfance, dans l'autisme, les Tic et les TDAH. Elle s'explique en grande partie par un sous-diagnostic et un diagnostic plus tardif chez les filles, souvent liés à des phénotypes plus subtils et à la mise en place de stratégies de

compensation sociale qui masquent partiellement les symptômes (Posserud et al., 2021; Bölte et al., 2023).

De nombreux travaux suggèrent l'existence de mécanismes moléculaires et de voies pathogéniques communes expliquant la diversité des manifestations cliniques (Cristino et al., 2014; Morris-Rosendahl and Crocq, 2020; Parenti et al., 2020). De fait, la co-occurrence entre TND est fréquente : par exemple, 50 à 70 % des enfants autistes présentent des traits TDAH, et environ 13 % des enfants TDAH sont également diagnostiqués autistes (Hours et al., 2022; Ghamdi and AlMusailhi, 2024). La co-occurrence des symptômes accroît le risque d'aggravation des problèmes psychosociaux, et peut également réduire l'efficacité des interventions thérapeutiques pour chacune des conditions (Leitner, 2014). La comorbidité s'étend aussi à d'autres troubles psychiatriques (schizophrénie, dépression, anxiété, troubles de l'humeur…) et somatiques (problèmes infectieux, gastrointestinaux, immunologiques…) renforçant ainsi l'impact global des TND (Lai et al., 2019; Pan and Bölte, 2020; Bölte et al., 2023).

Sur le plan génétique, différents types de mutations ont été associés aux TND tels que les réarrangements chromosomiques, les variations du nombre de copie de gènes, les insertions/délétions (indels) et les mutations ponctuelles. L'établissement de corrélations entre génotype et phénotype reste complexe à établir en raison de la multiplicité des facteurs génétiques et environnementaux qui influencent le phénotype (Parenti et al., 2020). Les gènes impliqués interviennent dans des processus essentiels tels que la régulation transcriptionnelle et épigénétique, le remodelage de la chromatine (Ronan et al., 2013), la signalisation synaptique, le métabolisme des acides aminés ou la synthèse protéique (Parenti et al., 2020). L'essor des technologies de séquençage haut débit a permis d'identifier de très nombreux gènes candidats et de mettre en évidence des réseaux moléculaires convergents, plutôt que des gènes isolés, soulignant la complexité et l'interconnexion des processus impliqués (Sanders, 2019; Moyses-Oliveira et al., 2020; Ramaswami et al., 2020).

En l'absence de traitements ciblant directement les mécanismes pathogéniques, les approches actuelles restent symptomatiques (Ismail and Shapiro, 2019). Ces limites soulignent l'importance de comprendre comment des altérations de circuits neuronaux spécifiques contribuent aux TND. Parmi ceux-ci, les troubles du spectre autistique (TSA) occupent une place centrale, tant par leur prévalence que par leurs manifestations sensorielles et sociales, et feront l'objet de la section suivante.

I.A) Autisme

En 1912, le psychiatre Paul Eugen Bleuler, utilise pour la première fois le terme « autisme » pour décrire le « repli autistique » : un symptôme négatif central de la

schizophrénie (Bleuler, 1912), qui correspond au repli sur lui-même du patient, dans son monde intérieur au détriment du contact avec la réalité extérieure (Park et al., 2016).

Dans les années 1940 Hans Asperger et Leo Kanner emploient ce terme dans un sens nouveau pour décrire des enfants présentant des difficultés de sociabilité, des comportements stéréotypés, des habitudes ancrées, des difficultés à faire face aux changements et des altérations du langage (écholalie …) (Kanner, 1943; Asperger, 1944; Volkmar and McPartland, 2014; Park et al., 2016). Ces descriptions posent les bases cliniques de ce qui sera plus tard reconnu dans le DSM-III, (American Psychiatric Association, 1980) comme un sous-groupe dans la catégorie générale des « troubles envahissants du développement » en tant qu'« autisme infantile ».

En 2013, afin de mieux refléter la diversité clinique observée dans l'autisme, le DSM-V a remplacé la classification distincte des diagnostics (autisme infantile, syndrome d'Asperger, trouble envahissant du développement non spécifié) par le terme générique « Trouble du Spectre de l'Autisme » (TSA) (American Psychiatric Association, 2013). Cette évolution permet de mettre en avant la diversité des profils autistiques et la variabilité des caractéristiques d'une personne à l'autre. Ainsi, les altérations dans la communication sociale et les comportements restreints et répétitifs sont évaluées selon leur degré de sévérité et leur impact fonctionnel, plutôt que sur la base d'un seuil de présence/absence. Cette approche permet de mieux capturer la grande hétérogénéité phénotypique des TSA, d'identifier les formes atypiques ou légères qui pouvaient échapper aux critères diagnostiques antérieurs, et de rendre compte des profils intermédiaires ou mixtes souvent observés en clinique. En d'autres termes, le DSM-V envisage désormais l'autisme comme un continuum de caractéristiques, où chaque individu peut se situer à un certain niveau d'expression des traits autistiques, plutôt que comme un ensemble de catégories cliniques rigides (American Psychiatric Association, 2013; Volkmar and McPartland, 2014; Lord et al., 2020).

Par respect pour les préférences des personnes concernées, nous utiliserons dans le reste de ce manuscrit le terme autisme plutôt que troubles du spectre de l'autisme (TSA) (Bottema-Beutel et al., 2021; Botha et al., 2023).

I.A-1) Caractéristiques cliniques & Diagnostic

Le DSM-V (American Psychiatric Association, 2013) qui constitue la référence dans le domaine du diagnostic des troubles mentaux et psychiatriques, définit désormais l'autisme selon les cinq critères suivants :

1. Déficits persistants de la **communication et des interactions sociales** observés dans des contextes variés (les exemples ci-dessous sont illustratifs et non exhaustifs) :

a. *Déficits de la réciprocité sociale ou émotionnelle tels que, par exemple, des anomalies de l'approche sociale, une incapacité à la conversation bidirectionnelle normale, des difficultés à partager les intérêts, les émotions et les affects, ou encore une incapacité à initier des interactions sociales ou y répondre.*
b. *Déficits des comportements de communication non verbaux utilisés au cours des interactions sociales, tels que, par exemple, une intégration défectueuse entre la communication verbale et non verbale, des anomalies du contact visuel et du langage du corps, des déficits dans la compréhension et l'utilisation des gestes, ou encore une absence totale d'expressions faciales et de communication non verbale.*
c. *Déficits du développement, du maintien et de la compréhension des relations, tels que, par exemple, des difficultés à ajuster le comportement à des contextes sociaux variés, des difficultés à partager des jeux imaginatifs ou à se faire des amis, ou encore l'absence d'intérêt pour les pairs.*

2. Caractère **restreint et répétitif** des comportements, des intérêts ou des activités comme en témoignent au moins deux des éléments suivants soit au cours de la période actuelle soit dans les antécédents (les exemples sont illustratifs et non exhaustifs) :
    a. *Caractère stéréotypé ou répétitif des mouvements, de l'utilisation des objets ou du langage.*
    b. *Intolérance au changement, adhésion inflexible à des routines ou à des modes comportementaux verbaux ou non verbaux ritualisés.*
    c. *Intérêts extrêmement restreints et fixes.*
    d. *Hyper- ou hyporéactivité aux stimulations sensorielles ou intérêt inhabituel pour les aspects sensoriels de l'environnement.*

3. Les symptômes doivent être présents dès les **étapes précoces du développement** (mais ils ne sont pas nécessairement pleinement manifestes avant que les demandes sociales n'excèdent les capacités limitées de la personne, ou ils peuvent être masqués plus tard dans la vie par des stratégies apprises).

4. Les symptômes occasionnent un **retentissement cliniquement significatif** en termes de fonctionnement actuel social, scolaire/professionnel ou dans d'autres domaines importants.

5. Ces troubles ne sont **pas mieux expliqués par un handicap intellectuel** (trouble du développement intellectuel) ou un retard global du développement. La déficience intellectuelle et le trouble du spectre de l'autisme sont fréquemment associés. Pour permettre un diagnostic de comorbidité entre un trouble du spectre de l'autisme et

un handicap intellectuel, l'altération de la communication sociale doit être supérieure à ce qui serait attendu pour le niveau de développement général.

Le diagnostic repose sur une évaluation standardisée et multidisciplinaire combinant l'ADI-R (« Autism Diagnostic Interview-Revised » (Rutter et al., 2003)) et l'ADOS-2 (« Autism Diagnostic Observation Schedule-2nd Edition » (Lord, 2012)) qui permettent respectivement d'explorer l'historique développemental détaillé de l'enfant et d'évaluer son comportement et ses interactions sociales de façon standardisée et dans des contextes semi-structurés. L'ADOS-2 permet à l'évaluateur de mettre en place des tests où l'individu interagit avec des objets/jouets pour évaluer notamment sa capacité à se représenter les émotions de personnages mis en scène ou ses propres émotions, le degré d'imagination, la qualité des ouvertures sociales. Il existe cinq modules adaptés aux différents âges allant du module « Toddler » réservé aux tout-petits enfants de 12 à 30 mois dont le niveau de langage ne dépasse pas les phrases rudimentaires, au module 4 destiné aux adolescents et adultes (à partir de 16 ans) ayant un langage fluide. De ce fait, cette méthode n'est utilisable qu'après que l'enfant ait acquis un certain niveau de parole, ce qui peut souvent retarder le diagnostic (Lord et al., 2020). Une approche multidisciplinaire est dans tous les cas nécessaire pour différencier l'autisme des autres troubles du neurodéveloppement (Hirota and King, 2023).

L'autisme est aussi souvent associé à d'autres troubles neurodéveloppementaux, psychiatriques ou neurobiologiques tels que les TDAH (28%), le handicap intellectuel (23%), l'épilepsie (20%), l'anxiété (20%), la dépression (11%), les troubles obsessionnels compulsifs (9%) les troubles bipolaires (5%), et la schizophrénie (4%) (Havdahl and Bishop, 2019; Lai et al., 2019; Mutluer et al., 2022; Hirota and King, 2023). Des études récentes montrent également que plus de la moitié des personnes autistes ont paradoxalement un quotient intellectuel supérieur ou égal à celui de personnes non autistes (Katusic et al., 2021).

✓ ***FOCUS*** : Altérations sensorielles et dysfonctions tactiles dans l'autisme

Depuis l'introduction du DSM-V, l'hyper- ou l'hyporéactivité sensorielle est reconnue comme un critère diagnostique central de l'autisme (American Psychiatric Association, 2013). Plus de 96% des personnes autistes présentent des particularités dans le traitement des stimuli sensoriels (Tomchek and Dunn, 2007; Crane et al., 2009). Ces altérations touchent différents domaines — auditif, visuel, olfactif, vestibulaire — mais les dysfonctionnements tactiles sont parmi les plus fréquents, rapportés dans plus de 60 % des cas (Tomchek and Dunn, 2007; Marco et al., 2011; American Psychiatric Association, 2013; Puts et al., 2014; Balasco et al., 2020) Chaque individu présente un profil sensoriel unique, combinant hypersensibilités et hyposensibilités selon les modalités et les contextes (Robertson and Baron-Cohen, 2017).

Ces particularités sensorielles et notamment tactiles ont un impact profond sur la vie quotidienne des personnes car elles influencent les compétences sociales rendant difficile l'interprétation des indices sociaux et exacerbant ainsi le retrait social. L'hypersensibilité

sensorielle peut entraîner des réactions intenses et des crises d'anxiété dues à des environnements surchargés, affectant la régulation émotionnelle, les capacités d'adaptation et générant de l'évitement social. Ces difficultés ont des répercussions sur l'attention, la performance cognitive et la gestion des routines quotidiennes rendant les transitions complexes (Robertson and Baron-Cohen, 2017; Amestoy et al., 2025). A l'inverse, l'hyposensibilité peut limiter l'exploration sensorielle et entraver l'apprentissage des interactions sociales (Marco et al., 2012; Thye et al., 2018; Cascio et al., 2019; Zhai et al., 2023). Ces altérations du traitement sensoriel chez les personnes autistes sont visibles dès le début du développement (Rogers et al., 2003; Kern et al., 2006). Elles précèdent les autres caractéristiques de l'autisme (Estes et al., 2015), et permettent également de prédire les difficultés de communication sociale (Turner-Brown et al., 2013), ainsi que les comportements répétitifs, souvent mis en place pour réduire l'inconfort perçu (Boyd et al., 2010). Des études expérimentales montrent en effet qu'une altération du traitement tactile précoce peut suffire à induire des déficits sociaux et émotionnels chez la souris (Orefice et al., 2016; Tasnim et al., 2024). Ainsi, le dysfonctionnement tactile ne constitue pas seulement un symptôme isolé, mais pourrait jouer un rôle causal dans l'émergence des autres dimensions cliniques de l'autisme. Il est donc essentiel d'accorder une attention particulière à l'étude de ces dysfonctions (Robertson and Baron-Cohen, 2017).

I.A-2) Prévalence & Epidémiologie

La prévalence de l'autisme est estimée à environ **1%** de la population mondiale (Zeidan et al., 2022). Il est important de noter que cette estimation a fortement augmenté au cours des trois dernières décennies, principalement en raison de l'évolution des critères diagnostiques et d'une meilleure sensibilisation. Néanmoins, l'augmentation de certains facteurs de risques notamment environnementaux pourraient également y contribuer (pollution, âge parental avancé…) (Park et al., 2016; Lord et al., 2020). Parmi ces 1% il existe une **forte disparité selon le sexe** : les hommes sont diagnostiqués quatre fois plus souvent que les femmes. Ce déséquilibre pourrait en partie refléter un biais de diagnostic, les critères et outils cliniques ayant été largement calibrés sur des populations masculines (Bölte et al., 2023). Ainsi, de nombreuses femmes autistes présentent un retard diagnostic, bien que les premiers signes apparaissent au même âge que chez les hommes (Begeer et al., 2013; Rutherford et al., 2016; Whitlock et al., 2020). Les femmes tendent à mieux compenser sur le plan social, notamment grâce à des stratégies de "camouflage", telles que le mimétisme des comportements sociaux, ce qui leur permet de masquer leurs difficultés et contribue ainsi à leur sous-représentation dans les études (Baron-Cohen et al., 2011; Lai et al., 2015).

Des différences cliniques sont néanmoins observées entre les sexes. Les hommes présentent plus fréquemment des comportements répétitifs moteurs et des intérêts restreints, tandis que les femmes rapportent davantage de compulsions et de comportements

auto-agressifs. En revanche, les deux sexes présentent en moyenne la même intolérance aux changements (Bölte et al., 2023; Stephenson et al., 2023). De plus, plusieurs travaux montrent que les femmes diagnostiquées présentent souvent des symptômes plus sévères que les hommes, suggérant qu'un seuil plus élevé est nécessaire pour que leur autisme soit reconnu (Lai et al., 2015; Duvekot et al., 2017; Whitlock et al., 2020; Stephenson et al., 2023).

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer biologiquement cette différence de prévalence entre homme et femme (Baron-Cohen et al., 2011). De nombreuses études d'amniocentèse ont montré que le niveau prénatal de testostérone fœtale était corrélé à une diminution du contact visuel (Lutchmaya et al., 2002), de l'empathie (Chapman et al., 2006), de la qualité des relations sociales mises en place (Knickmeyer et al., 2005), du vocabulaire (Lutchmaya et al., 2001), et à une augmentation des traits autistiques (Auyeung et al., 2010). La génétique pourrait également jouer un rôle, de nombreux gènes associés à l'autisme étant situés sur le chromosome X (*FMR1, MECP2, NLGN3, NLGN4*). Ainsi, la diploïdie du chromosome X chez la femme constituerait un facteur protecteur alors que l'haploïdie du chromosome Y chez l'homme constituerait une vulnérabilité (Baron-Cohen et al., 2011). Enfin, l'œstrogène pourrait moduler l'expression des gènes de risque et atténuer leurs effets pathogènes, ce qui contribuerait aussi à réduire la vulnérabilité féminine (Willsey et al., 2021; Hirota and King, 2023).

Enfin, des disparités géographiques existent, la prévalence étant influencée non seulement par des facteurs biologiques, mais aussi par les différences de systèmes de santé, de pratiques de dépistage et de reconnaissance culturelle des symptômes (Baxter et al., 2015).

I.A-3) Etiologie

L'autisme est une condition à étiologie **multifactorielle**, résultant d'une interaction complexe entre facteurs **génétiques**, **épigénétiques** et **environnementaux**. Cette combinaison façonne la susceptibilité individuelle, l'expression phénotypique et la sévérité des symptômes (Sauer et al., 2021; Gaona, 2024). L'importance de la composante génétique a été mise en évidence dès les années 1970, avec les premières études de jumeaux (Treffert, 1970). Depuis, de multiples travaux ont confirmé une hérédité élevée, généralement estimée entre 60 et 90 % selon les méthodologies (Lichtenstein et al., 2010; Sandin et al., 2014; Tick et al., 2016; Styles et al., 2020; Genovese and Butler, 2023; Hirota and King, 2023). Loin d'agir isolément, ces facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux s'additionnent et interagissent pour déterminer le risque individuel d'autisme (Sauer et al., 2021; Gaona, 2024).

Facteurs génétiques

Les **formes syndromiques** (environ 5 - 10% des cas) , sont la plupart du temps associées à des anomalies chromosomiques ou des altérations monogéniques qui correspondent à des maladies génétiques rares telles que : la sclérose tubéreuse (associée aux gènes *TSC1* et *TSC2*),

la neurofibromatose (associée au gène *NF1*), le syndrome de Rett (associé au gène *MECP2*), le syndrome de Cowden (associé au gène *PTEN*), le syndrome de dysplasie corticale et d'épilepsie focale (associé au gène *CNTNAP2*), le syndrome Phelan-McDermid (associé au gène *SHANK3*), le syndrome d'Angelman (associé au gène *UBE3A*). La mutation du gène *FMR1* associée au développement du syndrome de l'X fragile est la mutation la plus observée dans l'autisme puisqu'elle représente entre 2% et 6% des cas (Huguet et al., 2013). D'autres mutations rares affectant des gènes synaptiques (*NLGN3, NLGN4X, SHANK1, SHANK2, NRXN1*) ont également été identifiées (***Figure 1***). Chacun de ces syndromes est rare (<1 % des cas), mais collectivement, ils concernent environ 5 à 10% de la population autistique (Huguet et al., 2013; de la Torre-Ubieta et al., 2016). Ces formes syndromiques, mieux définies, constituent des modèles précieux en recherche pour relier gènes, mécanismes et phénotypes.

En revanche, **les formes idiopathiques** (ou non syndromiques), plus fréquentes, sont génétiquement très hétérogènes et n'ont pas de facteur unique identifié (Sauer et al., 2021; Hirota and King, 2023).

Les **mutations de novo**, représentent environ 30 à 40 % des cas d'autisme (Yoon et al., 2021). Ces mutations apparaissent chez l'enfant mais sont complètement absentes chez les parents, elles sont souvent identifiées par séquençage exomique complet et contribuent de manière significative à la pathogenèse de l'autisme (Sanders et al., 2012).

La base de données SFARI (Simons Foundation Autism Research Human Gene Module - SFARI Gene) répertorie plus de 1200 gènes associés à l'autisme classés en 4 catégories par niveau de confiance en fonction de leur force d'association au risque autistique : catégorie S (syndromique), catégorie 1 (haute confiance), catégorie 2 (fort candidat), catégorie 3 (preuve suggestive). De manière générale ces gènes codent pour des protéines impliquées majoritairement dans la **régulation transcriptionnelle et épigénétique**, le **remodelage de la chromatine**, ainsi que la **fonction synaptique** et la **transmission neuronale** (Sanders, 2019; Lord et al., 2020; Sauer et al., 2021; Hirota and King, 2023) (***Figure 1***). Les mutations correspondent à un ensemble de variations de tailles diverses allant d'une seule base ou nucléotide muté, à des segments d'ADN comprenant des milliers à des millions de bases également appelés variations du nombre de copies et souvent partagées avec d'autres troubles neuropsychiatriques (Lichtenstein et al., 2010; Gandal et al., 2018; Lord et al., 2020).

Facteurs environnementaux

Le développement cérébral est un processus coordonné, dynamique et complexe qui se définit notamment par des périodes critiques sensibles aux facteurs environnementaux. Ces facteurs pré-, péri- et postnataux peuvent ainsi avoir un impact sur l'expression génique notamment, en modulant des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, la modification des protéines d'histone etc… (Gaona, 2024).

Les facteurs environnementaux **prénataux** contribuant à augmenter le risque d'autisme sont notamment, un environnement stressant et anxiogène, l'exposition au

valproate, à la pollution, aux pesticides, au zinc, ou aux champs électromagnétiques, mais aussi la consommation d'alcool et de tabac pendant la grossesse ainsi que certains médicaments non recommandés ou substances illicites, et enfin l'âge avancé des parents (Varghese et al., 2017; Lord et al., 2020; Fetit et al., 2021). Les facteurs **périnataux** correspondent à la prématurité du nourrisson, le faible poids de naissance, ainsi que l'asphyxie. Les facteurs **postnataux** incluent les infections virales et maladies auto-immunes ou épisodes d'hypoxie etc… (Park et al., 2016; Modabbernia et al., 2017; Styles et al., 2020; Sauer et al., 2021; Gaona, 2024).

La compréhension de l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux dans la pathogénèse de l'autisme est essentielle pour obtenir des stratégies thérapeutiques optimales (Park et al., 2016).

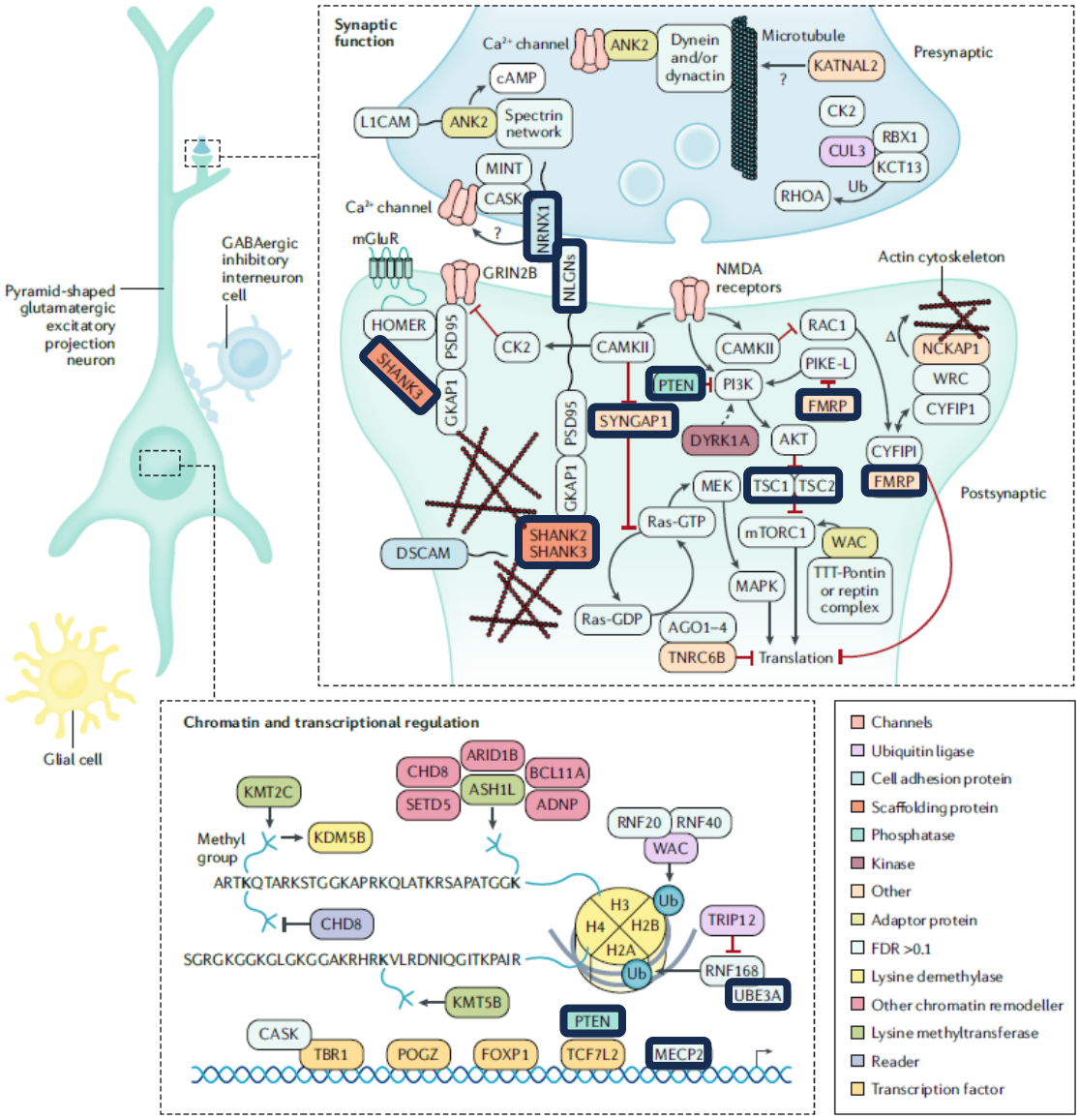


Figure 1 : Schéma illustrant la localisation et le rôle des protéines dont les mutations sont associées à l'autisme

Schéma simplifié des principaux composants cellulaires d'un circuit neuronal mettant en avant un neurone excitateur glutamatergique pyramidale et les protéines connues pour avoir un rôle dans le

développement de l'autisme. Les protéines concernées ont une distribution intracellulaire diversifiée : celles situées au niveau de la synapse jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire, la structuration et la signalisation. Certaines de ces protéines sont localisées dans le noyau et ont démontré de manière générale leur rôle dans le remodelage de la chromatine et la régulation transcriptionnelle suggérant que des altérations de la structure de la chromatine et de l'expression génique pourrait contribuer à l'autisme. Les protéines particulièrement associées à l'autisme sont encadrées en bleu foncé et leurs gènes respectifs sont souvent utilisés pour générer des modèles animaux d'autisme. Adapté d'après Sestan and State, 2018 et Lord et al., 2020

I.A-4) Neurobiologie

Différentes approches, allant des évaluations cliniques à la neuroimagerie en passant par les études post-mortem, ont permis d'identifier de nombreuses différences neurobiologiques dans l'autisme (Pardo and Eberhart, 2007)

Trajectoire du développement cérébral

Plusieurs études ont montré une trajectoire atypique de la croissance cérébrale chez les enfants autistes. À la naissance, la circonférence crânienne et le volume cérébral sont souvent réduits, mais une phase de croissance excessive survient entre 6 et 12 mois, entraînant une macrocéphalie relative chez les jeunes enfants (Courchesne et al., 2003; Bedford et al., 2020; Fetit et al., 2021). Cette croissance s'interrompt ensuite brutalement autour des 4 ans, de sorte qu'à l'adolescence et à l'âge adulte, les volumes cérébraux sont comparables à ceux des sujets neurotypiques (Redcay and Courchesne, 2005; Fetit et al., 2021). Cette dynamique concerne en particulier le lobe frontal, le cervelet et les structures limbiques telles que l'hippocampe et l'amygdale, régions impliquées dans la communication, la socialisation et la régulation émotionnelle (Pardo and Eberhart, 2007).

Anomalies structurelles et connectivité

Les études de neuroimagerie ont mis en évidence des altérations diffuses de la substance grise et de la substance blanche, ainsi qu'une désorganisation des réseaux de connectivité cérébrale (Pardo and Eberhart, 2007). De façon intéressante, dès l'âge de 6 mois, des perturbations de la substance blanche du corps calleux et du cervelet permettent de prédire l'émergence ultérieure de comportements répétitifs à 2 ans (Wolff et al., 2017; Lord et al., 2020). De même, l'analyse de la connectivité fonctionnelle globale à l'âge de 6 mois a permis de prédire un diagnostic d'autisme à l'âge de 2 ans (Emerson et al., 2017). Ces résultats suggèrent que des différences de connectivité apparaissent bien avant l'expression des symptômes cliniques. Les études d'électroencéphalogrammes (EEG) confirment ces observations en révélant une activité accrue en ondes lentes, une diminution des rythmes alpha et une réduction de la synchronisation inter- et intra-hémisphérique, témoignant d'une organisation atypique des oscillations neuronales (Cantor et al., 1986; Lord et al., 2020).

De plus en plus de travaux décrivent les TND comme des troubles de la connectivité cérébrale, impliquant des perturbations dans des réseaux neuronaux notamment au niveau du cortex préfrontal, du striatum, du cervelet ou encore des circuits sociaux (Augustine et al., 2021; Baudou et al., 2022; Ribeiro and Sherrard, 2023).

Organisation cytoarchitecturale

Les études neuropathologiques post-mortem ont confirmé des différences dans l'architecture cérébrale. On retrouve notamment une désorganisation corticale, des altérations du cortex préfrontal et des circuits sociaux, ainsi qu'une réduction marquée du nombre de cellules de Purkinje dans le cervelet (Bailey et al., 1998; Sauer et al., 2021).

Dysfonction synaptique et déséquilibre excitation/inhibition

L'un des constats majeurs est la présence d'une dysfonction synaptique, souvent résumée par l'hypothèse de l'autisme comme synaptopathie. En effet, la majorité des gènes fortement associés à l'autisme codent pour des protéines clés des fonctions synaptiques (Sauer et al., 2021).

Parallèlement, grâce aux études de stimulation magnétique transcrânienne, des altérations de la neurotransmission GABAergique ont pu être démontré chez les personnes autistes appuyant l'hypothèse d'un déséquilibre de la balance excitation/inhibition (E/I) (Masuda et al., 2019; Lord et al., 2020). Des modélisations computationnelles suggèrent qu'un déficit d'inhibition contribue aux différences de perception caractéristiques de l'autisme (Rosenberg et al., 2015). Des perturbations des récepteurs GABA ont été associées avec l'autisme à travers des études génétiques (Ma et al., 2005; Piton et al., 2013; Chen et al., 2014) et histologiques (Fatemi et al., 2009). Des études de spectroscopie à résonnance magnétique ont rapporté des niveaux de GABA réduits dans le cortex visuel et auditif ainsi que le cortex sensorimoteur des individus autistes (Foss-Feig et al., 2013; Robertson et al., 2016; Sapey-Triomphe et al., 2019). Enfin, la forte prévalence d'épilepsie chez les personnes autistes renforce l'idée d'un déséquilibre de la balance E/I (Canitano, 2007; Robertson and Baron-Cohen, 2017).

I.A-5) Approches thérapeutiques

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour l'autisme. Les approches actuelles visent plutôt à soutenir le développement, à réduire les difficultés associées et à améliorer la qualité de vie des personnes concernées et de leur entourage.

Les approches thérapeutiques actuelles se concentrent principalement sur des interventions comportementales et psycho-éducatives. Parmi elles, « l'Applied Behavior Analysis », les approches développementales comme le modèle Denver, ou encore les interventions centrées sur la communication sociale ont montré une efficacité variable selon

les profils individuels (Lord et al., 2020; Lordan et al., 2021). Lorsqu'elles sont mises en place de façon précoce et intensive, ces approches peuvent améliorer les compétences adaptatives, le langage et la socialisation.

Sur le plan pharmacologique, seules deux molécules antipsychotiques sont actuellement approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour certains symptômes associés à l'autisme : le risperidone, utilisé pour réduire les comportements agressifs et répétitifs ainsi que l'aripiprazole efficace pour diminuer l'irritabilité (de la Torre-Ubieta et al., 2016; Hirota and King, 2023). D'autres médicaments peuvent être prescrits en cas de comorbidités tels que la mélatonine pour les troubles du sommeil et les insomnies, les antidépresseurs (inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine) pour les troubles obsessionnels compulsifs ainsi que les épisode dépressifs (Lordan et al., 2021). Les antiépileptiques comme l'acide valproïque sont prescrits en cas d'épilepsie ou de troubles bipolaires, et des psychostimulants tels que la méthylphénidate, l'atomoxétine ou la guanfacine sont utilisés pour les symptômes de TDAH fréquemment associés (Lord et al., 2020).

⇨ Si la majorité des cas d'autisme sont considérés comme idiopathiques, environ 5 à 10 % s'inscrivent dans le cadre de formes syndromiques associées à des mutations génétiques identifiées (Sauer et al., 2021). Parmi celles-ci, le **syndrome de l'X fragile (SXF)** occupe une place centrale puisqu'il constitue la première cause monogénique de déficience intellectuelle et une des principales causes génétiques identifiées d'autisme (Penagarikano et al., 2007; Hagerman et al., 2017).

I.B) Syndrome de l'X fragile

Le syndrome de l'X fragile (SXF) a été décrit pour la première fois en 1943 par Martin et Bell, à partir de l'observation d'une famille dans laquelle 11 hommes présentaient une déficience intellectuelle transmise par des mères cliniquement "saines", suggérant une hérédité liée au chromosome X. Ils ont également observé que certaines femmes de la lignée étaient plus légèrement touchées (Martin and Bell, 1943). En 1969, Lubs a observé, chez plusieurs membres d'une autre famille atteints de retard mental, une constriction secondaire sur le bras long du chromosome X, devenant un marqueur cytogénétique caractéristique (Lubs, 1969). Plus tard, Sutherland et Richards ont confirmé que les cas décrits par Martin et Bell correspondaient bien au SXF, établissant définitivement ce syndrome comme une entité nosologique distincte (Penagarikano et al., 2007). Aujourd'hui, le SXF est reconnu comme la cause monogénique la plus fréquente de déficience intellectuelle et une **cause majeure d'autisme syndromique** (Gholizadeh et al., 2015).

I.B-1) Caractéristiques cliniques & Diagnostic

Le signe clinique majeur du SXF est la déficience intellectuelle avec des valeurs de quotient intellectuel allant généralement de 20 à 70 (Penagarikano et al., 2007). Ces enfants présentent aussi un retard de langage, de l'hyperactivité, de l'anxiété et des altérations sensorielles qui apparaissent généralement au cours de la deuxième année de vie (Hagerman et al., 2017). Sur le plan comportemental, plus de 90 % des hommes porteurs du SXF présentent des caractéristiques autistiques (stéréotypies, évitement du contact visuel, difficultés sociales, altérations sensorielles…), et jusqu'à 60 % remplissent les critères diagnostiques complets de l'autisme, confirmant l'importance de ce syndrome comme modèle génétique majeur de l'autisme (McDuffie et al., 2015; Hagerman et al., 2017; Kaufmann et al., 2017; Niu et al., 2017).

Sur le plan physique, les individus concernés présentent des caractéristiques morphologiques spécifiques telles qu'un visage allongé, des oreilles décollées, un front et une mâchoire proéminentes, un palais ogival, une hypotonie, une peau douce et un macroorchidisme qui se développe à la puberté (Penagarikano et al., 2007; Heulens et al., 2013; Kidd et al., 2014; Hagerman et al., 2017). D'autres signes incluent une hyperlaxité articulaire (pouces doublement articulés, doigts hyperextensibles), des pieds plats, ainsi que des hernies ou luxations, reflétant des altérations du tissu conjonctif liées notamment à des défauts dans les fibres d'élastine (Waldstein et al., 1987; Hagerman et al., 2017).

La sévérité du phénotype est hautement variable selon le sexe, l'âge, l'influence de l'environnement, le fond génétique et les facteurs moléculaires tels que le mosaïsme ou le degré de méthylation du gène *FMR1*, qui modulent l'expression de la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) (Hagerman et al., 2017). Le niveau de FMRP corrèle directement avec la sévérité clinique : les femmes sont en moyenne moins sévèrement atteintes que les hommes, puisque le gène *FMR1* non muté, présent sur le deuxième chromosome X produit la FMRP (Tassone et al., 1999). Cependant, les rares cas rapportés de femmes homozygotes pour la mutation complète présentent un phénotype comparable à celui des hommes (Hagerman et al., 2017).

On note également certaines comorbidités fréquemment associées au SXF, telles que l'épilepsie (présente chez 10–20 % des personnes), les troubles gastro-intestinaux et les otites moyennes récurrentes (Kidd et al., 2014; Hagerman et al., 2017).

I.B-2) Etiologie

Le SXF est principalement causé par la **répétition du trinucléotide *CGG*** dans la région promotrice 5'untranslated region (UTR) du gène *FMR1*, situé sur le chromosome X (Xq27.3). Lorsque le nombre de répétitions excède 200 (mutation complète), la région est hyperméthylée, entraînant l'extinction transcriptionnelle du gène et l'absence ou la déficience

de protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) (***Figure 2***) (Hagerman et al., 2017). Cette protéine, ubiquitaire mais particulièrement abondante dans le cerveau et les testicules (Devys et al., 1993), se lie aux ARNm et régule leur traduction locale au niveau synaptique. Ces ARNm jouent un rôle crucial dans le développement, la maturation, la maintenance et la plasticité des connexions synaptiques (Darnell et al., 2011).

Les individus présentant entre 55 et 200 répétitions sont porteurs d'une prémutation, qui n'entraîne pas un déficit de FMRP mais au contraire un excès de transcription de *FMR1*. Cette prémutation est associée à des syndromes spécifiques tels que le FXTAS (Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome) et l'insuffisance ovarienne primaire (Hagerman et al., 2017).

Certaines personnes présentent un mosaïcisme génétique, de la longueur des répétitions CGG, c'est-à-dire que certaines cellules contiennent des allèles mutés totalement et d'autres contiennent des allèles prémutés. D'autres individus présentent un mosaïcisme épigénétique (de méthylation), c'est-à-dire que certaines cellules vont contenir des allèles FMR1 méthylés et d'autres des allèles *FMR1* non-méthylés. Ces deux types de mosaïcisme permettent une production partielle de FMRP et s'accompagnent en général de symptômes cognitifs et comportementaux moins sévères que ceux qui présentent une mutation complète, chez lesquels la FMRP est absente (Hagerman et al., 2017).

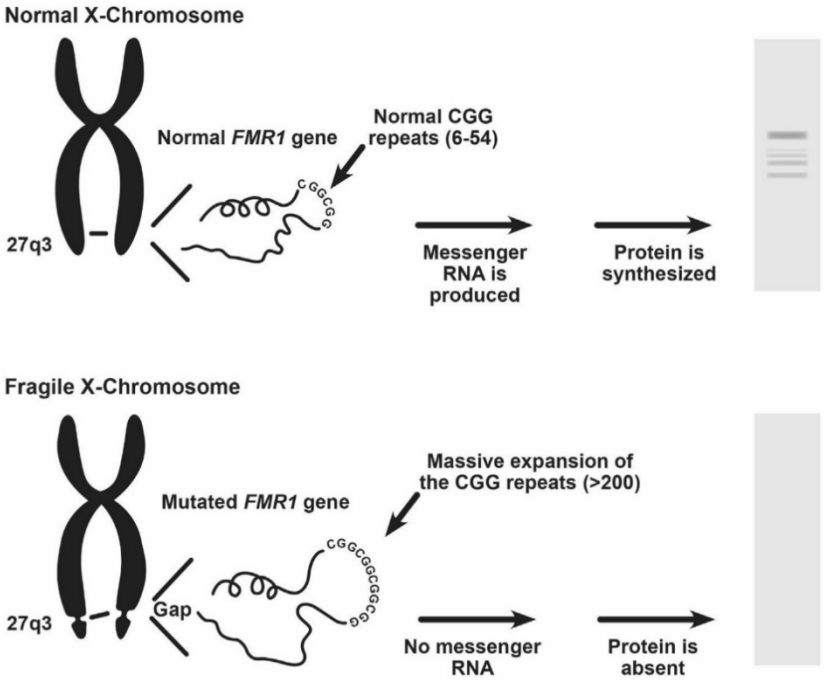


Figure 2 : Schéma récapitulant les effets de l'expansion de la répétition du trinucléotide CGG dans le chromosome X fragile.

L'expansion de la répétition CGG dans la région 5'-UTR du gène *FRM1*, en position 27q3 du chromosome X entraine la diminution drastique ou absence de production de l'ARNm et donc in fine de la protéine FMRP. Adaptée de Lyons et al., 2015.

Le diagnostic du SXF repose sur une évaluation clinique et un test moléculaire du gène *FMR1*, combinant PCR et analyse par Southern blot sur échantillons sanguins, permettant de déterminer le nombre de répétitions CGG et leur état de méthylation (Hagerman et al., 2017).

I.B-3) Epidémiologie / Prévalence

La prévalence de la mutation complète du SXF est estimée à **environ 1 sur 7 000 hommes et 1 sur 11 000 femmes**. La prémutation est en revanche beaucoup plus fréquente, retrouvée chez 1 sur 130–250 femmes et chez 1 sur 250–800 hommes (Stone et al., 2025). La pénétrance incomplète du SXF est liée à l'instabilité de la répétition *CGG* dans le gène *FMR1*. Le nombre de répétitions détermine l'état de prémutation (55–200 répétitions) ou de mutation complète (>200). Les hommes porteurs d'une mutation complète sont généralement affectés, tandis que certains porteurs d'une prémutation peuvent rester asymptomatiques. Chez les femmes, la sévérité des manifestations dépend à la fois du nombre de répétitions et du biais d'inactivation du chromosome X (c'est-à-dire du degré selon lequel l'un ou l'autre des chromosomes X est préférentiellement inactivé) (Penagarikano et al., 2007).

I.B-4) Neurobiologie

Altérations morphologiques et structurales

Les études de neuroimagerie chez les individus présentant un SXF ont permis de révéler des différences morphologiques marquées par rapport aux sujets témoins. Certaines particularités, comme l'hypertrophie cérébrale (Hazlett et al., 2012), et l'augmentation du volume des ventricules latéraux (Reiss et al., 1995; Eliez, 2001), sont également retrouvées dans d'autres TND tels que l'autisme (Hagerman et al., 2017). Le cervelet présente aussi des différences, avec notamment une hypoplasie du vermis cérébelleux (Mostofsky et al., 1998), une réduction globale de la taille, ainsi que des altérations des pédoncules cérébelleux (Hagerman et al., 2017). Parmi les observations les plus spécifiques au SXF, l'hypertrophie du noyau caudé est particulièrement marquée, en particulier chez les hommes (Reiss et al., 1995; Eliez, 2001; Gothelf et al., 2008; Hoeft et al., 2008; Hazlett et al., 2012). Cette hypertrophie apparaît précocement au cours du développement et a été corrélée à la sévérité des comportements répétitifs caractéristiques, partagés avec l'autisme (Hazlett et al., 2012). L'hippocampe est également hypertrophié chez les jeunes individus concernés (Reiss et al., 1994) mais cette différence tend à disparaître avec l'âge. D'autres altérations incluent un élargissement du gyrus fusiforme (Hoeft et al., 2008) ainsi qu'une réduction du volume de l'insula et de l'amygdale (Hazlett et al., 2012).

Dysfonctions GABAergiques et déséquilibre E/I

Tout comme dans l'autisme, la contribution des altérations du système GABAergique dans le déséquilibre de la balance E/I semble jouer un rôle tout aussi central dans le SXF. De nombreuses altérations dans la signalisation GABAergique ont été détectées dans le cerveau de souris *Fmr1*$^{-/y}$ avec notamment une diminution de l'expression de plusieurs sous-unités de récepteurs GABA ainsi qu'une diminution de la signalisation GABAergique globale (D'Hulst et al., 2006; Gantois et al., 2006). De plus, des enregistrements électrophysiologiques montrent un déficit de la transmission médiée par les récepteurs $GABA_A$ (Gibson et al., 2008; Curia et al., 2009; Sabanov et al., 2017), ainsi qu'un retard dans le switch développemental du GABA d'excitateur à inhibiteur (He et al., 2014a).

Chez les personnes concernées, des études d'EEG révèlent une hyperexcitabilité corticale, illustrée par des potentiels centro-temporaux, un ralentissement du rythme de fond et des décharges épileptiformes multifocales (Deng and Klyachko, 2021). L'expression réduite des récepteurs $GABA_A$ est également retrouvée chez ces personnes (D'Hulst et al., 2015).

Canalopathies et rôle de la protéine FMRP

Une grande partie de ces altérations d'excitabilité peut être attribuée à la perte de la protéine FMRP, qui régule directement l'activité de nombreux canaux ioniques à travers différents compartiments neuronaux (listés et décrits dans Deng and Klyachko, 2021). En particulier, plusieurs travaux sur le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$ ont notamment montré des altérations des canaux potassiques de grande conductance activés par le calcium (BKCa) (Deng et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Kshatri et al., 2020), des canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides cycliques (HCN) (Zhang et al., 2014), ainsi que des canaux potassiques de petite conductance (SK) (Deng et al., 2019; Brandalise et al., 2020). L'absence de FMRP entraîne ainsi des altérations de l'initiation du potentiel d'action (PA), du profil de décharge des PA, de la libération de neurotransmetteurs et des fonctions dendritiques, perturbant profondément l'équilibre excitation/inhibition et la plasticité synaptique (Deng and Klyachko, 2021) (***Figure 3***).

I.B-5) Approches thérapeutiques

La prise en charge des enfants porteurs du SXF est **multidisciplinaire** et repose sur une collaboration entre médecins, thérapeutes et famille tout au long de la vie. Les approches incluent généralement des thérapies précoces de la parole et du langage, des thérapies physiques et occupationnelles, souvent intégrées dans une approche sensorielle visant à améliorer la motricité fine, la régulation sensorielle et l'autonomie (Hagerman et al., 2017). En cas de diagnostic conjoint avec l'autisme, généralement posé autour de l'âge de 2 ans, des approches validées comme le ESDM (déjà cité plus haut dans la section *I.A-5) Approches thérapeutiques de l'autisme*) peuvent être mises en place. Tout comme pour l'autisme, il

n'existe à ce jour aucun traitement curatif du SXF. Les approches pharmacologiques disponibles visent essentiellement à réduire les difficultés associées et à prendre en charge les symptômes comorbides, afin d'améliorer la qualité de vie des personnes concernées et de leur entourage (Hagerman et al., 2017).

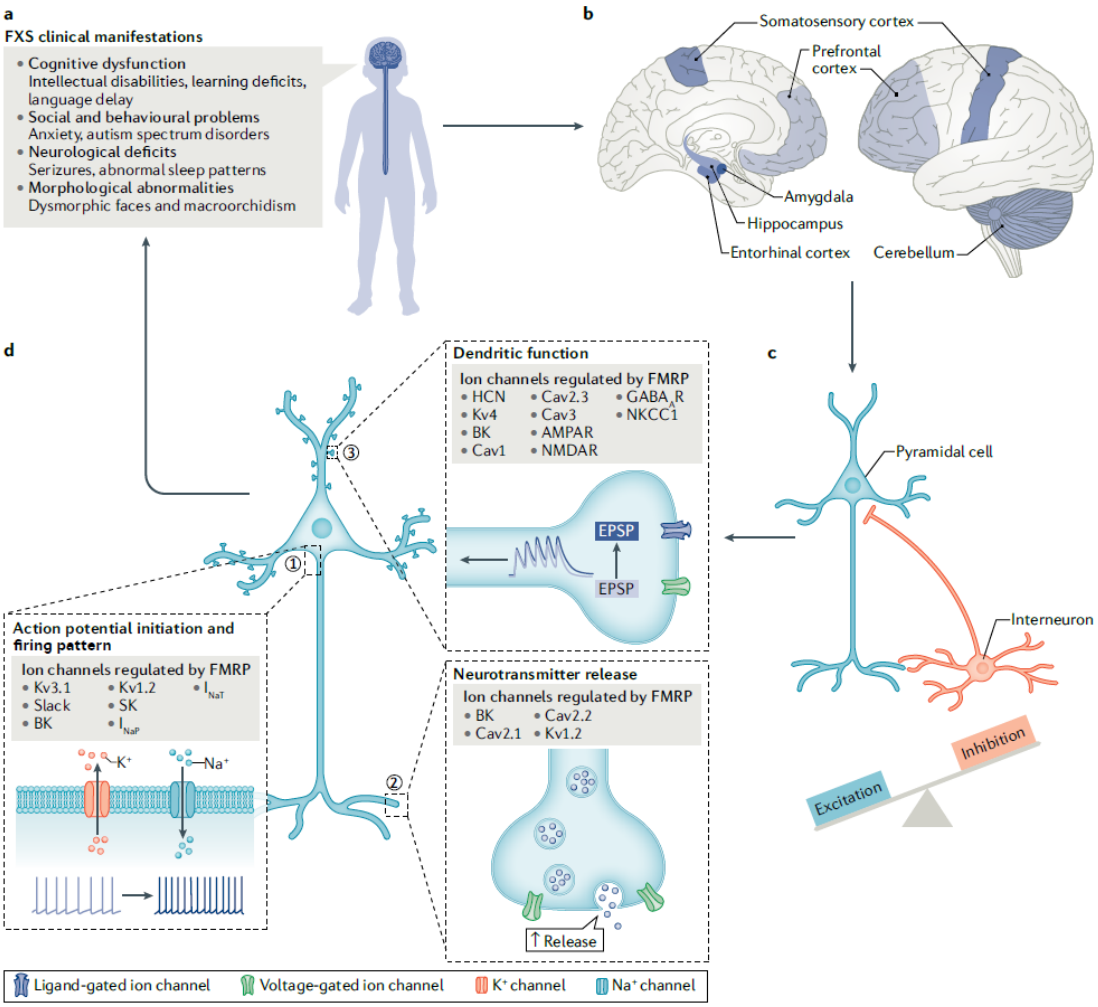


Figure 3 : Vue globale des canalopathies liées au SXF et leurs conséquences biologiques et comportementales.

(**a**) Les manifestations cliniques du SXF sont complexes et très variables en fonction des individus mais la plupart des personnes concernées expriment les traits cités sur ce panneau. (**b**) Les régions cérébrales affectées par le SXF apparaissent en bleu foncé sur une vue médiale (à gauche) et latérale (droite). (**c**) Schéma représentant le déséquilibre de la balance E/I. (**d**) Les altérations d'hyperexcitabilité observées dans le SXF peuvent être attribuées à des altérations fonctionnelles causées par la perte de la protéine FMRP régulant directement l'activité de nombreux canaux ioniques. Les canaux ioniques en question jouent un rôle important dans le déclenchement et la transmission du PA, la libération de neurotransmetteurs et/ou la fonction dendritique, qui peuvent être à l'origine de divers phénotypes du SXF présentés dans le panneau (a). D'après Deng and Klyachko, 2021.

I.C) Modèles expérimentaux de l'autisme : Focus sur le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$

L'hétérogénéité clinique et biologique de l'autisme rend indispensable le recours à des modèles animaux pour explorer les mécanismes pathogéniques et tester de nouvelles approches thérapeutiques. Bien qu'aucun modèle ne puisse reproduire l'ensemble des symptômes humains, les modèles murins constituent un outil privilégié pour relier les altérations moléculaires, synaptiques, cellulaires ou neurobiologiques à des phénotypes comportementaux pertinents (Möhrle et al., 2020). Plusieurs types de modèles ont été développés : des modèles génétiques basés majoritairement sur des approches de knockout de façon à inactiver le gène d'intérêt. Ces approches ciblent des gènes fortement associés à l'autisme tels que *Shank3*, *Cntnap2*, *Nlgn3 et 4*, *Mecp2* ou *Fmr1* ; mais il existe aussi des modèles environnementaux, comme l'exposition prénatale au valproate ou aux infections maternelles ou au stress (Das et al., 2019); et des modèles combinés intégrant facteurs génétiques et environnementaux. La validité de ces approches repose principalement sur la reproduction de traits caractéristiques de l'autisme, tels que les déficits dans les interactions sociales, la présence de comportements stéréotypés et répétitifs, des altérations sensorielles ou certaines comorbidités associées (Möhrle et al., 2020).

Parmi ces différents modèles, la délétion du gène *Fmr1* (*Fmr1*$^{-/y}$), qui reproduit le SXF, représente l'un des modèles les plus robustes et les plus utilisés. En effet, comme en témoigne son niveau de confiance élevé dans la base de données SFARI, le SXF est la cause monogénique la plus fréquente d'autisme, représentant environ 2 à 6 % des cas (Hagerman et al., 2017). Ce modèle présente donc une forte validité étiologique et translationnelle, en reproduisant chez la souris la perte de fonction du gène *FMR1* observée dans le SXF humain. Le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$ constitue ainsi un outil de choix pour étudier les liens entre altérations neuronales et phénotypes comportementaux associés à l'autisme. C'est pourquoi nous concentrerons la suite de ce manuscrit sur ce modèle.

I.C-1) Mécanismes

Le première génération de souris *Fmr1*$^{-/y}$ a été générée par interruption de l'exon 5 du gène *Fmr1* à l'aide d'une cassette de sélection (Consorthium et al., 1994). Bien que ces lignées aient permis les premières avancées majeures sur le rôle de la protéine FMRP, elles présentaient un inconvénient méthodologique important : le promoteur du gène Fmr1 restait intact induisant une transcription aberrante et produisant des espèces d'ARN anormaux (Yan et al., 2004), malgré l'absence de protéine FMRP détectable. Il existait donc un risque que ces ARN aberrants interfèrent avec d'autres voies cellulaires et contribuent aux phénotypes observés, qui n'auraient alors pas été exclusivement imputables à l'absence de FMRP mais en partie à des effets parasites liés à ces transcrits anormaux. Afin, de lever les doutes persistants sur la nature du knockout, Mientjes et al., 2006 ont développé une deuxième génération de

souris *Fmr1*$^{-/y}$ en flanquant le promoteur du gène *Fmr1* en plus de son exon 1 avec des sites loxP. La recombinaison Cre entraine ainsi la suppression du promoteur du gène *Fmr1* et empêche totalement la transcription d'ARNm, abolissant par conséquent toute production de FMRP. Cette deuxième génération constitue aujourd'hui le modèle de référence le plus utilisé dans la recherche préclinique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons utilisé cette deuxième génération de souris *Fmr1*$^{-/y}$ plus pertinente et robuste pour l'étude des mécanismes physiopathologiques du syndrome de l'X fragile et de l'autisme.

I.C-2) Comportement

Phénotypes sociaux

Les souris *Fmr1*$^{-/y}$ présentent des déficits sociaux notamment dans le test des trois chambres dans lequel, elles passent moins de temps avec une souris nouvelle qu'avec une souris familière ce qui suggère un déficit de nouveauté sociale (Mines et al., 2010; Hébert et al., 2014). En revanche, la préférence pour une souris par rapport à un objet varie selon les études : certaines rapportent une préférence pour la souris (tout comme les souris WT contrôles) (Mines et al., 2010; Pietropaolo et al., 2011), alors que d'autres décrivent une absence de préférence (McNaughton et al., 2008) ou une préférence pour l'objet (sociabilité réduite) (Dahlhaus and El-Husseini, 2010; Martin et al., 2022). Ces différences de résultat semblent être liés au fond génétique et aux protocoles expérimentaux (Pietropaolo et al., 2011; Spencer et al., 2011). En parallèle, plusieurs études montrent une diminution des comportements affiliatifs et de l'exploration sociale spontanée (Pietropaolo et al., 2011; Hébert et al., 2014; Ferraguto et al., 2024) ce qui reflète les déficits de sociabilité caractéristiques de l'autisme.

Comportements répétitifs et stéréotypés

Les résultats concernant les comportements répétitifs sont également variables. Certaines études rapportent des comportements répétitifs accrus chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$ mesurés sur le temps d'auto-toilettage et le test d'enfouissement des billes (Pietropaolo et al., 2011; Gholizadeh et al., 2015; Bausch et al., 2018; Ferraguto et al., 2024), alors que d'autres ne retrouvent pas de différence significative (Thomas et al., 2012). Ces variations dépendent notamment du fond génétique (Spencer et al., 2011), par exemple les souris *Fmr1*$^{-/y}$-C57BL/6 passent plus de temps à s'auto-toiletter par rapport à leur frères de portée WT ce qui n'est pas le cas des souris *Fmr1*$^{-/y}$-FVB (Pietropaolo et al., 2011).

Altérations sensorielles

Au niveau auditif, les souris *Fmr1*$^{-/y}$ présentent une réponse réduite aux stimuli acoustiques de forte intensité dans le test du sursaut (Pietropaolo et al., 2011; Spencer et al., 2011), suggérant une hyposensibilité auditive.

Les souris *Fmr1*$^{-/y}$ expriment aussi des déficits de discrimination visuels (Goel et al., 2018).

Concernant le toucher, la plupart des études rapportent une hyperréactivité aux stimuli tactile léger notamment sur la peau poilue (Orefice et al., 2016; Tasnim et al., 2024), ainsi qu'une réactivité exagérée (évitement par tentative de fuite) face à une stimulation tactile légère des vibrisses (He et al., 2017; Kourdougli et al., 2023). Ces souris présentent également des déficits de discrimination de texture (Orefice et al., 2016), suggérant une altération dans l'intégration et le traitement de l'information tactile complexe. A l'inverse, une étude récente de notre laboratoire dénote une hyposensibilité tactile sur la peau glabre des pattes avant des souris *Fmr1*$^{-/y}$ qui se traduit par un seuil de détection plus élevé (Semelidou et al., 2024).

Pour la douleur, les résultats sont à nouveaux contradictoires. Certaines études décrivent des seuils mécaniques inchangés en condition basale (sur le test de von frey) (Price et al., 2007; Ramírez-López et al., 2021), tandis que d'autres rapportent une hypersensibilité mécanique (Martin et al., 2022). En condition neuropathique, après une lésion nerveuse, les souris *Fmr1*$^{-/y}$ expriment une allodynie mécanique moins importante que chez les souris WT neuropathiques (Ramírez-López et al., 2021). En ce qui concerne la sensibilité à la chaleur par exemple, les souris *Fmr1*$^{-/y}$ en condition basale ne présentent généralement pas de différence d'hyperalgésie par rapport aux WT (Zhao et al., 2005; Ramírez-López et al., 2021; Martin et al., 2022), et l'hyperalgésie thermique neuropathique induite suite à la lésion nerveuse est de moindre importance chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$ par rapport à leur congénères WT (Ramírez-López et al., 2021). Les résultats obtenus en douleur neuropathiques sont similaires à ceux obtenus en douleur inflammatoire chronique (Martin et al., 2022). Enfin, en ce qui concerne la douleur induite chimiquement (par injection de capsaïcine), les souris *Fmr1*$^{-/y}$ y sont moins réactives (Martin et al., 2022).

Globalement, ce profil paradoxal — hyperréactivité dans certains contextes, hyporéactivité dans d'autres — illustre bien la diversité et l'hétérogénéité interindividuelle des troubles sensoriels décrits chez les personnes autistes.

Anxiété réduite et hyperactivité

Le profil anxieux des souris *Fmr1*$^{-/y}$ est également controversé (Kazdoba et al., 2014). Plusieurs travaux rapportent une anxiété réduite caractérisée par une exploration accrue des bras ouverts dans le labyrinthe en croix surélevé, ainsi que dans le centre d'une arène ouverte (open field) (Spencer et al., 2011; Hébert et al., 2014; Carreno-Munoz et al., 2018; Saré et al., 2019; McCarthy et al., 2024). D'autres études décrivent une anxiété augmentée ou des

résultats variables selon le fond génétique et l'âge des souris (Bilousova et al., 2009; Spencer et al., 2011).

Ces souris présentent également une hyperactivité mesuré par une distance parcourue plus élevé dans le test de l'arène ouverte (Saré et al., 2019; Ferraguto et al., 2024).

Déficits cognitifs et apprentissages

Les souris *Fmr1*$^{-/y}$ montrent des altérations dans plusieurs paradigmes d'apprentissage et de mémoire : déficits d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial (Mineur et al., 2002) et le labyrinthe en Y (Hébert et al., 2014), ainsi qu'une mémoire altérée dans le conditionnement de peur (Hébert et al., 2014). Ces résultats reflètent la présence de troubles cognitifs similaires à ceux observés dans le syndrome de l'X fragile et dans certains profils autistiques.

La majorité des études utilisant ce modèle murin ont été réalisés chez les souris mâles, en raison de la simplicité d'interprétation liée à l'hémizygotie du gène *Fmr1*. Les études portant sur les femelles sont plus rares, mais font l'objet d'un intérêt croissant, mettant en évidence des phénotypes comportementaux globalement similaires à ceux observés chez les mâles, tels que des déficits dans la nouveauté sociale, de l'hyperactivité, et des réponses atypiques aux stimuli sensoriels (Ding et al., 2014; Gauducheau et al., 2017; McCarthy et al., 2024).

I.C-3) Altérations neurobiologiques sous-jacentes aux altérations de sensibilité tactile

Comme mentionné précédemment dans la partie *« I-A.1) Autisme – Focus sur les altérations sensorielles et les dysfonctions tactiles »* : plusieurs études expérimentales ont montré qu'une altération précoce du traitement tactile peut suffire à induire des déficits sociaux et émotionnels chez la souris (Orefice et al., 2016; Tasnim et al., 2024). Ainsi, le dysfonctionnement tactile pourrait donc jouer un rôle causal dans l'émergence des autres dimensions cliniques de l'autisme. C'est pourquoi le sujet de cette thèse est consacré spécifiquement à l'étude de ces dysfonctions tactiles dans l'autisme et plus particulièrement dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$.

Pour explorer ces altérations au niveau neurobiologiques différentes approches ont été utilisées, incluant l'électrophysiologie (Zhang et al., 2014), l'imagerie biphotonique *in vivo* (He et al., 2017; Kourdougli et al., 2023; Semelidou et al., 2024), ainsi que l'imagerie optique de signaux intrinsèques (Arnett et al., 2014) en se concentrant sur le cortex somatosensoriel primaire (S1). Ces travaux montrent de façon convergente une hyperactivité corticale, avec des réponses neuronales amplifiées dans les couches L2/L3 après stimulation des vibrisses ou

de la peau glabre des pattes (Arnett et al., 2014; Zhang et al., 2014; Bhaskaran et al., 2023), une variabilité accrue des réponses d'un essai à l'autre (Bhaskaran et al., 2023) et une activité inter-stimuli élevée (Juczewski et al., 2016). Une activité spontanée anormalement élevée des neurones pyramidaux S1 L2/L3 a également été décrite (Bhaskaran et al., 2023; Falcão et al., 2024).

Au-delà de cette hyperactivité une augmentation de l'excitabilité intrinsèque dans les neurones pyramidaux des couches L5B du S1 ont également été révélé, impliquant des dysfonctions des canaux HCN et BKCa (Zhang et al., 2014). De façon intéressante, l'activation pharmacologique des canaux BKCa avec l'agoniste sélectif BMS-191011 restaure l'excitabilité neuronale, normalise l'activité spontanée et corrige les réponses à la stimulation tactile (Zhang et al., 2014; Bhaskaran et al., 2023). Dans une autre étude, l'activation des BKCa par le composé BMS-204352 a permis de corriger l'hyposensibilité tactile observée sur la peau glabre des pattes avant (Semelidou et al., 2024) en restaurant le recrutement neuronal, la balance E/I et le ratio cortical signal/bruit. Ces résultats confirment le rôle central des canaux BKCa dans les altérations du traitement tactile chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$. Par ailleurs, la suractivation génétique des canaux BKCa a également permis de secourir des anomalies synaptiques hippocampiques, incluant l'élargissement du potentiel d'action, l'excès de libération de glutamate et l'activité épileptiforme (Deng and Klyachko, 2016), soulignant la robustesse de cette piste thérapeutique.

Sur le plan des circuits inhibiteurs, plusieurs études montrent que les interneurones parvalbumine (Pvalb) du S1 présentent une activité spontanée réduite et des réponses évoquées plus faibles à la stimulation des vibrisses, contrairement aux interneurones somatostatine (SST) (Kourdougli et al., 2023). Ces altérations s'accompagnent d'une réduction drastique de la densité des cellules Pvalb-positives (Pvalb^{+}) dans l'ensemble des couches corticales, suggérant une vulnérabilité particulière de cette population (Falcão et al., 2024).

⇨ Si le cortex somatosensoriel a fait l'objet de nombreux travaux dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$, le tout premier niveau d'intégration de l'information tactile, situé dans la corne dorsale de la moelle épinière, reste largement inexploré. Comprendre comment ce relais spinal est altéré apparaît désormais crucial pour éclairer l'origine des troubles sensoriels dans l'autisme et le syndrome de l'X fragile.

INTRODUCTION : CHAPITRE II

TRANSMISSION ET TRAITEMENT DE L'INFORMATION TACTILE

II – Transmission et traitement de l'information tactile

Pour comprendre les altérations tactiles décrites dans l'autisme, il est nécessaire de remonter à la source : les voies qui transmettent et intègrent les signaux sensoriels. Le système somatosensoriel est capable de décoder une large variété de stimuli tactile cutanés nous conférant une capacité remarquable de reconnaissance des objets, de discrimination des textures, de rétroaction sensorimotrice et d'interactions sociales. Pour cela, l'information tactile est tout d'abord détectée en périphérie au niveau de la peau, par des **neurones sensoriels primaires** (aussi nommés afférences primaires) dont le corps cellulaire est situé dans les **ganglions rachidiens dorsaux** (DRG : *Dorsal Root Ganglia*) pour le corps ou le ganglion trigéminal pour la face. Ces neurones transmettent ensuite l'information au système nerveux central, au niveau des **cornes dorsales de la moelle épinière** qui, grâce à leur grand réseau d'interneurones constituent le **premier niveau de traitement de l'information**. De là, l'information est relayée vers les structures cérébrales d'ordre supérieur, notamment le **thalamus** puis le **cortex somatosensoriel primaire S1**, où elle est intégrée à des niveaux perceptifs plus complexes (***Figure 4***) (Abraira and Ginty, 2013; Prescott et al., 2014).

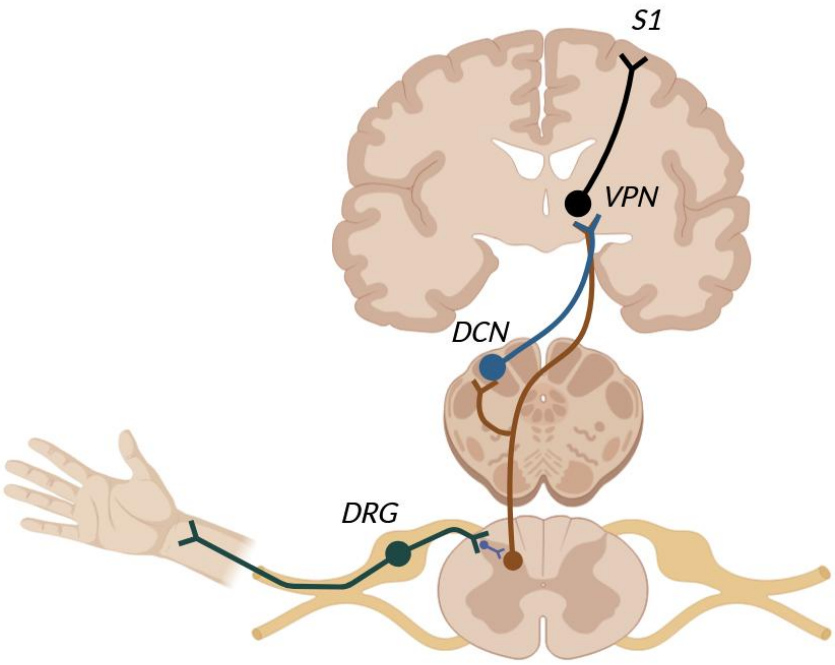


Figure 4 : Schéma général et simplifié du trajet de l'information sensorielle tactile.
DRG: Dorsal Root Ganglia; DCN: Dorsal Column Nuclei; VPN: Ventral Posterior Nuclear complex of the thalamus; S1: Primary somatosensory cortex.

II.A) Afférences primaires

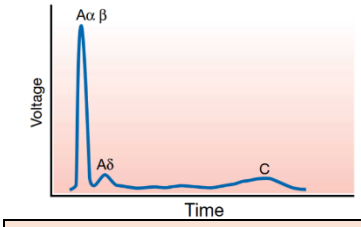
Les neurones sensoriels primaires ou afférences primaires sont des neurones **pseudounipolaires** composés d'un axone se séparant en deux prolongements, un périphérique et un central. Le **prolongement périphérique** se termine dans la peau où il détecte les stimuli tactiles (mécaniques, thermiques ou nociceptifs) par l'intermédiaire de récepteurs spécialisés et divers canaux mécano-, ou thermosensibles. Cette diversité moléculaire confère à chaque afférence primaire une spécificité vis-à-vis d'une ou plusieurs modalités sensorielles données. Ce prolongement périphérique peut également s'accompagner d'organes de détection particuliers (complexe cellule-neurite de Merkel, corpuscules de Ruffini, Meissner…). **L'axone central** projette dans la moelle épinière, où il établit des synapses avec des interneurones ou des neurones de projection. Dans certains cas, un prolongement supplémentaire projette directement vers les **noyaux des colonnes dorsales** du tronc cérébral (Tandrup, 1995; Abraira and Ginty, 2013).

Chacun de ces neurones peut être classés en fibres Aβ, Aδ ou C selon le diamètre de leur axone, leur **degré de myélinisation**, et leur **vitesse de conduction des influx nerveux** (***Figure 5***). Ils peuvent également être classés selon leur **cible périphérique** (follicule pileux, corpuscules de Meissner, Ruffini..), leurs **modalités sensorielles** (toucher léger, douleur, température …) et leur **neurochimie** (neuropeptides, marqueurs enzymatiques…) (Abraira and Ginty, 2013).

Ainsi, les fibres Aβ de grand diamètre, sont fortement myélinisées, et présentent une **grande vitesse de conduction (16 à 100 m/s)** ainsi qu'un **bas seuil d'activation**. Les fibres Aδ, plus fines et faiblement myélinisées, présentent une **vitesse de conduction intermédiaire (5–30 m/s)**. Les fibres C non myélinisées et de **petits diamètres**, conduisent l'information lentement (**0,2–2 m/s**) (Zotterman, 1939; Brown and Iggo, 1967; Abraira and Ginty, 2013).

La plupart des fibres Aβ ont des seuils mécaniques très bas, et correspondent quasi-exclusivement à des récepteurs du toucher léger discriminatif. En revanche, les fibres Aδ et C peuvent répondre à la fois à des stimuli potentiellement nociceptifs de forte intensité (on parle alors de fibres Aδ- et C–HTMRs : *High Threshold MechanoReceptors* ou mécanorécepteurs à haut seuil), mais aussi à des stimuli légers de faible intensité tel que le toucher doux (Aδ- et C–LTMRs : *Low Threshold Mechanoreceptors* ou mécanorécepteurs à bas seuil) (Brown and Iggo, 1967; Leem et al., 1993; Seal et al., 2009; Li et al., 2011; Abraira and Ginty, 2013).

Ainsi, les **fibres Aβ-LTMRs** assurent la détection fine du contact cutané et la perception des textures, tandis que les **Aδ-LTMRs** répondent au déplacement rapide des poils, et les **C-LTMRs** participent à la perception du **toucher émotionnel et agréable**.



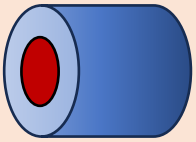
	Fibre Aβ	Fibre Aδ	Fibre C
			
Myélinisation	Forte	Faible	Absente
Diamètre	Large 6 – 12 µm	Moyen 1 – 6 µm	Faible 0.2 – 1.5 µm
Vitesse de conduction	16 – 100 m/s	5 – 30 m/s	0.2 – 2 m/s

Figure 5 : Caractéristiques des trois types de fibres
Le graphique en haut à gauche représente la vitesse de conduction de l'information des différentes fibres. Adapté de Julius and Basbaum, 2001.

II.A-1) Mécanorécepteurs à bas seuil d'activation (LTMRs)

Les LTMRs sont activés par des stimuli mécaniques de faible intensité, ou déformations inoffensives appliquées sur la peau ; certains peuvent aussi être activés par des stimuli thermiques légers. La conversion des forces mécaniques en signaux électriques par les afférences primaires repose sur des canaux ioniques mécanosensibles exprimés dans leurs terminaisons périphériques. Le principal acteur identifié est le canal **Piezo2**, considéré comme le transducteur majeur du toucher léger. Il est exprimé dans les neurones sensoriels Aβ- et Aδ-LTMRs, ainsi que dans les cellules de Merkel, où il permet la détection fine des déformations cutanées (Coste et al., 2010; Delmas et al., 2011; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014). Chez l'humain, des mutations du gène *PIEZO2* entraînent une perte quasi complète du toucher discriminatif et de la proprioception, confirmant son rôle essentiel (Chesler et al., 2016). D'autres canaux, tels que Piezo1, les canaux de la famille des TRP (TRPA1, TRPV4) ou les canaux potassiques K2P (TREK-1, TRAAK), contribuent également à la mécanosensibilité ou à sa modulation dans certaines conditions physiopathologiques (Brohawn et al., 2014).

Les LTMRs peuvent se diviser selon leur mode de décharge et plus particulièrement selon leurs **vitesses d'adaptation à un stimulus mécanique soutenu** allant d'adaptation lente (SA), intermédiaire (IA) à rapide (RA), ce qui leur permet de coder des paramètres distincts du stimulus tels que son intensité, sa vitesse ou sa durée (Johnson and Hsiao, 1992; Abraira and Ginty, 2013).

LTMRs dans la peau glabre

- Aβ-LTMRs

Les afférences Aβ-LTMRs de la peau glabre se différencient selon leur organe de terminaison cutané, lequel détermine leur sensibilité préférentielle (vibration, étirement,

indentation) ainsi que leurs propriétés de décharge. La majorité d'entre elles présentent une adaptation lente à un stimulus mécanique soutenu ; elles peuvent donc être classées en SA-LTMRs qui peuvent elles-mêmes être différenciées en deux classes : SA-LTMRs de type I (SAI) et SA-LTMRs de type II (SAII). Au cours de la décharge, les SAI présentent un intervalle entre potentiels d'action (PA) bien plus irrégulier que les SAII (Abraira and Ginty, 2013).

SAI-LTMRs & Complexe cellule de Merkel-Neurite

Ces afférences innervent majoritairement la peau glabre et particulièrement les zones fortement sensibles chez l'humain telles que les lèvres et les doigts. Elles sont associées aux cellules de Merkel, situées au niveau de la couche basale de l'épiderme (mais peuvent aussi être présentes dans la peau poilue). Les cellules de Merkel présentent de nombreuses protubérances et sont reliées physiquement aux cellules épithéliales par des hémidesmosomes. Chaque cellule de Merkel est innervée par une seule afférence Aβ-SAI-LTMRs (***Figure 6.A.D***) (Zimmerman et al., 2014). Ces fibres répondent aux forces mécaniques appliquées sur la peau avec une **réponse dynamique, soutenue et graduelle** suivie de **salves de PA à intervalles irréguliers**, dont la fréquence est linéairement corrélée à la profondeur d'indentation (c'est à dire le degré d'enfoncement local de la peau lors de la stimulation) (Coleman et al., 2001; Williams et al., 2010; Abraira and Ginty, 2013). Les SAI-LTMRs présentent des propriétés physiologiques et une activité qui leur permettent de transmettre une **représentation spatiale précise** du stimulus appliqué. Premièrement, elles réagissent préférentiellement au contact des angles, des bords et des courbures des objets avec des seuils de déplacement cutané très faibles (moins de 15 µm chez l'être humain). Deuxièmement, elles possèdent des champs récepteurs de faible taille (~2–3 mm), assurant ainsi une résolution spatiale élevée (jusqu'à 0,5 mm pour les afférences SAI humaines individuelles), ce qui les rend très sensibles à la position et à la vitesse du stimulus. Les SAI-LTMRs sont silencieux lorsque la peau n'est pas stimulée et relativement insensibles à l'étirement de la peau ou au déplacement cutané adjacent à leur champ récepteur (Maricich et al., 2009; Abraira and Ginty, 2013).

Les complexes cellule de Merkel–neurite constituent donc les **récepteurs clés du toucher de forme et de texture**.

SAII-LTMRs & Corpuscules de Ruffini

Tout comme évoqué précédemment, les SAII-LTMRs présentent une adaptation lente et régulière, l'intervalle entre deux PA étant plus uniforme que pour les SAI. Leur vitesse de conduction est comparable à celle des SAI (16 à 100m/s), mais cela varie également entre les espèces. Les SAII innervent la peau de façon moins dense que les SAI (elles sont moins nombreuses que les SAI par unité de surface de peau) mais leur champ récepteur sont cinq fois plus larges que ceux des SAI (une SAII couvre une zone de peau plus grande qu'une SAI) (Johansson and Vallbo, 1980). Les SAII sont ainsi, notamment plus sensibles à **l'étirement de la peau** et aux changements de posture (position, forme) des mains et des doigts (Johnson et al., 2000). Elles participent donc à la proprioception cutanée, c'est-à-dire à la perception de la

position des doigts via la tension de la peau. Les corpuscules de Ruffini sont des structures fuselées situées dans le derme profond, et sont traditionnellement considérés comme les récepteurs potentiels des SAII-LTMRs, bien qu'aucune démonstration directe ne soit venue confirmer ce lien de manière définitive (Chambers et al., 1972) (***Figure 6.D***). Ces terminaisons sensorielles encapsulées répondent à la déformation prolongée de la peau et pourraient donc contribuer à la proprioception cutanée (Roudaut et al., 2012; Abraira and Ginty, 2013).

Une autre partie des Aβ-LTMRs présentent une adaptation rapide (RA) à la stimulation mécanique. Ces afférences répondent principalement aux **mouvements d'objets glissants sur la peau**, plutôt qu'à des pressions statiques. Tout comme pour les SA-LTMRs, les RA-LTMRs peuvent être divisés en deux catégories : RAI- et RAII-LTMRs. Les RAI présentent généralement de petits champs récepteurs et sont associées à des vibrations à basse fréquence, telles que les tapotements et les battements (1 à 10 Hz), tandis que les réponses RAII sont associées à des champs récepteurs plus grands et à des vibrations à haute fréquence (de 80 à 300 Hz) (Knibestöl, 1973; Vallbo and Johansson, 1984; Abraira and Ginty, 2013).

RAI-LTMRs & Corpuscules de Meissner

Les RAI-LTMRs déclenchent des PA **uniquement au début et à la fin d'un contact mécanique**. Elles sont associées aux corpuscules de Meissner, situés dans les papilles dermiques des zones glabres. Lorsqu'on appuie sur la peau, les fibres de collagène qui relient l'épiderme basal aux cellules lamellaires du corpuscule fournissent la force mécanique qui déforme le corpuscule (***Figure 6.B.D***) et déclenche une salve de PA brusque et transitoire qui s'atténue rapidement. Lorsque le stimulus est supprimé, le corpuscule retrouve sa forme, ce qui induit une autre salve de PA, générant la réponse distinctive marche-arrêt des RAI-LTMRs. Par rapport aux SAI-LTMRs, les RAI-LTMRs sont environs quatre fois plus sensibles, mais moins précises spatialement, elles répondent avec des latences très courtes et de manière hautement cohérente à la stimulation cutanée, ce qui les rend essentielles pour la **détection fine des mouvements d'objets et la préhension** (Johansson and Vallbo, 1979; Abraira and Ginty, 2013).

RAII-LTMRs & Corpuscules de Pacini

Les RAII-LTMRs, associées aux corpuscules de Pacini, présentent une sensibilité extrême aux vibrations à haute fréquence et aux accélérations mécaniques. Les RAII sont encore plus sensibles que les RAI, réagissant souvent à des mouvements de l'ordre du nanomètre (Lynn, 1971; Jankowsky et al., 2004; Abraira and Ginty, 2013). Ces grands corpuscules ovoïdes (1 mm de longueur environs) sont constitués de lamelles concentriques de tissu conjonctif fibreux entourant une unique terminaison nerveuse Aβ non myélinisée, baignant dans un liquide intracapsulaire (***Figure 6.C.D***). Ils se situent dans le derme profond ou les tissus sous-cutanés (Roudaut et al., 2012). En raison de leur position profonde et de leur champ récepteur très étendu (englobant souvent toute la main), les RAII-LTMRs ne

permettent pas une discrimination spatiale fine, mais détectent efficacement les changements d'intensité. Si le taux de variation du stimulus est modifié, leur réponse devient proportionnelle à cette variation. On les appelle également « détecteurs d'accélération » (Abraira and Ginty, 2013).

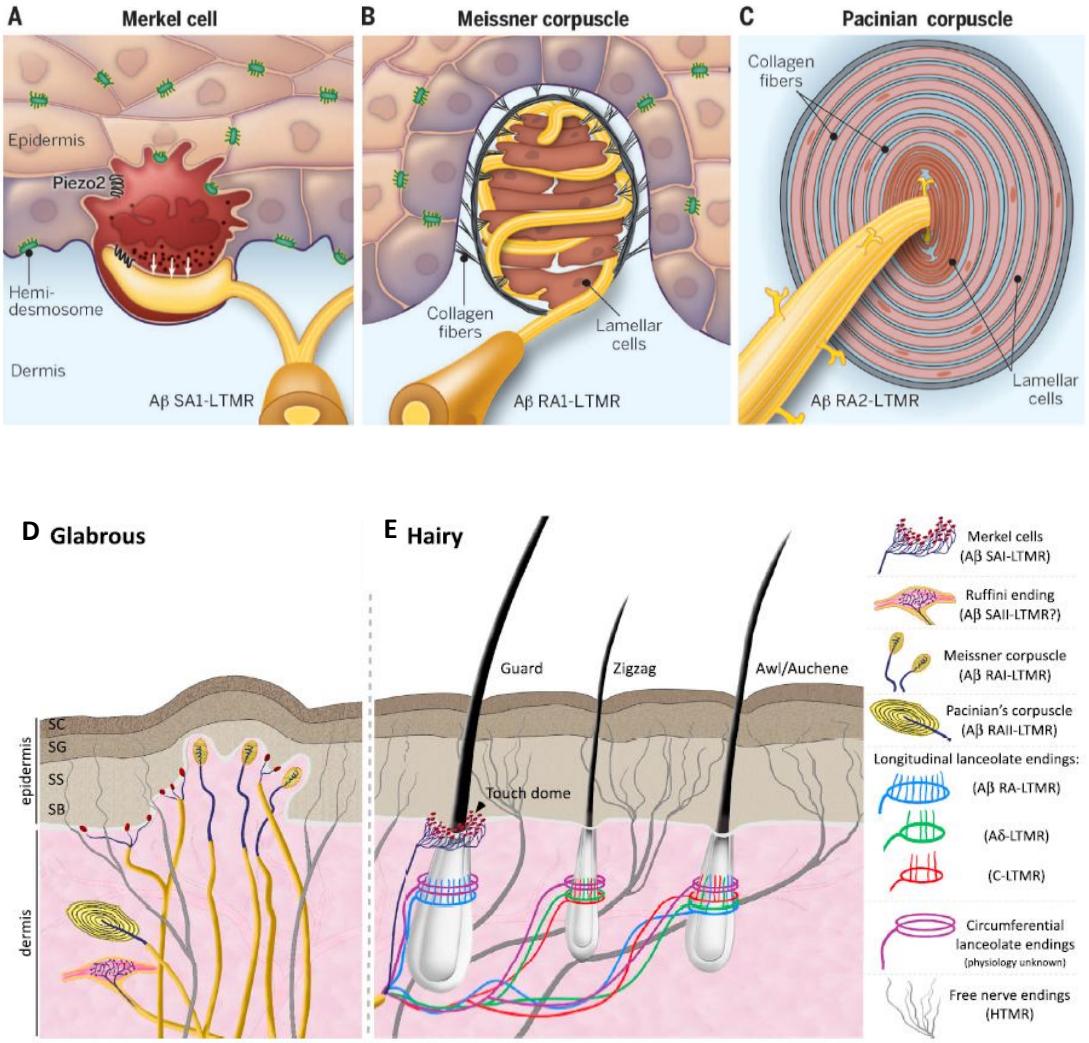


Figure 6 : Organisation et structure des mécanorécepteurs cutanées

(**A**) Les cellules de Merkel possèdent de nombreuses protubérances cytoplasmiques et sont reliées physiquement aux cellules épithéliales environnantes par des hémidesmosomes. Des vésicules à noyau dense (points noirs) sont situées à l'intérieur de la cellule de Merkel, à proximité immédiate de la terminaison axonale de la fibre SAI-LTMR, et sont considérées comme impliquées dans la signalisation entre la cellule de Merkel et le neurite. Les cellules de Merkel sont sensibles à la mécanique et jouent un rôle actif dans la mécano-transduction (flèches blanches). (**B**) Les corpuscules de Meissner sont situés dans les papilles dermiques et sont innervés par une ou plusieurs Aβ-RA1-LTMRs. La capsule externe est reliée à la fois aux cellules lamellaires et à l'épiderme par des fibres de collagène. (**C**) Les corpuscules de Pacini sont situés dans le derme profond, contiennent des cellules lamellaires stratifiées et sont innervés par une seule Aβ-RAII-LTMR. Des fibres de collagène longitudinales et circonférentielles ancrent respectivement le noyau interne et la zone externe. D'après Zimmerman et al., 2014. Organisation et position des fibres associées à leur organe sensoriel dans la peau glabre (**D**) et poilue (**E**) en fonction des trois types de poils. D'après Abraira and Ginty, 2013

LTMRs dans la peau poilue

Les LTMRs de la peau poilue sont **physiquement et fonctionnellement associés aux follicules pileux**. Chez la souris par exemple, les follicules pileux se répartissent en trois types distincts : les plus nombreux sont les follicules pileux appelés zigzag, les follicules Awl/Auchene et enfin les follicules de garde (guard hairs). Les follicules pileux sont ainsi associés à des LTMRs de type Aβ, Aδ et C qui forment des **structures lancéolées** (fusiformes) organisées longitudinalement le long du bulbe pileux et qui répondent aux mouvements des poils et à leur direction en émettant des trains de PA au début et à la fin du stimulus, il s'agit donc de RA-LTMRs (Roudaut et al., 2012; Abraira and Ginty, 2013).

- Aβ-LTMRs

Les fibres Aβ forment des terminaisons lancéolées longitudinales entourant les poils de garde, et les follicules pileux Awl/Auchene (Li et al., 2011). Elles codent principalement les mouvements rapides et directionnels des poils. Il existe aussi quelques fibres Aβ-SAI-LTMRs associées aux complexe de Merkel, localisées à la base de certains follicules, dont le mode de décharge est similaire à celui enregistré dans les SAI-LTMRs de la peau glabre (***Figure 6.E***) (Woodbury and Koerber, 2007).

- Aδ-LTMRs

Les fibres Aδ-LTMRs associées aux follicules pileux ont tout d'abord été décrites comme « D-hair » (Down hair) par rapport à leur réponse spécifique aux mouvements des petits poils sinusaux et duveteux chez le chat et le lapin. Les terminaisons lancéolées des fibres Aδ-LTMRs sont associées aux follicules pileux Awl/Auchene et zigzag uniquement (***Figure 6.E***) (Li et al., 2011). Ces fibres détectent préférentiellement la déviation des poils du corp dans le sens caudo-rostral (Rutlin et al., 2014). Leurs réponses présentent les seuils mécaniques les plus bas et une sensibilité dynamique extrêmement élevée par rapport à tous les autres LTMRs ce qui fait des Aδ-LTMRs, les mécanorécepteurs les plus sensibles de la peau (Abraira and Ginty, 2013).

- C-LTMRs

Bien que les fibres C soient souvent associées à la nociception, une sous-population distincte de C-LTMRs a été décrite initialement chez le chat par (Zotterman, 1939), avant d'être plus tard décrites chez l'humain comme sensible à des stimulations cutanées légères et agréables, évoquant une sensation de « chatouillement » ou de toucher affectif (Löken et al., 2009; Liljencrantz and Olausson, 2014). Tout comme les Aδ-LTMRs, les C-LTMRs sont extrêmement sensibles à l'indentation de la peau, mais sont activées préférentiellement par des stimuli qui se déplacent lentement à travers leur champ réceptif, ce qui laisse supposer qu'elles sont en fait des « détecteurs de caresses ». Les C-LTMRs ne se trouvent que dans la peau poilue, jamais dans la peau glabre. Leur profil physiologique est unique parmi les LTMRs de la peau poilue. En effet, ces fibres présentent une propriété d'adaptation intermédiaire (IA),

avec une décharge modérée et soutenue pendant un stimulus maintenu. Les C-LTMRs forment des terminaisons longitudinales lancéolées autour des follicules pileux Awl/Auchene et zigzag (Li et al., 2011).

Chez la souris, ces afférences expriment spécifiquement le **transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3**, utilisé comme marqueur génétique. La perte de VGLUT3 altère spécifiquement la sensation de douleur mécanique, et atténue l'allodynie mécanique observée après inflammation ou lésion nerveuse, suggérant que les C-LTMRs peuvent **basculer d'un rôle de détection tactile inoffensive à un rôle pro-nociceptif** dans des conditions pathologiques (Seal et al., 2009).

Chez l'humain, leurs homologues putatifs : les fibres C-tactiles (CT), sont activées préférentiellement par des caresses lentes (1–10 cm/s) et sont corrélées à des perceptions de plaisir social, renforçant leur rôle potentiel dans le toucher affectif et la communication sociale (McGlone et al., 2014).

II.A-2) Nocicepteurs ou Mécanorécepteurs à Haut seuil d'activation (HTMRs)

Les nocicepteurs ou mécanorécepteurs à haut seuil d'activation (HTMRs) sont activés par des stimuli mécaniques ou thermiques de fortes intensités, capables de menacer l'intégrité tissulaire. Ils constituent ainsi le premier maillon du système nociceptif, essentiel à la **détection et à la protection contre les stimuli potentiellement douloureux**. Ces neurones sensoriels correspondent principalement aux fibres Aδ et C dont les terminaisons périphériques sont des terminaisons nerveuses libres, dépourvues d'organes sensoriels spécialisés. Elles se ramifient dans les couches superficielles de l'épiderme, à proximité des kératinocytes, cellules de Langerhans et mélanocytes, aussi bien dans la peau glabre que poilue (***Figure 6.E***) (Roudaut et al., 2012; Abraira and Ginty, 2013).

Les fibres Aδ-HTMRs sont responsables de la sensation de douleur mécanique rapide et aiguë, souvent décrite comme une « première douleur » bien localisée. Certaines sous-populations répondent aussi à des stimuli thermiques extrêmes, chauds ou froids, contribuant à la détection de variations dangereuses de température.

D'autre part, les fibres C-HTMRs dont la vitesse de conduction est largement plus lente que celle des fibres A, sont responsables de la sensation de douleur lente et diffuse. Elles répondent principalement aux stimuli mécaniques de haute intensité, et certaines populations peuvent aussi être polymodales, c'est-à-dire sensibles simultanément à des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques nocifs (Bessou and Perl, 1969; Cain et al., 2001). Les nocicepteurs C peuvent être classés en deux grands sous-groupes selon leur phénotype neurochimique en fonction de l'expression des neuropeptides :

- les **peptidergiques** : qui contiennent des neuropeptides, tels que la substance P, le CGRP (Calcintonin Gene-Related Peptide), et souvent le récepteur au NGF (Nerve Growth Factor) : TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) (Averill et al., 1995; Snider and McMahon, 1998; Woolf and Ma, 2007).

- les **non-peptidergiques** : dépourvus de neuropeptides, mais se liant fortement à l'isolectine-B4 (IB4) et exprimant notamment le récepteur c-RET qui lie de façon spécifique le GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor), les récepteurs couplés aux protéines G de la famille des Mgprd (Mas related G protein coupled receptors), et un sous-type spécifique de récepteurs prurinergiques P2X3 (Ribeiro-da-Silva et al., 1989; Molliver et al., 1997; Perry and Lawson, 1998; Snider and McMahon, 1998).

Leur organisation anatomique reflète des fonctions distinctes, les neurones peptidergiques innervent les régions basales de l'épiderme et contribuent à la nociception thermique, tandis que les neurones non-peptidergiques innervent une région épidermique plus superficielle et sont surtout impliqués dans la nociception mécanique (Abraira and Ginty, 2013). Cette distinction est appuyée par des études de perte de fonction : l'ablation génétique sélective de neurones non-peptidergiques entraîne une perte spécifique de sensibilité aux stimuli mécaniques nocifs. De même, l'ablation pharmacologique centrale des terminaisons des neurones peptidergiques entraîne des déficits sélectifs dans la nociception thermique (Cavanaugh et al., 2009).

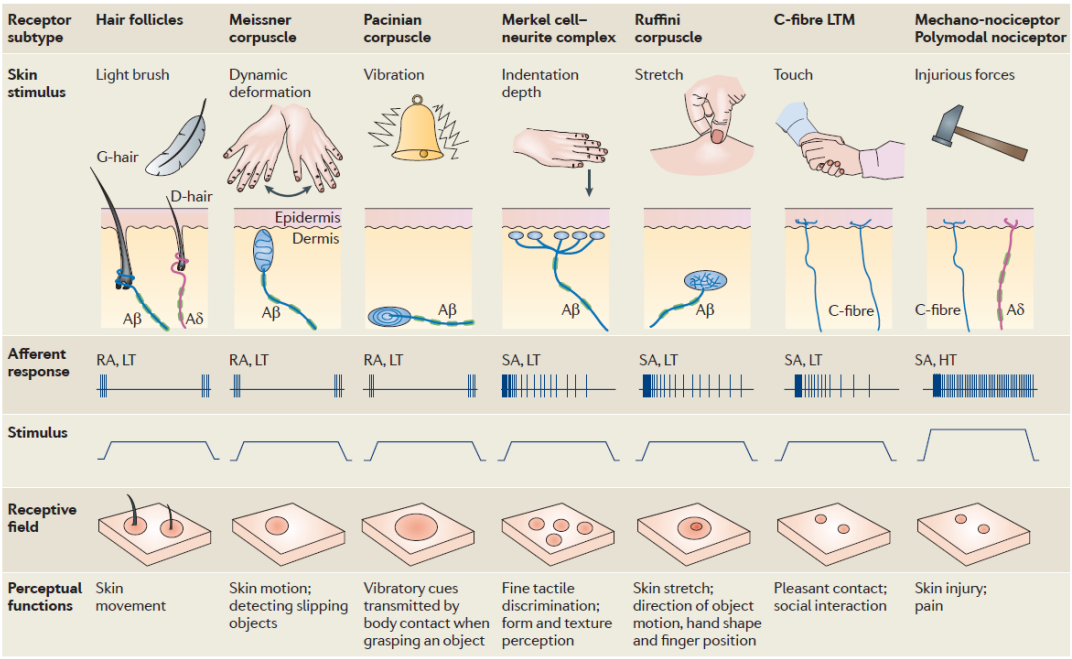


Figure 7 : Récapitulatif des caractéristiques individuelles des différents mécanorécepteurs.
Représentation des propriétés des différents types de mécanorécepteurs innervant la peau. Cette différenciation peut être établie selon le type de stimulus optimal pour activer la fibre, son type de terminaison au niveau de la peau, l'adaptation de sa décharge au stimulus mécanique appliqué, la taille et forme de son champ récepteur. D'après Delmas et al., 2011.

II.A-3) Thermorécepteurs

La thermosensation est l'une des principales modalités sensorielles de la peau. Elle permet à la fois la régulation homéostatique de la température corporelle et la détection de variations thermiques potentiellement nocives, pouvant menacer l'intégrité tissulaire (Schepers and Ringkamp, 2010). La perception thermique est permise grâce à l'activation d'afférences primaires sensibles à la température aussi appelée : thermorécepteurs. Ces neurones pseudounipolaires projettent leurs terminaisons nerveuses libres dans la peau, où ils détectent les variations thermiques et transmettent l'information au système nerveux central via des fibres Aδ et C (Basbaum et al., 2009; Jänig, 2018).

L'activation de ces neurones thermosensibles repose sur des canaux ioniques thermodépendants appartenant à la superfamille des canaux TRP (Transient Receptor Potential), exprimés au niveau des terminaisons périphériques. Parmi eux, plusieurs sous-familles jouent un rôle clé selon la gamme de température détectée : les canaux TRP vanilloïdes (TRPV), les canaux TRP longs ou mélastatines (TRPM) et les canaux protéiques transmembranaires ankyrine (TRPA) (Schepers and Ringkamp, 2010). Ainsi, les thermorécepteurs non nociceptifs s'activent dans la plage de confort thermique comprise entre ~15 et 42 °C, tandis que les thermo-nocicepteurs répondent aux températures extrêmes (froid glacial < 15 °C ou chaleur extrême > 43 °C).

Le premier canal identifié pour être activé par la chaleur fut le canal **TRPV1** activé notamment par des températures **> 42°C** ainsi que par la capsaïcine principe actif des piments et responsables de la sensation de brulure associée à leur ingestion (Caterina et al., 1997). Les souris dépourvues de ce canal ionique présentent une perte totale de sensibilité à la capsaïcine, et une altération marquée de la perception de la chaleur nocive, sans perte complète de la thermosensation (Caterina et al., 2000). Dans une autre étude cependant, aucune différence n'a été observée dans les réponses provoquées par la chaleur entre les animaux de type sauvage et ceux déficients en TRPV1 (Woodbury et al., 2004). Ces données indiquent que TRPV1 contribue largement à la sensation de chaleur nociceptive aiguë mais n'est probablement pas le seul canal responsable de la transduction de chaleur. En effet, les canaux **TRPM3** (Vriens et al., 2011) et **ANO1** (Cho et al., 2012) ont notamment été mis en évidence pour répondre aux stimuli thermiques **entre 40 et 44°C**, ces deux canaux sont majoritairement exprimés dans des nocicepteurs de petits diamètres co-exprimant TRPV1 (Zhang, 2015). Le canal **TRPV2** a lui été identifié pour répondre aux températures extrêmement chaudes **> 52°C** (Caterina et al., 1999). Les canaux **TRPV3** et **TRPV4** s'activent eux pour des températures chaudes inoffensives, pour des températures respectivement **> 33°C et > 27°C**. Ils ne sont toutefois pas exprimés dans les neurones sensoriels mais plutôt dans les kératinocytes, suggérant un dialogue neuro-cutané : les kératinocytes participeraient à la transduction thermique en relayant les signaux via la libération d'ATP ou de médiateurs

paracrines vers les terminaisons neuronales exprimant TRPV1 (Peier et al., 2002b; Chung et al., 2004; Zhang, 2015).

Enfin, la perception du froid repose principalement sur **TRPM8**, activé par des températures comprises **entre 26 °C et 16 °C**, ainsi que par des composés responsables d'une sensation de fraicheur tel que le menthol (Peier et al., 2002a). Pour les températures extrêmement froides, le **TRPA1** a été proposé comme thermorécepteur, activé **en dessous de 15 °C** (Story et al., 2003; Zhang, 2015).

En résumé, les canaux TRP constituent les principaux détecteurs moléculaires des variations thermiques, mais ils fonctionnent en réseau avec d'autres mécanismes — tels que les canaux potassiques à rectification entrante (Kir), les canaux sodiques voltage-dépendants (Nav1.8, Nav1.9), et les kératinocytes sensoriels — pour assurer une transduction fine et multimodale du signal thermique (Zhang, 2015).

II.A-4) ***Focus autisme*** : altérations reconnues au niveau des mécanorécepteurs et plus particulièrement des LTMRs

Dans cette thèse nous nous intéressons aux processus neurobiologiques sous-jacents aux altérations de sensibilité tactile dans l'autisme. Dans cette thématique, plusieurs études récentes ont mis en évidence des anomalies au niveau des afférences primaires, et notamment des LTMRs responsables de la détection des stimuli tactiles légers. Ainsi, Huzard et al., 2022 ont notamment montré que l'hypofonction ou la déficience fonctionnelle des C-LTMRs est suffisante pour induire des déficits sociaux et une réduction des interactions sociales tactiles chez les souris reproduisant les altérations comportementales observées dans les modèles murins de l'autisme. Inversement, l'activation pharmacologique de ces C-LTMRs permet d'augmenter les comportements prosociaux, suggérant ainsi que les afférences C-LTMRs peuvent à elles seules moduler les comportements sociaux complexes. Dans une étude plus récente, la même équipe a mis en évidence une hypo-réactivité électrophysiologique de ces C-LTMRs entrainant une diminution de la sécrétion de la chemokine TAFA4 (spécifique des C-LTMRs), associée à une hypersensibilité à la démangeaison mécanique (alloknésie) dans le modèle murin d'autisme *Shank3*$^{\Delta C/\Delta C}$ (Huzard et al., 2025). De façon intéressante, les résultats électrophysiologiques de cette étude n'ont pas montré d'altération des fibres Aβ à conduction rapide dans ce modèle. Cependant leur désactivation pharmacologique spécifique était suffisante pour réduire l'alloknésie des souris *Shank3*$^{\Delta C/\Delta C}$ ce qui suggère que la réponse mécanique à la démangeaison pourrait être excessivement médiée par les fibres Aβ-RA-LTMRs, indépendamment de l'état des autres fibres (Huzard et al., 2025).

Parallèlement, Orefice et al., 2016 ont montré que la délétion des gènes *Mecp2* ou *Gabrb3* dans les DRG et donc uniquement dans les neurones sensoriels primaires induit non seulement une hyperréactivité tactile chez ces animaux, mais également des troubles sociaux

et anxieux à l'âge adulte. Ces phénotypes seraient dus à une perte d'inhibition présynaptique médiée par les récepteurs $GABA_A$ sur les neurones sensoriels primaires. En effet, le traitement chronique par agoniste des récepteurs $GABA_A$ ciblant les neurones sensoriels primaires a permis d'améliorer les comportements anxieux et sociaux (Orefice et al., 2019). L'hyperréactivité tactile de ces souris apparait très précocement (dès P4) et celles-ci présentent par la suite des comportements anxieux et sociaux altérés à l'âge adulte. À l'inverse, dans d'autres modèles murins d'autisme (*Nlgn2*$^{+/-}$, *Rorb*$^{h1/+}$) l'hyperréactivité tactile n'émerge qu'à l'âge adulte et les altérations socio-cognitives ne sont pas observées (Tasnim et al., 2024). Ces observations soulignent que les dysfonctionnements somatosensoriels précoces peuvent jouer un rôle causal dans l'émergence des altérations sociales et émotionnelles.

Ensemble, ces travaux démontrent que les neurones sensoriels périphériques, et en particulier les LTMRs, ne sont pas de simples transmetteurs passifs, mais des acteurs clés de la physiopathologie autistique. Leurs altérations précoces peuvent suffire à perturber la maturation des circuits neuronaux impliqués dans la perception, l'anxiété et la socialisation. Ces découvertes replacent la périphérie sensorielle au cœur du modèle neurobiologique de l'autisme et soulignent l'importance d'examiner en détail les mécanismes d'intégration spinaux, premier relais de traitement de l'information tactile.

II.B) Intégration dans les cornes dorsales de la moelle épinière

Les afférences sensorielles primaires issues des ganglions rachidiens dorsaux pénètrent dans la moelle épinière via la racine dorsale et y établissent leurs premières synapses. Ces afférences constituent ainsi le point d'entrée de l'information somatosensorielle dans le système nerveux central. La corne dorsale de la moelle épinière (CDME) joue un rôle crucial dans la transmission et constitue le premier traitement de l'information sensorielle, qu'elle soit mécanique, thermique ou nociceptive. C'est à ce niveau que s'opèrent les premiers mécanismes de filtrage, de modulation et d'intégration multisensorielle avant que le signal ne soit relayé vers les structures supraspinales telles que le tronc cérébral, le thalamus et le cortex somatosensoriel. Seule une faible proportion des LTMRs possède un axone qui s'étend directement dans les cordons dorsaux jusqu'au noyau des colonnes dorsales dans le tronc cérébral, tandis que l'information issue des HTMRs n'emprunte jamais la voie des cordons dorsaux et passe ainsi systématiquement par un relais d'intégration dans la corne dorsale de la moelle épinière (Brown, 1981).

Historiquement, les principales caractérisations anatomiques de la moelle épinière et les descriptions morpho-fonctionnelles des neurones ont été établies à partir de modèles de rat, avant d'être largement confirmées chez la souris.

II.B-1) Organisation laminaire et projection des afférences sensorielles primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière

L'organisation interne de la moelle épinière a été décrite pour la première fois par (Rexed, 1952) qui a divisé la substance grise en dix couches laminaire (I à X) selon la morphologie et la densité neuronale. Les six premières (I à VI) constituent la corne dorsale dédiée à la réception et au traitement des signaux somatosensoriels, les couches VII à IX forment la corne ventrale, où résident les motoneurones, tandis que la couche X entoure pour sa part le canal central (***Figure 8.A***) (Todd, 2010; Peirs and Seal, 2016).

Les projections des afférences primaires dans la CDME suivent une organisation somatotopique et modulaire selon la modalité sensorielle. Les afférences nociceptives et thermiques (fibres C- et Aδ-HTMRs) se terminent principalement dans la lamina I et IIo. En effet, la lamina II peut être divisée en deux parties : IIo (*outer* : externe) et IIi (interne) : la lamina IIo reçoit surtout les afférences C peptidergiques, tandis que la IIi reçoit les fibres $IB4^+$ non-peptidergiques mais aussi les projections de fibres Aβ- Aδ- et C-LTMRs, jouant un rôle dans la modulation du toucher léger. Les LTMRs (Aβ, Aδ, C) arborisent ainsi les laminae IIi à V de manière partiellement chevauchante (***Figure 8.B***) (Li et al., 2011; Abraira et al., 2017) :

- Les **C-LTMRs** projettent dans la **lamina IIi**.
- Les **Aδ-LTMRs** se terminent dans les couches **IIi et III**.
- Les **Aβ-LTMRs** projettent des **laminae IIi à IV**, parfois jusqu'à la limite dorsale de la lamina V.

Les projections des afférences LTMRs définissent une zone appelée **LTMR Recipient Zone (LTMR-RZ)**, d'environ 250 µm d'épaisseur, s'étendant de la lamina IIi à la frontière entre les laminae IV et V (Abraira et al., 2017). Ainsi, la corne dorsale peut être schématiquement divisée en deux zones fonctionnelles principales : une **zone superficielle** (laminae I-IIo) dédiée au **traitement des informations nociceptives et thermiques**, et une **zone profonde** (laminae IIi-VI) plutôt impliquée dans le **traitement des signaux mécaniques non nocifs** (Todd, 2010; Abraira and Ginty, 2013; Peirs and Seal, 2016).

La somatotopie est également reproduite le long des axes rostro-caudal et médio-latéral de la moelle épinière. Les entrées provenant du bas du corps (pieds, jambes) sont intégrées par les régions caudales de la moelle épinière, tandis que les entrées provenant du haut du corps (torse, bras) sont intégrées par les régions rostrales de la moelle épinière. En parallèle, les entrées provenant de la peau distale (main) et proximale (épaule) sont intégrées dans les régions respectivement latérales et médiales de la moelle épinière (Abraira and Ginty, 2013).

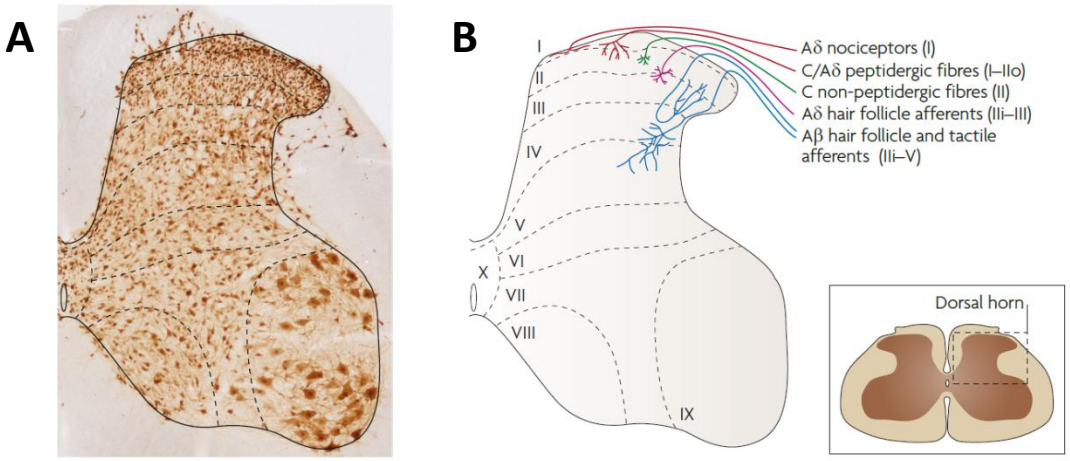


Figure 8 : Organisation laminaire de la substance grise de la moelle épinière et projection des afférences primaires dans les cornes dorsales

(**A**) Coupe transversale de moelle épinière lombaire d'un rat, immunomarquée à l'aide d'un anticorps (NeuN) qui marque spécifiquement les neurones. Les limites lamellaires sont représentées par les lignes pointillées. Les laminae I et II (également appelées zone marginale et substance gélatineuse, respectivement) constituent la corne dorsale superficielle et se caractérisent par la présence de nombreux petits neurones. (**B**) Schéma représentant les projections dans les différentes laminae des différents types d'afférences primaires. D'après Todd, 2010.

Sur le plan neurochimique, la majorité des afférences primaires libèrent du glutamate au niveau de leurs terminaisons centrales, exerçant ainsi une action excitatrice sur leurs cibles postsynaptiques (Todd, 2010). Ces terminaisons s'organisent souvent en glomérules synaptiques, véritables unités d'intégration comprenant : (1) **un bouton afférent primaire central** (ou *core* (C)), (2) **plusieurs dendrites postsynaptiques** provenant d'interneurones excitateurs ou inhibiteurs, contenant peu ou pas de vésicules et donc n'effectuant pas d'inhibition présynaptique en retour sur le core (D) ou au contraire contenant de nombreuses vésicules et alors capables d'établir une inhibition présynatique sur l'afférence primaire (V1), et (3) des **terminaisons axonales voisines** exerçant une **modulation présynaptique** (V2). Cette architecture permet une modulation fine de la transmission sensorielle dès la première synapse dans la corne dorsale. Deux types principaux de glomérules synaptiques ont été décrits (chacun divisés en deux sous-groupes également) :

- les **glomérules de type I** sont principalement présents dans la couche II, possèdent en leur centre un core au contour dentelé, dense en vésicules sphériques très rapprochées et de diamètre variable avec peu de mitochondries (***Figure 9.A-B***). Ils sont issus de fibres C nociceptives non myélinisées, et peuvent être subdivisés en **type Ia** (afférences C non peptidergiques) et **type Ib** (afférences peptidergiques, exprimant la substance P et le CGRP).

- Les **glomérules de type II** se trouvent à la jonction des couches II et III, présentent un **core clair** d'origine **myélinisée** (fibres Aβ et Aδ non nociceptives) au contour régulier riche en mitochondries et en vésicules uniformes (***Figure 9.C***). Les sous-types **IIa** et **IIb** se distinguent

par la présence variable de neurofilaments (Ribeiro-Da-Silva and Coimbra, 1982; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008).

Cette organisation glomérulaire constitue le **substrat anatomique majeur de la modulation présynaptique** des afférences primaires dans la corne dorsale, jouant un rôle central dans le contrôle du flux d'information sensorielle vers les circuits spinaux (Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008).

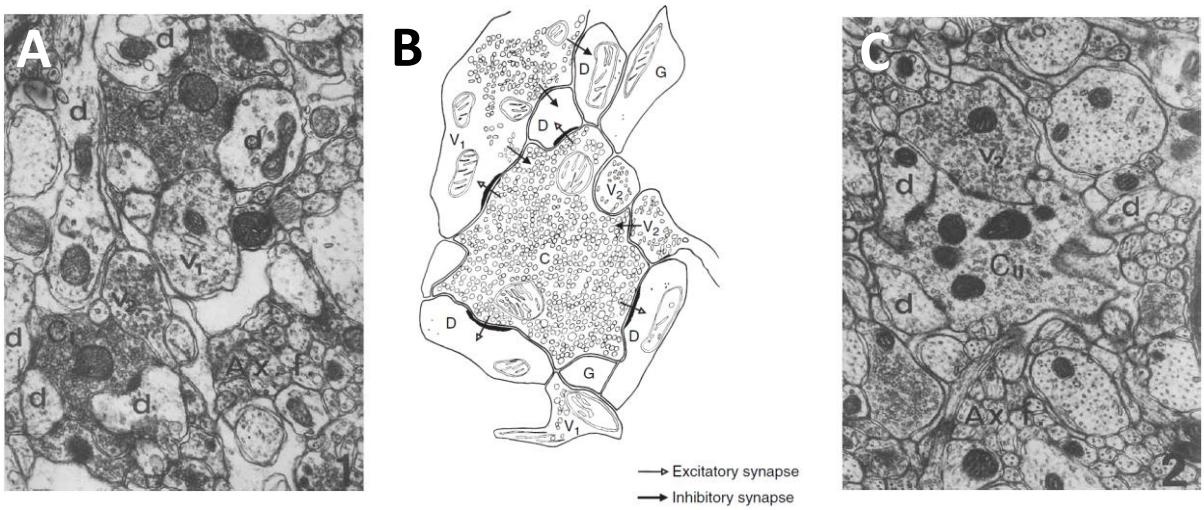


Figure 9 : Les deux types de glomérules synaptiques

(**A**) Image de microscopie électronique représentant deux glomérules synaptiques de type Ia sur une coupe transversale de corne dorsale. (Le core est bien dense et sombre, la plupart des profils environnants sont des dendrites simples, mais il y a une terminaison V1 et une V2 par glomérule) (**B**) Schéma représentant un glomérule de type Ia. (**C**) Image de microscopie électronique représentant un glomérule synaptique de type II (Le core est clair et la plupart des profils voisins sont des dendrites simples, mais il y a une terminaison V2).

C, représente le bouton afférent centrale aussi nommé core ; D, représente les dendrites postsynaptiques ; V1, dendrite voisine postsynaptique par rapport à l'afférence primaire mais capable d'établir une inhibition présynaptique sur cette dernière ; V2, bouton axonal riche en vésicules discoïdes postsynaptique par rapport à l'afférence primaire mais capable d'établir une inhibition présynaptique sur cette dernière ; G, le profil glial. (**A**) et (**C**) d'après Ribeiro-Da-Silva and Coimbra, 1982 ; (**B**) d'après Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008.

Ce contrôle présynaptique et postsynaptique des afférences sensorielles constitue le fondement du modèle de *Gate Control* ou « théorie du portillon » de (Melzack and Wall, 1965; WALL, 1978), selon lequel l'activation des fibres tactiles Aβ peut inhiber la transmission nociceptive portée par les fibres C- et Aδ-HTMRs, via l'activation d'interneurones inhibiteurs de la lamina II (***Figure 10***). Ce modèle a posé les bases de la compréhension moderne des interactions entre circuits tactiles et nociceptifs dans la corne dorsale.

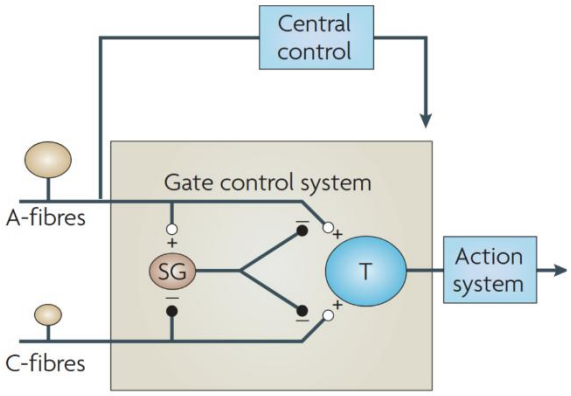


Figure 10 : La théorie du portillon proposé par Melzack et Wall en 1965.
Schéma illustrant la théorie du portillon selon laquelle, les fibres nociceptives et non-nociceptives peuvent agir en compétition pour contrôler l'activité des neurones de projection (à transmission, notés T) par l'intermédiaire de la modulation des interneurones inhibiteurs. Schéma d'après (Perl, 2007).

Les synapses inhibitrices présynaptiques constituent un mécanisme essentiel de régulation de l'entrée sensorielle, en modulant la libération de glutamate par les terminaisons des afférences primaires, plutôt que l'activité des neurones postsynaptiques. Ce type d'inhibition permet ainsi limiter la transmission du signal vers les neurones spinaux postsynaptiques (Bardoni et al., 2013). Les interneurones responsables de cette inhibition présynaptique sont GABAergiques et se distinguent notamment par l'expression de l'enzyme GAD65, impliquée dans la synthèse du GABA (Betley et al., 2009). Les afférences primaires, en activant les réseaux spinaux, peuvent activer ces neurones GABAergiques. Lorsqu'elles sont stimulées par les afférences primaires, ces cellules activent des synapses axo-axoniques sur les terminaisons afférentes. Dans ces terminaisons, la concentration intracellulaire élevée en ions chlorure (Cl^-) (***Figure 11.A***) inverse l'effet habituel du GABA : la liaison du GABA aux récepteurs $GABA_A$ présynaptiques provoque un efflux de Cl^-, entraînant une dépolarisation locale de l'afférence primaire — phénomène connu sous le nom de **dépolarisation afférente primaire (*Primary Afferent Depolarisation*, PAD)** (***Figure 11.B***). Cette dépolarisation se propage de manière rétrograde le long de la fibre afférente, ce qui inhibe la transmission synaptique en inactivant les canaux sodiques et/ou calciques voltage-dépendants, bloquant ainsi l'arrivée de PA et réduisant la probabilité de libération de neurotransmetteur lors des stimulations suivantes (***Figure 11.C***) (Stachowski and Dougherty, 2021).

Ces processus reposent sur la diversité cellulaire et la connectivité interne complexe de la corne dorsale. Celle-ci comprend de multiples populations de neurones excitateurs et inhibiteurs, organisées en réseaux locaux qui déterminent la façon dont les signaux tactiles, nociceptifs et thermiques sont intégrés, filtrés ou transmis. La compréhension de cette organisation neuronale est donc essentielle pour appréhender le traitement de l'information somatosensorielle et ses altérations pathologiques.

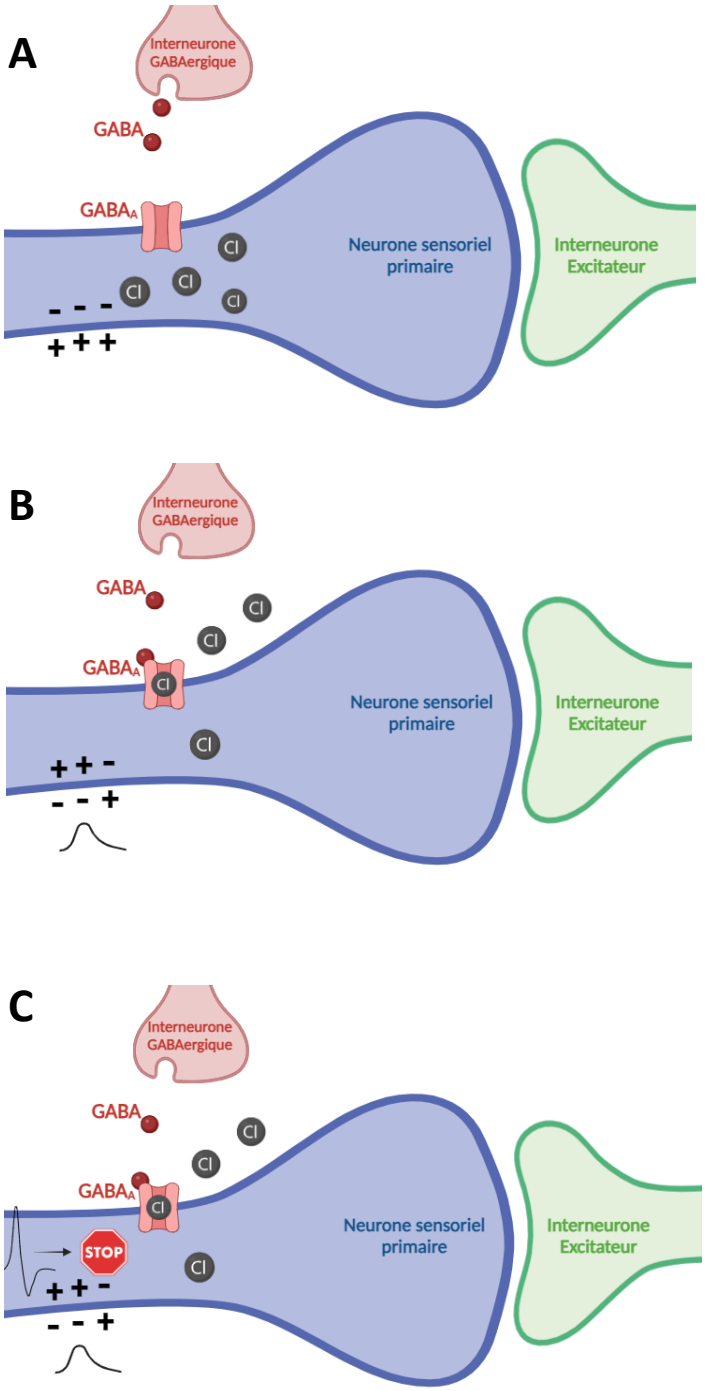


Figure 11 : Dépolarisation afférente primaire (PAD : *Primary Afference Depolarisation*)
Représentation schématique du développement du PAD (**A**) Contrairement aux autres neurones l'afférence primaire contient une forte concentration d'ions chlorure (Cl^-) intracellulaire. (**B**) Quand le GABA agit sur les récepteurs $GABA_A$ présynaptiques le Cl^- en suivant son gradient électrochimique sort de l'afférence vers le milieu extracellulaire, induisant ainsi une dépolarisation membranaire. (**C**) Cette dépolarisation est responsable de l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants adjacents ce qui entraine le blocage de l'arrivée des PA.

II.B-2) Populations neuronales de la CDME

Les neurones des CDME sont composés de deux types principaux : ceux dont l'axone reste et projette dans les CDME qui sont des interneurones locaux assurant la modulation et le traitement initial de l'information sensorielle, et ceux dont l'axone projette vers les structures supraspinales pour y transmettre l'information : appelés neurones de projection (Todd, 2017).

Les **neurones de projection** représentent une minorité des neurones spinaux (environ 2%), mais jouent un rôle essentiel dans la transmission ascendante de l'information sensorielle. Ils sont principalement localisés dans les **laminae I et V**. Ces neurones projettent leurs axones vers plusieurs cibles supraspinales, notamment le thalamus, la formation réticulée, la substance grise périaqueducale, les noyaux parabrachiaux, les noyaux des colonnes dorsales, les noyaux cervicaux latéraux … (Abraira and Ginty, 2013; Cameron et al., 2015; Todd, 2017). Ils constituent les principales voies de sortie ascendantes de la moelle épinière telles que le tractus spinothalamique, le tractus spinoréticulaire, le tractus spinoparabrachial, les voies post-synaptiques des colonnes dorsales et le tractus spinocervical. Ils jouent donc un rôle essentiel dans l'interprétation et la propagation des informations tactiles vers le cerveau.

La majorité des neurones de la corne dorsale sont toutefois des **interneurones locaux**, dont les axones restent confinés à la moelle épinière. Ces interneurones représentent environ 95 % de la population neuronale des CDME et se divisent en deux grandes classes fonctionnelles :

- Les **interneurones excitateurs**, majoritairement **glutamatergiques**, exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate **VGLUT2**,
- Les **interneurones inhibiteurs**, utilisant le **GABA** et/ou la **glycine** comme neurotransmetteurs exprimant **GAD65, GAD67** (enzymes de synthèse du GABA : *Glutamate Decarboxylase (GAD)*) et **GlyT2** (le transporteur neuronal de la Glycine) (Todd and Sullivan, 1990; Duan et al., 2014; Peirs and Seal, 2016; Todd, 2017).

Ces deux populations sont présentes dans toutes les laminae de façon relativement uniforme. Chez la souris par exemple, les neurones inhibiteurs correspondent à 26% des neurones des laminae I-II et 38% des neurones de la lamina III (Polgár et al., 2013a). Les interneurones enrichis en glycine sont particulièrement nombreux dans la lamina III (Todd and Sullivan, 1990). Le reste correspond donc à des neurones glutamatergiques cela incluant donc à la fois les interneurones excitateurs et les neurones de projection. De manière un peu plus générale Abraira et al., 2017 identifient environs 70% des neurones dans la LTMR-RZ comme étant excitateurs pour 30% d'inhibiteurs.

Les interneurones inhibiteurs assurent la mise en forme locale des signaux sensoriels via des circuits de **feedforward** (dans lesquels ils sont activés par l'afférence primaire et vont

inhiber un neurone de projection par exemple ou un autre interneurone) et des circuits de **feedback inhibition** (dans lesquels ils vont être activés par l'afférence primaire qu'ils vont inhiber en retour). Ces mécanismes sont essentiels pour filtrer et calibrer la transmission des informations nociceptives et tactiles vers les neurones de projection (Hughes and Todd, 2020).

Cette organisation de base — **projection ascendante vs traitement local**, **excitation vs inhibition** — constitue le fondement du fonctionnement microcircuitaire de la corne dorsale et prépare à une description plus fine de la diversité morphologique, électrophysiologique et neurochimique des interneurones.

Diversité morphologique et électrophysiologique

Les interneurones de la CDME présentent une **grande diversité morphologique** et fonctionnelle, reflétant la complexité du traitement sensoriel spinal. Les premières études morphologiques de ces neurones ont été réalisées en utilisant l'imprégnation de Golgi pour fournir un marquage clairsemé et aléatoire de certains types de neurones (Gobel, 1978; Lima and Coimbra, 1986). Aujourd'hui, la morphologie neuronale est étudiée à la suite d'un enregistrement par patch-clamp sur cellule entière à partir de coupes de moelle épinière *in vitro* (Grudt and Perl, 2002; Heinke et al., 2004; Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010). L'un des principaux avantages de cette approche est qu'elle permet de corréler la morphologie avec les propriétés électrophysiologiques, par exemple le profil de décharge de PA en réponse à un courant dépolarisant injecté.

Plusieurs classes morphologiques ont été identifiées parmi les neurones de la lamina I (Lima and Coimbra, 1986; Prescott and De Koninck, 2002) mais on sait peu de choses sur la correspondance de ces classes avec des interneurones inhibiteurs ou excitateurs. Le fait que cette couche contienne un grand nombre de neurones de projection rend cette analyse plus complexe. Les interneurones de la couche I se répartissent en trois principales classes morphologiques : neurones **fusiformes**, **pyramidaux** et **multipolaires** (***Figure 12***) (Lima and Coimbra, 1986; Prescott and De Koninck, 2002; Dougherty et al., 2005; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). L'arborisation dendritique de la plupart de ces neurones s'étendent principalement dans l'axe rostro-caudal, mais certains processus s'étendent le long de l'axe médio-latéral. Pour la plupart, les dendrites restent ainsi dans les limites de la lamina I. Cependant, certains sous-types cellulaires ont été décrits avec des dendrites s'étendant dans les couches II et III. La classification repose principalement sur la forme du corps cellulaire (allongé ; triangulaire ; rond) et l'orientation des dendrites primaires (allongé dans le sens rostro-caudal ; en forme de pyramide ; dans toutes les directions) (Lima and Coimbra, 1986; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). La lamina I, spécialisée dans la transmission nociceptive, ne sera pas approfondie ici, l'étude se focalisant sur les voies mécanosensorielles des couches plus profondes.

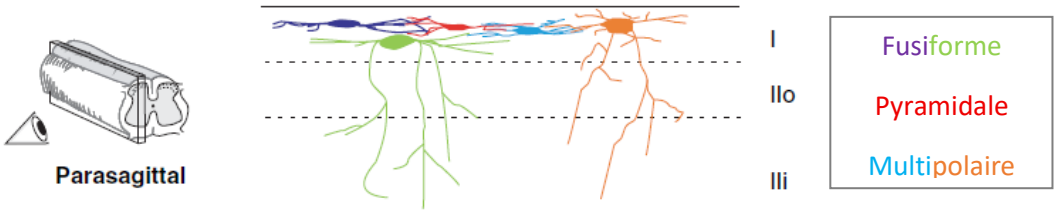


Figure 12 : Classification morphologique des neurones de la lamina I
Représentation schématique des différentes classes morphologiques de neurones provenant de la lamina I de la moelle épinière dans le plan parasagittal. Schéma d'après Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008

Les interneurones de la lamina II peuvent être classés en quatre types principaux (Grudt and Perl, 2002 ; ***Figure 13***):

- Les neurones en **îlots (*islet*)**, qui possèdent des arborescences dendritiques très allongées le long de l'axe rostro-caudal (> 300µm d'élongation).
- Les neurones **centraux**, qui ressemblent aux neurones en îlots, mais qui ont des arbres dendritiques beaucoup plus courts (< 300µm d'élongation).
- Les neurones **verticaux**, qui sont généralement situés dans la couche IIo et qui ont généralement des dendrites qui s'étendent ventralement à partir du soma dans un volume conique.
- Les neurones **radiaux**, qui ont des dendrites relativement courtes qui s'étendent le long des axes rostro-caudal et dorso-ventral.
- *(Les neurones non-classés qui ne peuvent entrer dans aucune de ces 4 catégories.)*

Pour chacune des classes, l'arborisation peut s'étendre plus ou moins aux couches adjacentes : les axones des cellules verticales s'étendent souvent dans la lamina I, et ces prolongements peuvent ainsi innerver les neurones de projection des voies antérolatérales dans cette lamina (Lu and Perl, 2005). En revanche, les axones des neurones en îlots, radiaux et centraux restent généralement centrés sur la lamina II, avec une certaine extension dans les laminae adjacentes (Todd, 2017). Bien que la majorité des neurones identifiés par Grudt et Perl puissent être classés dans l'une de ces catégories, environ 25 % de leur échantillon n'a pas pu être classé selon ce schéma.

Plusieurs travaux se sont intéressés à la correspondance entre la morphologie des neurones de la lamina II et leur phénotype neurochimique excitateur ou inhibiteur. Ces études ont combiné des approches électrophysiologiques et morphologiques, notamment le patch-clamp en cellule entière associé à l'identification du phénotype neurochimique par immunocytochimie (Maxwell et al., 2007; Yasaka et al., 2010) ou par utilisation de souris transgéniques marquant spécifiquement les neurones inhibiteurs (*VGAT:GFP* ou *GAD67:GFP*) (Hantman et al., 2004; Heinke et al., 2004; Punnakkal et al., 2014), ou par enregistrement à partir de paires de neurones connectées synaptiquement et caractérisation de la réponse de

la cellule postsynaptique (Lu and Perl, 2003). Il en ressort que les neurones en ilots sont invariablement inhibiteurs (Gobel, 1978; Hantman et al., 2004; Heinke et al., 2004; Yasaka et al., 2010). La majorité des neurones verticaux et radiaux sont excitateurs, bien qu'une fraction minoritaire présente des caractéristiques inhibitrices. Les neurones centraux constituent un groupe mixte, incluant à la fois des neurones excitateurs et inhibiteurs.

Ainsi, à l'exception des cellules en îlots, strictement inhibitrices, la morphologie seule ne permet pas de prédire avec certitude la nature fonctionnelle d'un neurone (Todd, 2017).

La lamina III peut être considérée comme le prolongement de la partie la plus ventrale de la lamina II, avec des neurones présentant des caractéristiques similaires à celles de la lamina II (décrits précédemment) (Wall et al., 1979; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008) là encore, l'association entre la morphologie et le phénotype neurotransmetteur est mal comprise.

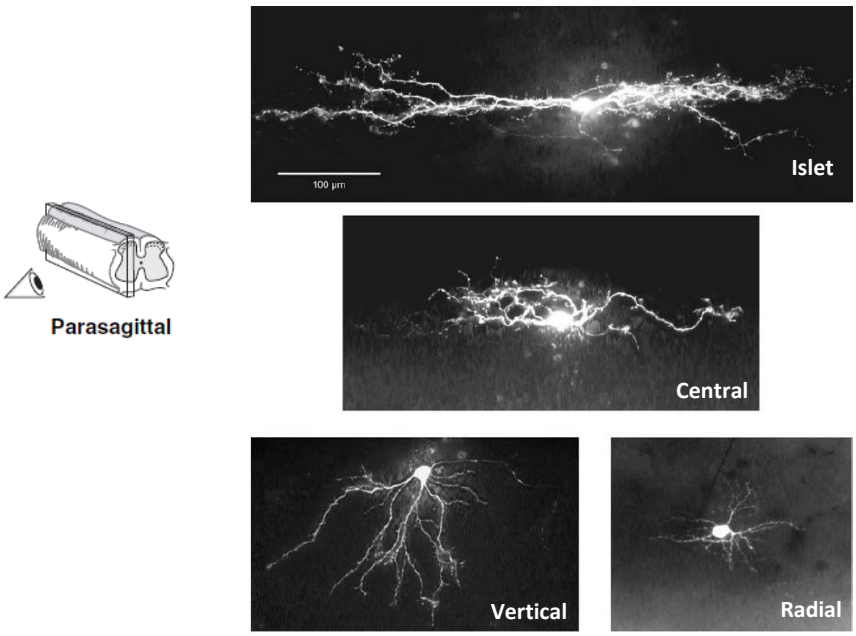


Figure 13: Morphologie des interneurones des laminae II-III
Images révélant la morphologie de neurones de type *islet, central, vertical et radial*, obtenues après injection de lucifer yellow (*islet, central, vertical*) ou de neurobiotine (*radial*). Chaque neurone ici illustré représente une catégorie de morphologie d'interneurones de la lamina II. Adapté de Heinke et al., 2004.

Sur le plan **électrophysiologique**, les interneurones de la corne dorsale présentent des profils de décharge variés en réponse à une stimulation dépolarisante, traduisant des propriétés intrinsèques distinctes (Prescott and De Koninck, 2002). Les neurones peuvent ainsi être classés selon leur profil de réponse en **décharge tonique** (soutenue, *tonic firing*), **phasique** (brève salve de potentiels d'action : *phasic firing*), **retardée** (retard à la première décharge : *delayed firing*), **transitoire** (décharge seulement au début de la stimulation : *transient firing*), ou encore **unique** (*single-spiking*) (***Figure 14***).

Les **réponses toniques ou soutenues** à une stimulation dépolarisante sont typiquement observées dans tous les neurones en îlots, ainsi que dans une fraction des neurones centraux et verticaux (Grudt and Perl, 2002; Yasaka et al., 2010). Ces neurones se caractérisent par une décharge régulière et prolongée pendant toute la durée du courant injecté. En configuration de voltage imposé, ils présentent un **courant entrant activé par hyperpolarisation (Ih)** marqué en début de stimulation, suivi d'une **rectification entrante modérée** à la fin, traduisant respectivement la contribution de canaux HCN et de conductances potassiques persistantes (***Figure 14.A***) (Ruscheweyh and Sandkühler, 2002).

Les **réponses retardées** se distinguent par un délai caractéristique avant l'apparition du premier PA après le début de la stimulation. Ce type de décharge est observé chez certains neurones verticaux et radiaux. Pendant cette phase de délai, le potentiel de membrane augmente lentement avant d'atteindre le seuil de déclenchement, puis les neurones présentent une **activité irrégulière ou des salves brèves à haute fréquence**. Ces profils retardés traduisent l'activation d'un **courant potassique transitoire I_A**, médié par les canaux Kv4.2/4.3, qui retarde l'atteinte du seuil d'excitabilité. En voltage imposé, ces neurones montrent également une **rectification entrante** et parfois un **Ih léger** (~25 pA) (***Figure 14.B***) (Grudt and Perl, 2002; Ruscheweyh and Sandkühler, 2002; Yasaka et al., 2010).

Enfin, les **réponses transitoires** — caractérisées par quelques PA initiaux suivis d'un silence complet — sont observées chez une partie des neurones centraux. Ces derniers peuvent être subdivisés en deux sous-types selon la présence ou non **d'un courant I_A sortant, sensible au 4-aminopyridine (4-AP)** : les neurones centraux transitoires I_A, qui présentent une forte adaptation initiale liée à l'inactivation rapide du courant (***Figure 14.C***), et les centraux transitoires non-I_A, dont la décharge s'interrompt pour d'autres raisons, possiblement une inactivation calcique ou sodique transitoire (***Figure 14.D***) (Grudt and Perl, 2002).

Ainsi, les courants I_A permettent de contrôler l'excitabilité neuronale en retardant le premier potentiel d'action ou en réduisant la fréquence de décharge, ce qui entraîne un déclenchement retardé, transitoire, interrompu ou reluctant (absence totale de PA durant la stimulation). Dans la corne dorsale, ces courants sont médiés par des canaux type Kv4, le Kv4.2 jouant un rôle particulièrement important (Grudt and Perl, 2002; Graham et al., 2008; Yasaka et al., 2010). Les études montrent également que ce courant est globalement associé aux interneurones excitateurs (Heinke et al., 2004; Yasaka et al., 2010). La suppression des courants I_A dans les souris Kv4.2$^{-/-}$ entraine une augmentation de l'excitabilité et de la fréquence de décharge des interneurones excitateurs, (puisque la majorité des inhibiteurs présentent déjà un profil tonique donc relativement insensible au courant I_A), ce qui se traduit chez ces souris par une sensibilité accrue aux stimuli tactiles et thermiques (Hu et al., 2006).

Afin de compléter cette classification des différents types neuronaux, des études immunohistochimiques et transcriptomiques ont permis de caractériser l'expression de différents marqueurs dans ces neurones.

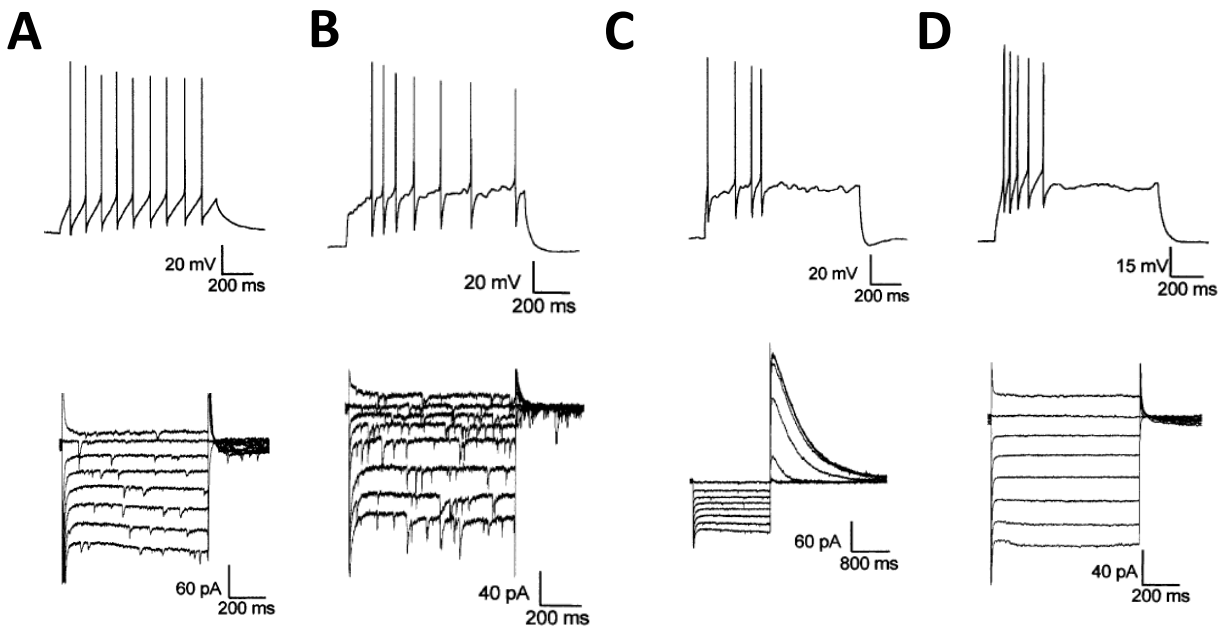


Figure 14 : Profils de décharge des interneurones des laminae II-III et les courants associés en configuration voltage imposé

(**A**) Haut : Exemple de trace d'un neurone en îlot à décharge tonique en courant imposé suite à une stimulation dépolarisante. Bas : Enregistrement en voltage imposé en partant de -60mV et par incrémentation de 10mV. **(B–D)** Traces obtenues selon les mêmes protocoles pour : (**B**) un neurone radial à décharge retardée, (**C**) un neurone central à décharge transitoire I_A et (**D**) un neurone central à décharge transitoire non-I_A. Adapté de Grudt and Perl, 2002.

Diversité neurochimique et transcriptomique des interneurones de la CDME

Bien que les propriétés morphologiques et électrophysiologiques puissent être utilisées pour classer certains des interneurones de cette région, aucune de ces deux classifications ni même l'association des deux n'a permis d'établir un système de classification complet. Les neurones des CDME expriment un large éventail de marqueurs neurochimiques, notamment des neuropeptides et leurs récepteurs, des protéines liant le calcium et diverses enzymes. Chacun de ces peptides/protéines est exprimé par des populations spécifiques de neurones : dans certains cas, ils sont limités aux cellules excitatrices ou inhibitrices, tandis que dans d'autres, on les trouve dans les deux types. Des études récentes ont défini cinq populations largement distinctes et relativement non chevauchantes parmi les interneurones inhibiteurs, sur la base de l'expression de 5 marqueurs (Sardella et al., 2011a; Polgár et al., 2013a; Boyle et al., 2017) (***Figure 15.A-B***) :

- le **neuropeptide Y (NPY)**, colocalise à 100% avec le facteur de transcription Pax2 (un facteur exprimé uniquement dans les neurones inhibiteurs et dont l'expression a été démontré dans l'ensemble des interneurones inhibiteurs des laminae I à III). Les neurones NPY^+ sont exprimés dans les laminae I à III (Boyle et al., 2017).

- la **parvalbumine (Pvalb)**, essentiellement exprimée par des neurones contenant du GABA et ou de la Glycine (70%). Les neurones Pvalb sont majoritairement localisés dans les laminae IIi et III et la plupart ont une arborisation dendritique très étendue dans l'axe rostro-caudale et appartiennent donc à la catégorie des neurones en îlots (Hughes et al., 2012; Abraira et al., 2017).
- **l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique neuronale (nNOS)**, exprimée par des neurones dispersés dans les cornes dorsales mais préférentiellement localisés dans les laminae IIi et III. La majorité des neurones nNos correspondent à des interneurones inhibiteurs colocalisant avec le GABA (Valtschanoff et al., 1992).
- la **calrétinine (CR)**, exprimée par une petite proportion d'interneurones inhibiteurs localisés dans les laminae I et II. La majorité des neurones exprimant la CR sont cependant des interneurones excitateurs (>85%) (Smith et al., 2015).
- la **galanine (Gal)** et la **dynorphine (Dyn),** sont coexprimés dans des interneurones majoritairement inhibiteurs (80%) (Duan et al., 2014), essentiellement situés dans les laminae I et IIo.

Enfin, le **récepteur à la somatostatine (sst2a)** présent dans les laminae I à III, semble présent uniquement dans des neurones inhibiteurs, mais est exprimé par plus de 50% des neurones inhibiteurs et colocalise largement avec les neurones Gal^+ et $nNos^+/GABA^+$, ce qui en fait un marqueur de neurones inhibiteurs mais pas un marqueur pertinent pour la séparation des interneurones en sous-populations distinctes (Iwagaki et al., 2013; Polgár et al., 2013a).

Comme évoqué ci-dessus, certains de ces marqueurs sont également exprimés dans les neurones excitateurs mais dans une moindre mesure, c'est notamment le cas de la Dyn, la nNOS et la Pvalb (Hughes and Todd, 2020). À elles toutes, ces populations représentent plus de la moitié des interneurones inhibiteurs et présentent des propriétés développementales et fonctionnelles distinctes (Hughes et al., 2012; Duan et al., 2014). Sur le plan morphologique, la diversité est importante : seule la population $Pvalb^+$ est majoritairement représentée par les neurones en îlots, tandis que les autres sous-populations présentent des morphologies variées et rarement de ce type (Todd, 2017).

Les progrès récents des approches de transcriptomique à cellule ou noyau unique (single-cell RNA-seq : scRNA-seq ; single-nucleus RNA-seq : snRNA-seq) ont profondément renouvelé cette classification, en permettant l'identification de signatures moléculaires uniques pour les différentes populations neuronales impliquées dans les réseaux de la moelle épinière (Häring et al., 2018a; Sathyamurthy et al., 2018; Russ et al., 2021). Les résultats d'Häring et al., 2018 menés sur des souris ont permis d'identifier 15 sous-types moléculaires distincts de neurones inhibiteurs (***Figure 15.C***) et 15 sous-types moléculaires de neurones excitateurs (***Figure 16.C***) dans la CDME. En parallèle, l'étude de Sathyamurthy et al., 2018 a

identifié 9 sous-types moléculaires de neurones inhibiteurs (***Figure 15.D***) et 16 sous-types moléculaires de neurones excitateurs (***Figure 16.D***). Les sous-types transcriptomiques identifiés dans ces deux études regroupent en grande partie les populations neurochimiquement définies par les approches immunohistochimiques. Les populations Gal/Dyn, NPY, CR et Pvalb correspondant respectivement aux clusters transcriptomiques Gaba1–3, Gaba5–7, Gaba8–9 et Gaba 14 identifiés dans Häring et al., 2018 (***Figure 15.B-C***). De même, les populations Gal/Dyn, nNos et NPY correspondent respectivement aux clusters transcriptomiques DI-2, DI-3 et DI-4 identifiés dans Sathyamurthy et al., 2018. Ces analyses transcriptomiques confirment donc la validité des classifications issues des approches immunohistochimiques tout en révélant une hétérogénéité bien plus fine. Ainsi, les technologies de **scRNA-seq** et **snRNA-seq** ont permis d'établir des **cartographies moléculaires complètes** des neurones de la CDME, offrant un cadre de référence détaillé pour comprendre la diversité fonctionnelle des circuits spinaux sensoriels (***Figure 15.C-D + 16.C-D***).

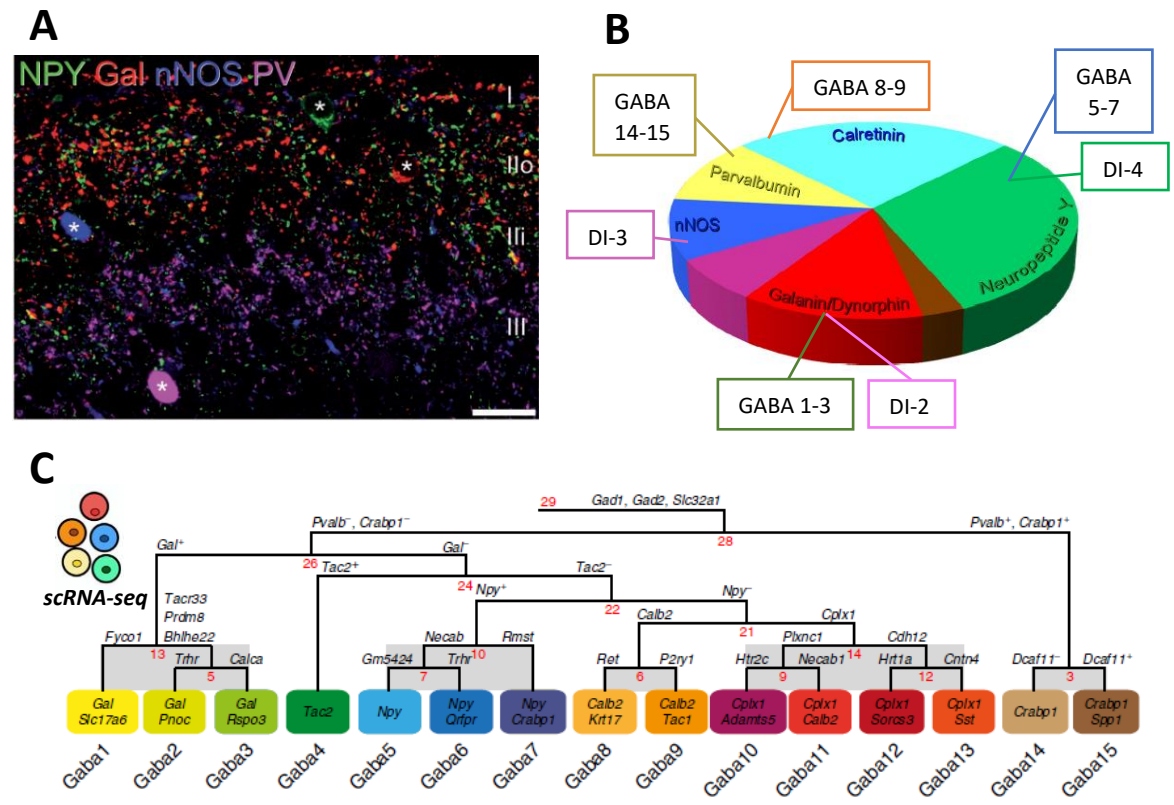


Figure 15 : Différentes sous-populations de neurones inhibiteurs sur la base neurochimique.
(**A**) Plan optique d'une image confocale d'immunohistochimie de section de moelle épinière lombaire de rat révélant 4 populations non-chevauchantes d'interneurones inhibiteurs exprimant NPY, Gal, nNos et Pvalb respectivement. La barre d'échelle correspond à 20µm. D'après Todd, 2017. (**B**) Le diagramme circulaire montre les proportions estimées de chaque population neurochimique. Il existe un chevauchement considérable entre les populations galanine/dynorphine (rouge) et nNOS (bleu), représenté en violet. De même, il existe un chevauchement limité entre les cellules galanine/dynorphine et la population NPY (vert), représenté en marron. Il convient de noter qu'il existe également un léger chevauchement entre la population NPY et les cellules nNOS et parvalbumine, qui n'est pas représenté sur le diagramme circulaire. Adapté de Boyle et al., 2017. Certaines de ces populations correspondent à des clusters moléculaires inhibiteurs identifiés dans les études de transcriptomique scRNA-seq (noté en groupe GABA) et snRNA-seq (notés en groupe DI) et représenté respectivement dans les panneaux (**C**) et (**D**). (**C**) Représentation hiérarchique des différents types neuronaux, en mettant l'accent sur les gènes définissant les divisions entre les types neuronaux. D'après Häring et al., 2018. (**D**) Pour chaque population, le nom du cluster, une attribution supposée du type cellulaire et les gènes marqueurs clés

sont indiqués. L'expression des gènes marqueurs dans les clusters est représentée sous forme de carte thermique de l'expression génique moyenne normalisée. Adapté de Sathyamurthy et al., 2018.

En ce qui concerne les neurones excitateurs, ils peuvent être divisés en quatre sous-populations majeures et distinctes basées sur l'expression non-chevauchante des 4 marqueurs immunohistochimiques suivants (Gutierrez-Mecinas et al., 2016) (***Figure 16.A***) :

- la **Neurokinin B (NKB)** est exprimée dans des neurones localisés au niveau des laminae IIi et III, dont la majorité co-exprime le marqueur PKCγ (enzyme protéine kinase C gamma)
- le **peptide de libération de la gastrine (GRP)** est plutôt localisé dans la partie centrale de la lamina II et montre peu de coexpression avec le marqueur PKCγ
- la **Neurotensine** est exprimée dans les laminae IIi et III, 76% co-exprime le marqueur PKCγ (enzyme protéine kinase C gamma) (Polgár et al., 1999)
- la **Substance P** est concentrée dans la lamina IIo et son expression ne chevauche pas avec celle de PKCγ

Ensemble ces 4 sous-populations correspondent à plus de la moitié des interneurones excitateurs des laminae I à III (Gutierrez-Mecinas et al., 2016).

La **somatostatine (SST)** peut être détectée dans 60 % des interneurones excitateurs des couches I-II, y compris la majorité de ceux appartenant aux populations de substance P, GRP, NKB et neurotensine. Cela indique que, contrairement à ces quatre neuropeptides, la somatostatine n'est pas limitée à une population spécifique parmi les interneurones excitateurs, ce qui, tout comme pour sst2a chez les interneurones inhibiteurs, en fait un marqueur de neurones excitateurs mais pas un marqueur pertinent pour la séparation des interneurones en sous-population distinctes. Cette observation corrobore la conclusion selon laquelle les cellules exprimant la somatostatine sont morphologiquement et électrophysiologiquement hétérogènes (Duan et al., 2014; Todd, 2017).

Tout comme pour les sous-populations d'interneurones inhibiteurs, les sous-populations d'interneurones excitateurs identifiés sur la base immunohistochimique ont été confirmées par les approches scRNA-seq et snRNA-seq, tout en révélant la présence d'une hétérogénéité marquée (***Figure 16.B-C***). Les populations NKB, Neurotensine et Substance P correspondant respectivement aux clusters transcriptomiques Glut5–7, Glut4 et Glut10-11 identifiés dans Häring et al., 2018 (***Figure 16.B***). De même, les populations NKB, GRP, Neurotensine et Substance P correspondent respectivement aux clusters transcriptomiques DE-5, DE-1, DE-6 et DE-11 identifiés dans Sathyamurthy et al., 2018 (***Figure 16.C***).

Nous noterons également l'expression du marqueur **Cholecystokinine (CCK)** correspondant aux clusters transcriptomiques Glut1 à 3 chez Häring et al., 2018 et DE-7 chez

Sathyamurthy et al., 2018, et connu pour être exprimés particulièrement dans les laminae II et III selon les études immunohistochimiques (Gutierrez-Mecinas et al., 2019).

A noter que **l'enzyme PKCγ** est un marqueur important des interneurones excitateurs des laminae IIi et III. Cependant, ce marqueur ne semble pas être spécifique d'une seule sous-population fonctionnelle, puisque les analyses immunohistochimiques et transcriptomiques ont montré que celui-ci co-exprime largement avec plusieurs autres marqueurs tels que la CCK, la SST, la NKB et la Neurotensine (Gutierrez-Mecinas et al., 2016; Häring et al., 2018a). En d'autres termes, PKCγ identifie un territoire fonctionnel (la frontière laminaire IIi/III) plutôt qu'une population moléculaire unique.

L'un des principaux avantages de l'utilisation de critères neurochimiques pour définir les sous-populations neuronales est qu'ils permettent un ciblage sélectif et reproductible de ces populations. En effet, l'expression de marqueurs spécifiques peut être exploitée pour enregistrer leurs propriétés électrophysiologiques ou pour manipuler directement leur activité via des approches génétiques. Par exemple, la recombinaison conditionnelle d'une opsine (optogénétique) ou d'un récepteur DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) (chémogénétique) sous le contrôle d'un promoteur spécifique permet d'activer ou d'inhiber sélectivement une population donnée, et ainsi d'étudier son rôle fonctionnel dans le traitement des différentes modalités sensorielles. Ce type de ciblage est en pratique bien plus précis que celui basé sur des critères morphologiques ou physiologiques seuls, qui ne permettent pas une manipulation spécifique *in vivo*. Ces approches ont d'ailleurs permis de révéler les effets de l'activation ou de l'inactivation de sous-populations d'interneurones sur les réponses à divers stimuli sensoriels, notamment nociceptifs ou prurigineux (Petitjean et al., 2015, 2019; Peirs and Seal, 2016).

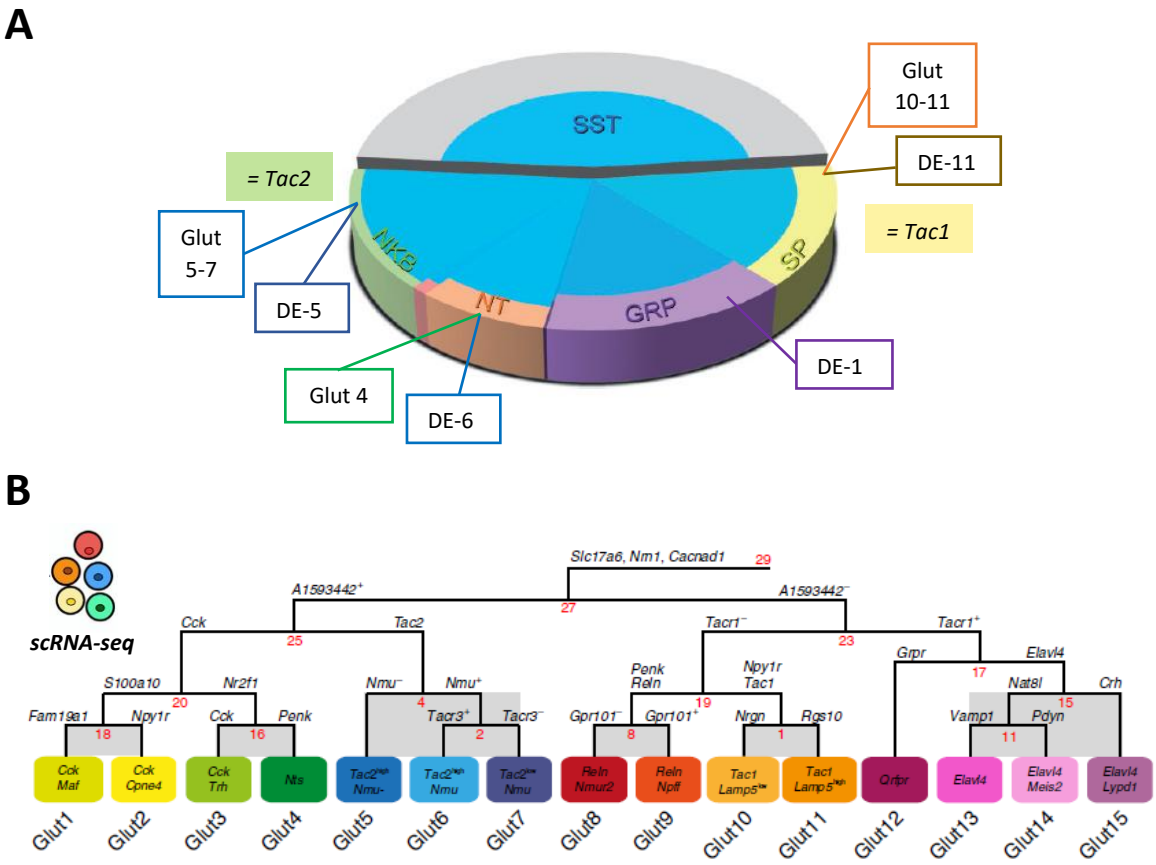


Figure 16 : Différentes sous-populations de neurones excitateurs identifiées sur la base neurochimique

(**A**) Le diagramme circulaire montre les proportions des neurones excitateurs qui expriment la neurokinine B (NKB), la neurotensine (NT), le peptide libérant la gastrine (GRP) ou la substance P (SP). Il convient de noter qu'il existe un chevauchement limité entre les cellules neurotensine et celles qui expriment la NKB ou le GRP. À elles quatre, ces populations représentent un peu plus de la moitié des neurones excitateurs des couches I-III. Contrairement à ces quatre neuropeptides, la somatostatine est largement exprimée parmi les neurones excitateurs (cela correspond à 60 à 90 % des cellules qui

expriment chacun des autres neuropeptides), ainsi que dans certains des neurones excitateurs restants. Adapté de Todd, 2017. Ces populations correspondent aux clusters moléculaires excitateurs identifiés dans les études transcriptomiques scRNA-seq (noté en groupe Glut) et snRNA-seq (notés en groupe DE) et représenté respectivement dans les panneaux (**B**) et (**C**). (**B**) Représentation hiérarchique des différents types neuronaux excitateurs, en mettant l'accent sur les gènes définissant les divisions entre les types neuronaux. D'après Häring et al., 2018. (**C**) Pour chaque population, le nom du cluster, une attribution supposée du type cellulaire et les gènes marqueurs clés sont indiqués. L'expression des gènes marqueurs dans les clusters est représentée sous forme de carte thermique de l'expression génique moyenne normalisée. Adapté de Sathyamurthy et al., 2018. *Dans les panneaux (B) et (C) la neurotensine est notée Nts, la substance P est notée Tac1 et la neurokinine B est notée Tac2.*

II.B-3) Connectivité et rôle fonctionnel des différentes sous-populations d'interneurones

Les interneurones Pvalb$^+$ reçoivent des entrées provenant des afférences primaires LTMRs (Heinke et al., 2004), leur axone est largement restreint aux laminae II-III où ils contactent notamment d'autres interneurones Pvalb$^+$, des interneurones excitateurs verticaux et des interneurones PKCγ$^+$. Les interneurones Pvalb$^+$ forment également des synapses sur les terminaisons des afférences primaires myélinisées Aδ et Aβ projetant dans les laminae IIi et III (Heinke et al., 2004; Hughes et al., 2012; Petitjean et al., 2015; Abraira et al., 2017). Cette sous-population d'interneurones inhibiteurs est ainsi à l'origine d'une importante partie des synapses axo-axoniques qui interviennent dans l'inhibition présynaptique des informations sensorielles mécaniques cutanées dans cette région. Ces neurones font donc partie intégrante des glomérules synaptiques décrits précédemment avec une même terminaison de neurone Pvalb$^+$ en contact à la fois avec les terminaisons centrales des afférences primaires et les dendrites post-synaptiques (Hughes et al., 2012; Petitjean et al., 2015). Ainsi, l'ablation génétique de la population Pvalb entraîne une allodynie mécanique mais pas d'allodynie thermique à des stimuli initialement inoffensifs. Inversement, l'activation des interneurones Pvalb$^+$ atténue l'hypersensibilité mécanique observée chez les souris neuropathiques. Les neurones Pvalb$^+$ contactent également des interneurones excitateurs PKCγ$^+$ situés dans la lamina IIi. La levée de l'inhibition exercée par les interneurones Pvalb$^+$ sur ces interneurones PKCγ$^+$ permettrait ainsi à ces derniers de relayer anormalement les signaux tactiles vers les voies nociceptives, contribuant à l'apparition d'une allodynie mécanique. Ensemble, ces résultats démontrent que les interneurones Pvalb$^+$ contrôlent notamment l'allodynie mécanique (***Figure 17***) (Petitjean et al., 2015).

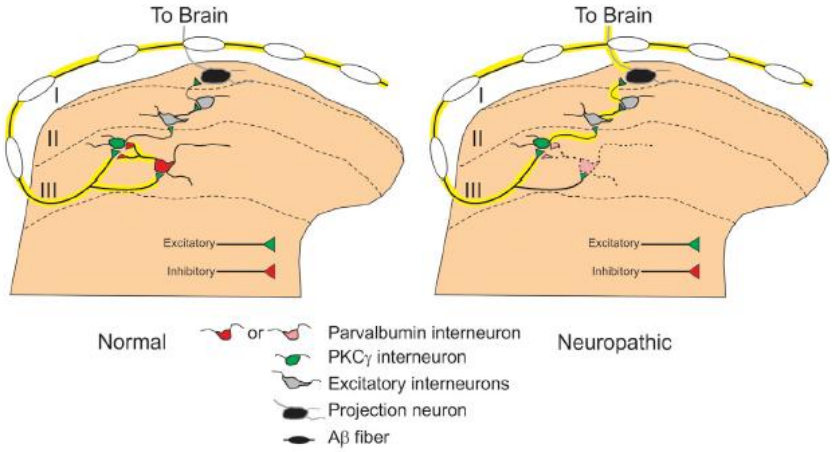


Figure 17 : Microcircuit entre les interneurones inhibiteurs Pvalb et les interneurones excitateurs PKCγ

En condition physiologique (schéma de gauche) l'afférence Aβ-LTMRs contacte à la fois les interneurones PKCγ et Pvalb, l'activation de Pvalb permet ainsi de fermer le portillon (gate control theory) pour empêcher la transmission d'un message considéré comme nociceptif aux neurones de projection nociceptifs des lamina I. En condition neuropathique (schéma de droite) de nombreuses connections entre le neurone Pvalb et le neurone PKCγ sont perdues levant ainsi l'inhibition des neurones PKCγ qui va induire l'activation des neurones de projection nociceptifs de la lamina I et le stimulus mécanique inoffensif devient alors douloureux (allodynie). D'après Petitjean et al., 2015.

Les interneurones nNOS$^+$ sont innervés par des afférences primaires finement myélinisés, ainsi que par des nocicepteurs non sensibles à la capsaïcine. Les terminaisons nNOS$^+$ entrent en contact avec les cellules géantes de la couche I et peuvent aussi contacter interneurones PKCγ$^+$ excitateurs des couches II et III (Puskár et al., 2001; Sardella et al., 2011b). L'activation des interneurones nNOS$^+$ supprime les réponses aux stimuli mécaniques et thermiques (Huang et al., 2018) mais peut paradoxalement induire des démangeaisons spontanées, suggérant une fonction bidirectionnelle dans le contrôle du prurit.

Les interneurones NPY$^+$ de la corne dorsale reçoivent des entrées multimodales provenant des LTMRs (Bourane et al., 2015; Tashima et al., 2021) et des fibres C non sensibles à la capsaïcine, qui transmettent des stimuli mécaniques nocifs (Polgár et al., 2013b). Ces interneurones jouent un rôle central dans le contrôle inhibiteur des circuits nociceptifs et pruritoceptifs. Leur activation empêche le développement de l'hypersensibilité mécanique et thermique observée dans les modèles de douleur inflammatoire et neuropathique, tandis que leur ablation provoque des démangeaisons spontanées et une réponse exacerbée aux pruritogènes (Boyle et al., 2023). Sur le plan synaptique, les interneurones NPY$^+$ établissent des connexions inhibitrices sur des neurones excitateurs GRP$^+$, eux-mêmes en amont des neurones exprimant le récepteur du GRP (GRPR), constituant ainsi un microcircuit NPY–GRP/GRPR essentiel à la régulation du prurit. La désactivation des interneurones NPY$^+$ ou la perturbation de ce circuit entraîne une désinhibition des neurones GRP$^+$/GRPR$^+$, favorisant la transmission prurigineuse (***Figure 18***). Enfin, les travaux récents de Zeng et al., 2025 ont par

ailleurs montré que les opioïdes injectés par voie intrathécale agissent sur les récepteurs μ-opioïdes (MOR) exprimés par les interneurones NPY$^+$, provoquant une désinhibition du circuit GRP–GRPR, à l'origine du prurit induit par les opioïdes.

Les interneurones Dyn$^+$ et Gal$^+$ auraient un rôle dans le contrôle des informations transmises par les afférences primaires LTMRs en supprimant l'activité des neurones excitateurs agissant eux-mêmes dans les voies de signalisation de la douleur mécanique et la démangeaison. Ces neurones ont en effet pour cibles post-synaptiques des interneurones excitateurs jouant un rôle clé dans les voies de signalisation de la douleur tels que les neurones exprimant la somatostatine (Duan et al., 2014), les neurones exprimant le récepteur du GRP (Huang et al., 2018), ainsi que les neurones de projection spinoparabrachiaux de la lamina I (Brewer et al., 2020). En effet, l'activation chémogénétique des interneurones Dyn$^+$ atténue la réponse aux agents pruritogènes (Huang et al., 2018) et inversement l'inhibition de ces interneurones augmente la démangeaison (Boyle et al., 2023). De même, l'activation des interneurones Gal$^+$ réduit la démangeaison en réponse aux pruritogènes et, inversement, leur ablation génétique conduit à une amélioration des réponses de démangeaison, sans affecter les réponses nociceptives. Au niveau du circuit, les effets de la Dyn et de la Gal passent par une inhibition des interneurones excitateurs exprimant le récepteur au GRP qui sont impliqués dans les voies de la démangeaison (Liu et al., 2019). De façon intéressante, dans une autre étude, l'ablation génétique des interneurones Dyn$^+$ n'affecte pas les démangeaisons mais induit une allodynie mécanique via activation des voies de signalisation douloureuse par les fibres Aβ (Duan et al., 2014). Ces contradictions pourraient être liées aux conditions des deux études, puisque dans l'une, les DREADDq ont été exprimés dans tous les neurones matures exprimant la dynorphine (Huang et al., 2018), alors que dans l'autre, une stratégie d'ablation intersectionnelle a été utilisée capturant ainsi la population d'interneurones inhibiteurs exprimant transitoirement la dynorphine mais excluant les interneurones excitateurs Dyn$^+$ et également 40% des interneurones inhibiteurs Gal$^+$ (Duan et al., 2014). Du fait de ces différences, les populations de neurones manipulées dans ces deux études ne se chevauchent que partiellement, ce qui pourrait expliquer la divergence dans les résultats obtenus (Stachowski and Dougherty, 2021).

Les interneurones CR$^+$ sont activés à la fois par les stimulations mécaniques et chimiques nociceptives. Puisque cette population de neurone est présente chez les interneurones excitateurs et inhibiteurs des stratégies intersectionnelles seront nécessaires pour déterminer leur fonction (Stachowski and Dougherty, 2021).

Les neurones excitateurs CCK$^+$ et inhibiteurs Rorβ$^+$ sont nécessaires dans la peau glabre et la peau velue pour la discrimination des textures et la sensation tactile, respectivement (Abraira et al., 2017).

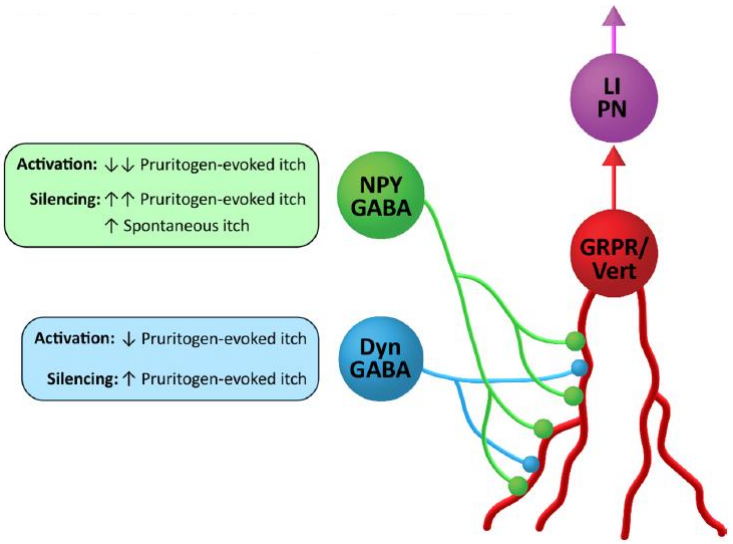


Figure 18 : Rôle des interneurones inhibiteurs NPY⁺ et Dyn⁺ dans le contrôle de la démangeaison

Circuit impliqué dans la suppression de la démangeaison : les neurones NPY⁺ sont à l'origine d'une grande part des synapses inhibitrices sur les interneurones excitateurs GRPR verticaux (« vert ») dont le rôle est de transmettre les démangeaisons et douleurs associées, aux neurones de projection spinaux de la lamina I. Les neurones Dyn⁺ apportent également de l'inhibition à ces neurones GRPR mais dans une moindre mesure par rapport aux neurones NPY⁺. D'après Boyle et al., 2023.

⇨ Ainsi, malgré les avancées considérables des approches moléculaires et fonctionnelles, la CDME demeure un réseau d'une extrême complexité. Les interneurones inhibiteurs et excitateurs forment un ensemble finement équilibré où chaque sous-population contribue, à des degrés variables, à la modulation des différentes modalités tactiles, soulignant la nécessité de poursuivre leur caractérisation fonctionnelle.

II.C) Voies ascendantes

Après avoir subi un premier niveau d'intégration dans les CDME, l'information tactile est transmise vers les structures d'ordre supérieur.

Les neurones de projection de la corne dorsale qui transmettent les informations tactiles inoffensives se trouvent principalement dans les laminae profondes de la corne dorsale et représentent deux grandes populations neuronales : les **neurones postsynaptiques des cordons dorsaux** (PSDC : *PostSynaptic Dorsal Column*) (Rustioni and Kaufman, 1977) et les **neurones du tractus spinocervical** (SCT : *SpinoCervical Tract*).

La plupart des corps cellulaires des neurones PSDC résident majoritairement dans la lamina IV plus précisément au niveau de la frontière entre les laminae III-IV (Giesler et al., 1984; Abraira et al., 2017) ainsi que dans la région médiale de la lamina V. Bien que l'on ait initialement pensé que les cordons dorsaux étaient composés exclusivement de branches

ascendantes des Aβ-LTMRs, on sait depuis longtemps que de nombreuses fibres des cordons dorsaux proviennent des neurones de la substance grise de la corne dorsale et envoient leurs axones jusqu'au cerveau (Brown, 1981). Ces neurones à longue projection sont donc appelés neurones PSDC, et ils envoient leurs axones à travers les cordons dorsaux, entremêlés avec les axones des Aβ-LTMRs (qui eux forment la voie directe des cordons dorsaux : DC), pour former une synapse sur les neurones des noyaux de la colonne dorsale (DCN : *Dorsal Column Nuclei*) situé dans le tronc cérébral et plus précisément dans le bulbe rachidien. Le DCN est en fait composé de deux noyaux, le noyau cunéiforme (CN : *Cuneate Nucleus*) qui reçoit les entrées PSDC et DC provenant de la moelle épinière cervicale et thoracique supérieure (c'est-à-dire les entrées tactiles provenant du haut du corps), et le noyau gracile (GN : *Gracile Nucleus*) innervé par les PSDC et DC provenant de la moelle épinière thoracique inférieur et lombo-sacrée. Cette organisation permet une somatotopie précise des projections (de Pommery et al., 1984; Giesler et al., 1984). À partir des DCN, les neurones de deuxième ordre décussent en remontant par la voie du lemnisque médian pour former des synapses sur le complexe nucléaire postérieur ventral (VPN : *Ventral Posterior Nuclear*) controlatéral du thalamus (***Figure 19.A***).

La deuxième voie ascendante majeure transportant les informations tactiles légères vers le cerveau est le **SCT** qui reçoit et transmet des informations provenant majoritairement de la peau poilue. Ses cellules d'origine, les neurones SCT, sont situés au niveau de la lamina IV de la CDME. Leurs projections remontent à travers la substance blanche dorsolatérale et établissent une synapse sur le noyau cervical latéral (LCN : *Lateral Cervical Nucleus*) situé au niveau des segments médullaires cervicaux 1 à 3 (C1 à C3) ipsilatéraux. Les axones des neurones du LCN décussent à leur tour dans la commissure dorsale de la moelle épinière et remontent via le lemnisque médian (où ils rejoignent la voie DC/PSDC) pour former une synapse sur les neurones du VPN controlatéral du thalamus (***Figure 19.B***) (Morin, 1955; Abraira and Ginty, 2013).

À partir du VPN, les neurones de troisième ordre transportant des informations inoffensives provenant de ces voies font synapse sur le cortex somatosensoriel (Abraira and Ginty, 2013). La majorité des neurones de projection impliqués dans la transmission des perceptions de la douleur et de la température sont concentrés dans la lamina I et dispersés dans les laminae III à VI des CDME. Ces neurones forment le tractus antérolatéral et projettent de manière controlatérale à travers la substance blanche antérolatérale vers les centres cérébraux tels que la formation réticulaire, la substance grise périaqueducale, l'hypothalamus et le thalamus (Abraira and Ginty, 2013; Wang et al., 2022)

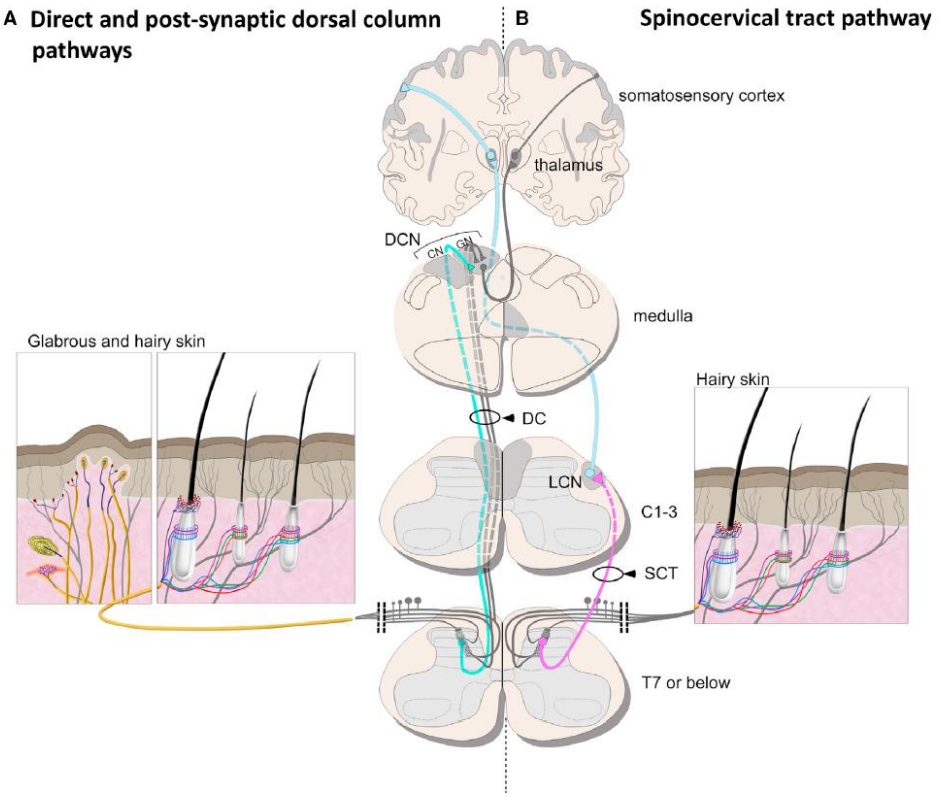


Figure 19 : Voies ascendantes du toucher léger

Représentation des différences anatomiques et morphologiques entre les voies ascendantes (**A**) directe et indirecte post-synaptique, des cordons dorsaux et (**B**) la voie du tract spinocervical. D'après (Abraira and Ginty, 2013)

⇨ L'information tactile ainsi véhiculée par les voies ascendantes est ensuite intégrée et interprétée dans différents centres supraspinaux, tels que le thalamus et le cortex somatosensoriel primaire, où elle acquiert sa dimension perceptive et cognitive. Ces processus d'intégration centrale, bien qu'essentiels à la perception consciente du toucher, ne seront pas développés dans ce manuscrit, notre travail se concentrant sur le traitement spinal de l'information, et plus particulièrement la manière dont ce traitement peut être altéré dans l'autisme et le SXF. En effet, une des origines des différences de sensibilité tactile observées dans l'autisme pourrait être liée à un déséquilibre précoce des mécanismes inhibiteurs spinaux, encore largement inexplorés dans ce contexte. La section suivante est donc consacrée à l'étude du système GABAergique.

INTRODUCTION : CHAPITRE III

LE SYSTEME GABAERGIQUE

III – Le système GABAergique

III.A) Généralités

III.A-1) Synthèse, libération et recapture du GABA

Le GABA (γ-aminobutyric acid) est synthétisé à partir de la décarboxylation du glutamate, principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central, grâce à l'enzyme glutamate decarboxylase (GAD). Il existe deux isoformes de cette enzyme, issues de deux gènes distincts :

- **GAD65** (codée par le gène *Gad2*) préférentiellement localisée dans les terminaisons axonales et directement associée aux vésicules synaptiques. Ainsi, lorsque le glutamate est présent dans le cytosol présynaptique, il peut rapidement être utilisé pour le stockage vésiculaire du GABA (Jin et al., 2003; Roth and Draguhn, 2012).

- **GAD67** (codée par le gène *Gad1*) particulièrement située au niveau somato-dendritique.

Une fois synthétisé, le GABA est stocké dans des vésicules synaptiques grâce aux transporteurs vésiculaires du GABA (VGAT) ou aux transporteurs vésiculaires des acide aminés inhibiteurs (VIAAT). Lors de la dépolarisation du neurone présynaptique, l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants déclenche la fusion des vésicules avec la membrane et ainsi, la libération du GABA dans la fente synaptique. Le GABA peut alors se fixer à des récepteurs post- ou présynaptiques. Afin de stopper l'action du signal inhibiteur, le GABA est recyclé via des transporteurs membranaires spécifiques (GAT-1 et GAT-3) exprimés respectivement sur les terminaisons nerveuses et les astrocytes. Dans les astrocytes, le GABA est transaminé avec l'α-ketoglutarate par la GABA-transminase (GABA-T) en succinate semialdéhyde réutilisé ensuite dans le cycle métabolique. On estime que 90% du GABA est dégradé de cette façon. GABA-T produit également du glutamine qui peut ensuite être recapté par le neurone pour être réintroduit dans le pool de façon à être retransformé en glutamate puis en GABA (***Figure 20***) (Roth and Draguhn, 2012; Braga et al., 2024).

Parallèlement, le glutamate peut être recapté par la terminaison présynaptique via les transporteurs EAAC1 et EAAC3 (Excitatory amino acid carrier), et reconverti en GABA par les enzymes GAD, constituant ainsi une voie alternative d'approvisionnement (Conti et al., 1998; Roth and Draguhn, 2012).

III.A-2) Récepteurs GABA

Il existe deux principaux types de récepteurs au GABA :

- Le récepteur **ionotropique $GABA_A$** : correspond à un assemblage pentamérique de sous-unités α, β, γ, δ etc… qui forment en leur centre un canal ionique perméable au chlore (Cl^-) et dans une moindre mesure : au bicarbonate. Il existe une grande diversité de sous-unités (α_{1-6}, β_{1-3}, γ_{1-3}, δ, ε, θ, π and ρ_{1-3}) ce qui permet d'obtenir une grande hétérogénéité de combinaison pour composer un récepteur. La stœchiométrie n'est pas aléatoire ainsi les récepteurs contiennent généralement 2 sous-unités α, 2 sous-unités β et l'une des sous-unités γ, δ, ε ou π mais des exceptions à cette règle peuvent être observées. La composition des sous-unités dépend fortement de la région où le récepteur est situé et elle influence considérablement la sensibilité aux médicaments (Van Der Aa and Kooy, 2020). En condition physiologique, l'activation d'un récepteur $GABA_A$ génère une hyperpolarisation membranaire qui diminue la probabilité de décharge du neurone (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 2007).

- Le récepteur **métabotropique $GABA_B$** : est un hétérodimère constitué de deux sous-unités R1 et R2. Il opère au travers de l'activation d'une protéine Gi ou Go capables d'induire l'activation des canaux potassiques à rectification entrante (GIRK ou Kir3) qui sous-tendent la phase tardive du potentiel postsynaptique inhibiteur et induisent donc une inhibition plus prolongée. L'activation de ces récepteurs peut également moduler la production d'AMPc, ce qui entraine un large panel d'actions sur des canaux ioniques ou protéines cibles de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et donc de moduler les fonctions synaptiques et neuronales (Ben-Ari et al., 2007).

Ces deux types de récepteurs sont présents en pré- et postsynaptiques, même s'il semble que les $GABA_A$ soient préférentiellement localisés en postsynaptique et les $GABA_B$ en présynaptique (Ben-Ari et al., 2007).

La transmission GABAergique ne dépend pas uniquement de la concentration de GABA dans la fente synaptique, mais est également modulée par de nombreux facteurs endogènes et agents pharmacologiques qui influencent la sensibilité, la cinétique et la conductance des récepteurs. Les récepteurs $GABA_A$ possèdent plusieurs sites allostériques permettant la modulation positive ou négative de leur activité. Parmi les modulateurs allostériques positifs, qui facilitent l'action du GABA, on note notamment les benzodiazépines, les barbituriques, les neurostéroïdes endogènes et l'éthanol. La pricrotoxine et la bicuculline agissent comme antagonistes, bloquant le canal Cl^- et réduisant ainsi l'inhibition. Les récepteurs $GABA_B$ sont modulés plus lentement, mais leur influence est cruciale pour la régulation à long terme de l'excitabilité neuronale : le baclofène est un agoniste sélectif renforçant l'inhibition

présynaptique. Alors que le CGP55845 ou le saclofen sont des antagonistes sélectifs (Owens and Kriegstein, 2002).

L'équilibre entre l'activité inhibitrice et excitatrice est crucial pour le fonctionnement normal des réseaux neuronaux. Une altération de la synthèse, du relargage ou du fonctionnement des récepteurs du GABA peut notamment entraîner une hyperexcitabilité neuronale, comme observé dans plusieurs pathologies neurodéveloppementales, notamment l'autisme, le syndrome de l'X fragile et l'épilepsie (Cellot and Cherubini, 2014).

De manière générale, l'inhibition dans les CDME module le codage des informations sensorielles et nociceptives en limitant la transmission des messages sensoriels vers les centres supraspinaux. Il en résulte des effets antinociceptifs pouvant éventuellement modifier l'intensité de la douleur perçue, par exemple l'inhibition optogénétique des neurones exprimant la GAD65 dans la CDME entraîne un abaissement du seuil de sensibilité mécanique, et donc une hypersensibilité mécanique (Bonin et al., 2016). À l'inverse, l'excitation optogénétique de ces neurones entraîne une hyposensibilité mécanique (Ferrini et al., 2020).

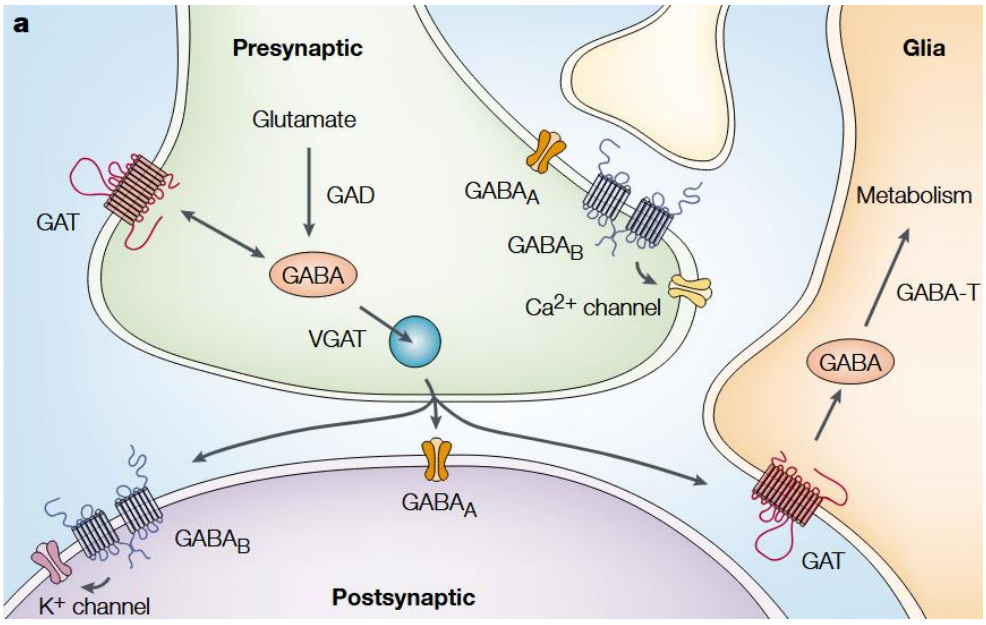


Figure 20 : Synthèse, libération et recapture du GABA
Le GABA est synthétisé à partir du glutamate grâce à la GAD, puis est envoyé dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire VGAT. Une fois libéré dans la fente synaptique il peut agir sur les récepteurs postsynaptiques $GABA_A$ et $GABA_B$ mais aussi sur les autorécepteurs de même type au niveau présynaptique. Le GABA est ensuite recapté par la GAT présynaptique pour être renvoyé dans une vésicule. Il existe également des GAT au niveau des astrocytes environnants dans lesquels le GABA sera transformé en glutamine qui pourra être transporté dans le bouton présynaptique pour être retransformé en GABA (non représenté sur ce schéma). Dans les astrocytes le GABA est aussi catabolisé par la GABA-T. D'après Owens and Kriegstein, 2002.

III.B) Transmission synaptique GABAergique dans le système somatosensoriel spinale

III.B-1) Emergence des neurones GABA$^+$

Le développement des neurones GABAergiques dans la moelle épinière suit un schéma spatio-temporel bien défini, caractérisé par une progression rostro–caudale et un gradient ventro–dorsal (Allain et al., 2011).

L'immunohistochimie réalisée sur des coupes de moelle épinière de souris à différents stades du développement embryonnaire (E9.5 à P0) a permis de décrire avec précision l'émergence et la maturation de ces neurones GABA$^+$. L'immunoréactivité au GABA apparaît pour la première fois vers E11.5, initialement dans les segments cervico-brachiaux les plus rostraux. À E12.5, les premiers corps cellulaires GABA$^+$ sont observés à tous les niveaux de la moelle, mais leur distribution reste ventrale. À partir de E13.5, quelques neurones GABA$^+$ commencent à coloniser les régions dorsales, annonçant la formation des interneurones inhibiteurs de la corne dorsale. Entre E15.5 et E17.5, une expansion marquée de la population GABA$^+$ est observée : les somas GABAergiques se distribuent alors dans l'ensemble de la substance grise, tandis que des fibres GABA$^+$ apparaissent dans la substance blanche ventrale et latérale. Ce stade correspond à la mise en place progressive des réseaux inhibiteurs spinaux. À la naissance (P0), la densité globale du marquage GABA diminue légèrement, traduisant probablement une maturation fonctionnelle et une redistribution subcellulaire du GABA au sein des circuits établis. À ce stade, les neurones GABA$^+$ sont principalement localisés dans les régions dorsales, où ils contribueront à la modulation sensorielle et à l'équilibre excitation–inhibition caractéristique de la moelle épinière adulte (Allain et al., 2011; Wu and Sun, 2015).

Ainsi, la mise en place du système GABAergique spinal se déroule selon un programme développemental séquentiel, d'abord limité aux régions ventrales motrices, puis progressivement étendu vers les régions dorsales sensorielles.

Après la mise en place progressive des réseaux GABAergiques au cours du développement, ces circuits connaissent une maturation fonctionnelle marquée par une évolution des propriétés de la transmission inhibitrice. Cette étape cruciale, abordée dans la section suivante, repose notamment sur des changements dans la régulation ionique du GABA et la polarité de son action.

III.B-2) Maturation fonctionnelle du GABA

Au cours des premiers stades du développement neuronal, le GABA, agissant sur les récepteurs $GABA_A$, exerce une action excitatrice sur les neurones immatures, contrairement à son rôle inhibiteur observé dans le système nerveux central adulte (Ben-Ari et al., 1994). Cette propriété paradoxale s'explique par un potentiel d'équilibre du chlore Cl^- (E_{Cl}) plus dépolarisé que le potentiel de repos du neurone (RMP), traduisant une forte concentration intracellulaire en ions chlorure $[Cl^-]_i$ dans les neurones néaonataux (Ben-Ari et al., 1989). Chez les rongeurs, de nombreuses études ont montré que l'activation des récepteurs $GABA_A$ induit, dans les neurones immatures, une dépolarisation accompagnée d'une élévation de la concentration intracellulaire en calcium ($[Ca^{2+}]_i$). Cet effet disparaît à l'âge adulte et a été observé dans différentes structures du système nerveux central, y compris la moelle épinière (Serafini et al., 1995; Ben-Ari, 2002).

Les enregistrements en patch-clamp perforé, qui préservent la concentration endogène en ions chlorure, ont révélé une modification progressive de E_{Cl} au cours du développement. Par exemple, dans les neurones de l'olive supérieur latérale, E_{Cl} passe de –46 à –82 mV entre la naissance et le dixième jour postnatal (P10) (***Figure 21.A***). Ce changement est attribué principalement à une diminution de $[Cl^-]_i$ confirmée par des mesures d'imagerie spécifiques (Kuner and Augustine, 2000; Ben-Ari, 2002). Cette diminution de 40 à 20 mM est en effet suffisante pour transformer l'action du GABA d'excitateur à inhibiteur (***Figure 21.B***).

Un ensemble croissant de données indique que cette régulation dépendante du développement est contrôlée par les transporteurs cation-chlorure, qui modulent $[Cl^-]_i$. Deux co-transporteurs jouent un rôle central :

- le **cotransporteur Na^+-K^+-$2Cl^-$ (NKCC1)** dirige le Cl^- vers l'intérieur et donc augmente la $[Cl^-]i$
- et le **cotransporteur K^+-Cl^- (KCC2)** qui diminue la $[Cl^-]_i$ en envoyant le Cl^- vers l'extérieur et de façon à réduire E_{Cl}.

Le co-transporteur NKCC1 très présent dans les neurones immatures, utilise les gradients de sodium (Na^+) et de potassium (K^+) pour accumuler le Cl^- à l'intérieur du neurone, et est donc responsable de la forte $[Cl^-]_i$ mesurée notamment dans les neurones sensoriels des DRG et les neurones néocorticaux (***Figure 21.C***) (Fukuda et al., 1998; Ikeda et al., 2003). Cependant, de nombreuses études montrent que le principal déterminant du basculement fonctionnel du GABA est l'expression de KCC2. En effet, l'augmentation progressive de son expression au cours du développement est corrélée au passage du GABA d'excitateur à inhibiteur (***Figure 21.D***). Par ailleurs, la surexpression expérimentale de KCC2 dans des neurones immatures induit ce changement, tandis que l'inactivation du gène KCC2 l'empêche (Rivera et al., 1999; Ganguly et al., 2001).

L'expression de KCC2 est elle-même régulée par l'activité GABAergique. Ainsi, le blocage des récepteurs $GABA_A$ par la bicuculline ou la picrotoxine empêche l'apparition du transporteur et maintient une action dépolarisante du GABA. En revanche, le blocage des récepteurs glutamatergiques ne modifie pas ce processus, indiquant que la transition est spécifiquement médiée par l'activation des synapses GABAergiques. D'autre part, l'application continue de tétrodotoxine, qui inhibe les PA et l'activité synaptique globale, n'empêche pas la maturation de la réponse GABAergique. Cela suggère que les courants postsynaptiques miniatures, produits par une libération spontanée et quantique de GABA, sont suffisants pour déclencher l'expression de KCC2 et la diminution de $[Cl^-]_i$ (Ganguly et al., 2001; Ben-Ari, 2002).

En somme, le passage du GABA d'un rôle excitateur à un rôle inhibiteur dépend d'une maturation progressive des mécanismes de régulation du chlore. Cette transition est rendue possible par l'augmentation de l'expression du transporteur KCC2, sous l'influence de l'activité GABAergique tonique (Ben-Ari, 2002).

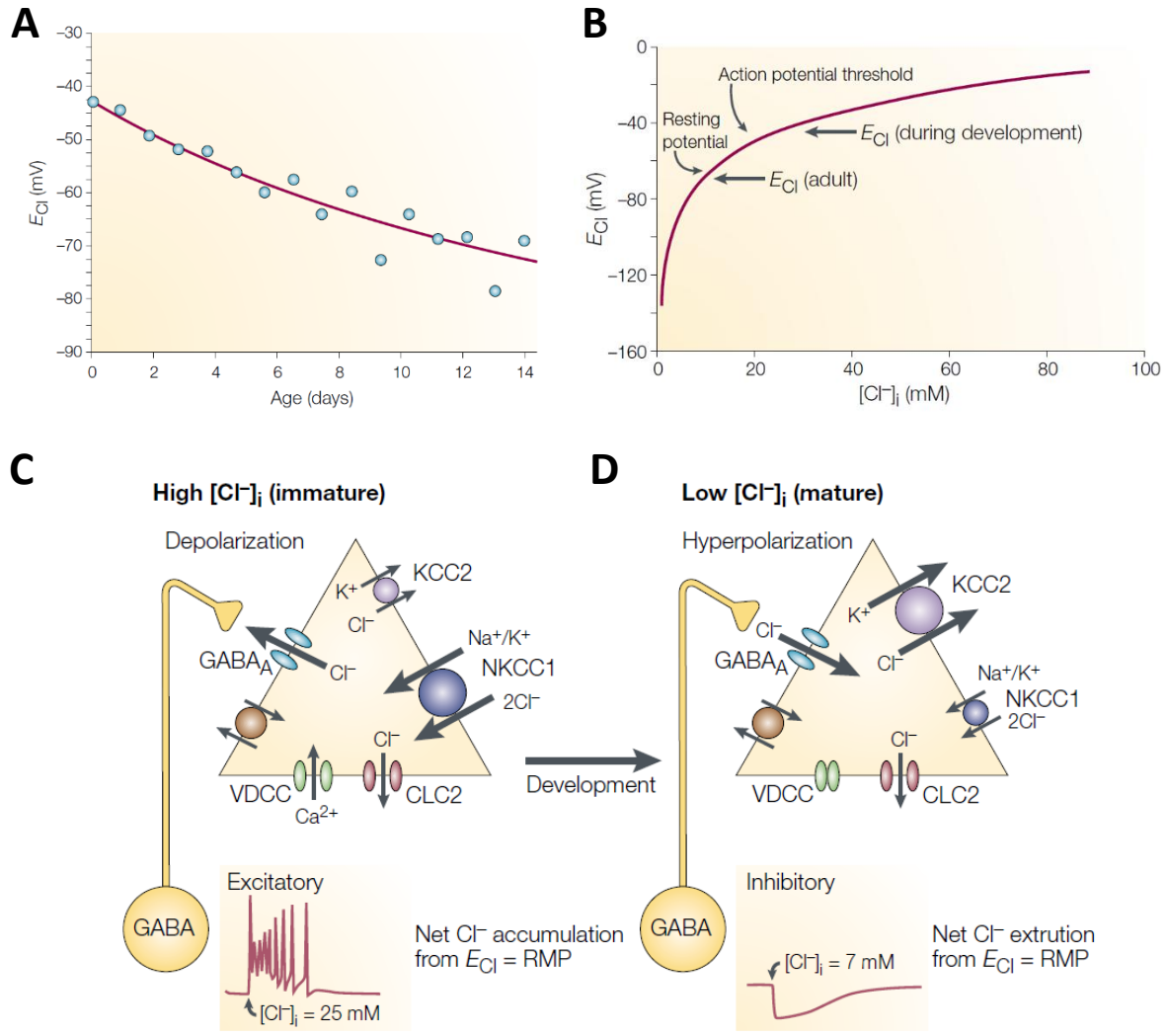


Figure 21 : L'expression précoce de NKCC1 et l'expression tardive de KCC2 déterminent les changements développementaux de la $[Cl^-]_i$

(**A**) Le potentiel d'équilibre du chlore (E_{Cl}) diminue de la naissance à l'âge adulte. (**B**) De petits changements dans $[Cl^-]_i$ suffisent pour que le potentiel d'inversion du GABA soit, soit inférieur, soit supérieur au potentiel membranaire de repos, ce qui va conditionner l'action respectivement inhibitrice ou excitatrice du GABA. Au cours du développement, lorsque la $[Cl^-]_i$ est supérieur à 25 mM, cela suffit à induire une action excitatrice du GABA. (**C**) Dans le neurone immature, la $[Cl^-]_i$ est forte à cause de l'expression majoritaire des co-transporteurs NKCC1 qui font entrer le Cl^- dans le milieu intracellulaire. Ainsi, lorsque le GABA agit sur les récepteurs $GABA_A$ de ce même neurone, le Cl^- en suivant son gradient sort dans le milieu extracellulaire ce qui induit une dépolarisation capable d'atteindre le seuil de déclenchement des PA. (**D**) L'expression du KCC2 prédomine dans les neurones matures. L'activation des récepteurs $GABA_A$ génère ainsi un influx de chlorure et une inhibition des neurones adultes.
CLC2 : canal chlorure voltage-dépendant 2 ; E_{Cl} : potentiel d'inversion du chlorure ; RMP : potentiel membranaire de repos ; VDCC : canal calcique voltage-dépendant. D'après Ben-Ari, 2002.

III.C) Focus autisme : dysfonctions GABAergiques connues

Comme évoqué dans le premier chapitre de ce manuscrit, de nombreuses altérations de la signalisation GABAergique ont été rapportées dans l'autisme et dans le SXF ainsi que dans les modèles animaux.

En continuité avec la section précédente, un retard dans le changement de polarité du GABA, normalement observé au cours du développement lorsque son action passe d'excitatrice à inhibitrice, a été mis en évidence dans les neurones corticaux de souris *Fmr1*$^{-/y}$. Ce retard se traduit par le maintien du potentiel d'inversion du chlore E_{Cl} à des valeurs plus dépolarisées à des stades postnataux avancés, associé à une surexpression protéique de NKCC1, bien que son ARNm reste inchangé (He et al., 2014). De plus, une étude clinique utilisant du bumétanide, un diurétique qui bloque spécifiquement le co-transporteur NKCC1, a démontré une amélioration des scores cliniques chez les personnes autistes. Ces observations montrent qu'une activité excessive de NKCC1 pourrait contribuer à certaines altérations comportementales observées dans l'autisme (Lemonnier et al., 2012). Ainsi, un retard du changement de polarité développemental du GABA pourrait perturber la maturation des circuits et influencer la mise en place des connexions synaptiques pendant la période critique du développement. Les mécanismes régissant l'expression développementale de NKCC1 et KCC2 restent encore mal compris, mais il est établi (comme discuté plus haut) que la signalisation via les récepteurs $GABA_A$ peut, à elle seule, influencer ce basculement de polarité (Ganguly et al., 2001).

Chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$, plusieurs études ont rapporté une diminution de l'expression des sous-unités δ, α, β et γ des récepteurs $GABA_A$ dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet (D'Hulst et al., 2006; Gantois et al., 2006; Braat et al., 2015). De plus, la sous-expression de certaines de ces sous-unités spécifiques du récepteur $GABA_A$ peut être corrigée chez les souris transgéniques YAC contenant le gène *FMR1* humain complet (Braat et al., 2015). Cette étude montre également que la FMRP se lie directement à plusieurs ARNm du récepteur $GABA_A$ et que la modulation allostérique positive de ces récepteurs par le neurostéroïde ganaxolone permet d'atténuer certains comportements spécifiques chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$, soulignant le

potentiel thérapeutique du ciblage de ce récepteur. Ces altérations sont associées à des changements dans l'organisation des circuits inhibiteurs (Paluszkiewicz et al., 2011), susceptibles de contribuer à la perturbation de l'homéostasie intracellulaire du Cl^-.

Au-delà des récepteurs, des anomalies ont également été observées dans la synthèse, le stockage et le métabolisme du GABA. Ainsi, une diminution marquée de l'expression des protéines GAD65 et GAD67 a été observée dans le noyau basolatéral de l'amygdale associée à une diminution des niveaux de GABA vésiculaire (Olmos-Serrano et al., 2010). A l'inverse, dans le cortex, l'hippocampe, le tronc cérébral et le diencéphale il y aurait une augmentation de ces protéines associée à une diminution de l'expression de la sous-unité β du récepteur (El Idrissi et al., 2005). La concentration de GABA lui-même est alors réduite dans certaines régions du cerveau telles que le cortex et le cervelet. Parallèlement, l'expression des protéines nécessaires au transport du GABA (GAT) et à son catabolisme (GABA-T) est aussi réduite dans le cortex (D'Hulst et al., 2006). Dans l'ensemble, ces études mettent en évidence un affaiblissement global du système GABAergique dans le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$, résultant d'altérations combinées de la production, du métabolisme, de la libération et de la signalisation du GABA.

Ces altérations de composants essentiels du système GABAergique dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$ se traduisent par des déficits fonctionnels de la transmission synaptique inhibitrice caractérisés par une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSC) et miniatures (mIPSC) notamment dans le noyau basolatéral de l'amygdale. Ces déficits sont également accompagnées d'une réduction du nombre de synapses inhibitrices témoignant d'un développement anormal des circuits inhibiteurs dans ce modèle (Olmos-Serrano et al., 2010).

III.C-1) Dans la moelle épinière

Si la plupart des études ont porté sur les altérations cérébrales de la transmission inhibitrice dans l'autisme, des travaux plus récents ont mis en évidence que des dysfonctionnements GABAergiques d'origine périphérique et spinale pouvaient également contribuer aux troubles sensoriels observés dans l'autisme.

Orefice et al. (2016) ont montré, dans des modèles murins de l'autisme où les gènes *Mecp2* ou *Gabrb3* sont délétés spécifiquement dans les neurones sensoriels primaires, que la perte d'inhibition présynaptique au niveau de ces mêmes neurones, suffit à induire une hypersensibilité tactile, des troubles anxieux et des altérations des comportements sociaux. Plus précisément, ces auteurs ont mis en évidence une diminution des PAD (mécanisme décrit dans le chapitre II.B-1) de ce manuscrit) normalement médiés par les récepteurs $GABA_A$ exprimés sur les terminaisons des afférences primaires. Cette diminution traduit un déficit fonctionnel de la modulation GABAergique présynaptique, conduisant à une excitation excessive des circuits spinaux sensoriels.

De plus, la délétion spécifique dans les neurones sensoriels du gène *Gabrb3*, qui code pour la sous-unité β_3 du récepteur $GABA_A$, reproduit ce phénotype, confirmant le rôle essentiel de cette sous-unité dans le contrôle inhibiteur des signaux tactiles. À l'inverse, la restauration pharmacologique de l'inhibition présynaptique par l'administration chronique et restreintes à la périphérie de l'agoniste des récepteurs $GABA_A$: isoguvacine rétablit les comportements sociaux et réduit l'anxiété (Orefice et al., 2019).

Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle une altération de la régulation GABAergique dans les premiers étages du traitement sensoriel, en particulier au niveau des afférences primaires et de la moelle épinière, pourrait participer directement à l'émergence des troubles sensoriels et sociaux-cognitifs caractéristiques de l'autisme. C'est pourquoi mon travail de thèse a visé à explorer plus spécifiquement la plasticité des interneurones GABAergiques de la corne dorsale de la moelle épinière et son éventuelle implication dans les anomalies de perception tactile observées dans le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$.

Objectifs de l'étude

Le but de ce projet de thèse a donc été d'étudier la plasticité des interneurones spinaux GABAergiques dans le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$ afin de mieux comprendre les bases neurobiologiques périphériques et spinales qui sous-tendent les troubles sensoriels observés dans l'autisme. Les neurones spinaux GABAergiques sont composés de différentes sous-populations permettant de moduler différentiellement la transmission et le traitement de diverses informations sensorielles. Ainsi, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle, chez les individus autistes certaines des différentes sous-populations d'interneurones GABAergiques expriment des altérations très distinctes. Alors que certaines sous-populations présenteraient des changements drastiques d'autres ne seraient pas du tout affectées. Cela mènerait alors à une intégration anormale de l'information tactile dans la moelle épinière et à la transmission au cerveau d'un message déjà altéré. Pour explorer la plasticité fonctionnelle de ces différentes sous-populations, nous avons utilisé la technique du patch-seq qui combine des caractérisations électrophysiologiques, transcriptomiques et morphologiques de ces interneurones de façon individuelle.

MATERIELS & METHODES RESULTATS

ARTICLE

Les sections « Matériels & méthodes » et « Résultats » seront présentés en anglais sous la forme d'un article actuellement en préparation.

ARTICLE

Decreased coding capabilities of spinal Parvalbumin neurons in a mouse model of autism: possible links with sensory perception alteration

Anna Saint-Jean[1], Vanessa Rouglan[1], Florian Specque[2], Alexis Groppi[2], Macha Nikolski[2], Ourania Semelidou[1], Isabelle Matias[1], Andreas Frick[1], Alexandre Favereaux[3], Yves Le Feuvre[1,]*

1. Univ. Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, F-33000 Bordeaux, France
2. Univ. Bordeaux, IBGC, CNRS, UMR 5095, Centre de Bioinformatique de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France
3. Univ. Bordeaux, CNRS, IINS, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: yves.le-feuvre@u-bordeaux.fr

Abstract

Most people with autism exhibit atypical reactivity to sensory stimuli including tactile stimuli. Tactile information is perceived in the periphery and processed in the spinal cord under the control of inhibitory neurons before being sent to higher brain structures. However, whether these inhibitory neurons undergo functional alterations in autism models remains poorly understood. Here we show that spinal GABAergic interneurons (SGI) in the *Fmr1*$^{-/y}$ mouse model of autism, exhibit altered excitability resulting in a narrower dynamic range, shifted toward lower-intensity stimulations. Importantly, transcriptomic analysis of recorded neurons reveals that these changes are restricted to a subpopulation of SGI expressing the parvalbumin (Pvalb) and the Neuropeptide Y (NPY) marker. Altogether, we suggest that functional alterations of SGI, particularly Pvalb and NPY neurons in *Fmr1*$^{-/y}$ model disrupt tactile information processing upstream of the brain and may play a critical role in the development of sensory and social deficits characteristic of autism.

Keywords: Autism, Spinal cord, GABAergic interneurons, Patch-seq, RNA-seq, Electrophysiology

Introduction

Sensory processing dysfunctions are now recognized as a core feature of autism, with more than 96% of individuals showing hyper- or hyporeactivity to sensory stimuli. Among them tactile differences, reported in more than 60% of cases, are particularly prominent (Tomchek and Dunn, 2007; Marco et al., 2011; American Psychiatric Association, 2013; Balasco et al., 2020). Beyond being a major source affecting daily operations (Suarez, 2012), growing evidence suggests that altered tactile processing contributes to the development of the others core symptoms of autism such as social withdrawal and repetitive behaviors (Thye et al., 2018; Cascio et al., 2019; He et al., 2021; Zhai et al., 2023).

Tactile information is perceived in the periphery by specialised sensory neurons called mechanoreceptors whose soma lie in the dorsal root ganglia and is then transmitted to the dorsal horn of the spinal cord (Rice and Albrecht, 2008; Li et al., 2011) where inhibitory interneurons gate sensory flow before ascending to higher brain regions through projection neurons (Abraira and Ginty, 2013; Wang et al., 2022). Disruption of this system is increasingly linked to autistic behaviors: C fibers low threshold mechanoreceptors (C-LTMRs) are altered in the *Shank3*$^{\Delta C/\Delta C}$ mouse model of autism (Huzard et al., 2025) and impairment of these C-LTMRs in naïve mice is responsible for altered sociability (Huzard et al., 2022). Similarly, genetic manipulations of mechanosensory neurons by deletion of a gene known to be associated with autism in humans, reproduce autistic-like traits including hyper-reactivity, social deficits, and increased anxiety (Orefice et al., 2016, 2019). Importantly, GABAergic dysfunctions have been reported in autistic individuals (motor and sensorimotor cortices: Gaetz et al., 2014; Puts et al., 2014) and in multiple brain regions of murine autism models, including vibrissa primary somatosensory cortex (vS1) (Chen et al., 2020), primary visual cortex (V1) (Goel et al., 2018), primary somatosensory cortex (S1) (Selby et al., 2007; Orefice et al., 2019), and the basolateral amygdala (BLA), as well as in peripheral neurons and the spinal cord (Orefice et al., 2019). This suggests that altered gating of tactile information by spinal GABAergic interneurons (SGI) may play a critical role in autism pathophysiology. Consistently, Tasnim et al., 2024, showed that the timing and site of inhibitory dysfunction, especially at the spinal level, critically shape the emergence and behavioral impact of tactile abnormalities in autistic models. Yet, whether SGI themselves undergo functional alterations in autism, and how this might contribute to tactile dysfunction, remains unknown.

SGI encompass distinct transcriptomic subtypes with possibly different roles in sensory processing (Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018). We hypothesized that in autistic individuals some populations of GABAergic interneurons undergo dramatic changes in their electrophysiologic profiles while others remain unaffected. To address this, we combined electrophysiological, transcriptomic, and morphological analyses using the patch-seq technique in *Fmr1*$^{-/y}$*;Gad1-GFP* mice, a widely used model of Fragile X syndrome and autism, which is here also expressing the construct *Gad1-GFP* to easily visualize GABAergic interneurons. This approach allowed us to directly assess the functional plasticity of SGI and identify potential subpopulation-specific alterations. We demonstrate that SGI in *Fmr1*$^{-/y}$*;Gad1*-GFP mice display altered excitability profiles, resulting in a reduced dynamic range shifted towards low-intensity stimulation. Transcriptomic characterization revealed that these alterations are restricted to a subpopulation of SGI enriched in Parvalbumin (Pvalb) and neuropeptide Y (NPY) marker. Our findings reinforce the idea that structures upstream of the brain are involved in the pathophysiology of autism by unveiling new mechanisms of sensory information filtering and processing in this context. This work emphasizes specific neuronal populations as relevant targets for future translational research.

Materials & Methods:

Ethical statement

All experimental procedures were performed in accordance with the EU directive 2010/63/EU and French law following procedures and were approved by the Bordeaux Ethics Committee and Ministry for Higher Education and Research (APAFIS #36368). Mice were maintained under controlled conditions (temperature 22–24 °C, humidity 40–60%, 12 h/12 h light/dark cycle) in a conventional animal facility with *ad libitum* access to food and water. Experiments were performed during the light cycle, except for some behavioral tests (self-grooming, open field with texture, nest building, marble burying and partition test) that were performed during the dark cycle, under red light (mentioned below).

Mice

Male *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* mice, and their *WT-Gad1-GFP* littermates (with a C57BL/6J genetic background backcrossed for more than 10 generations into C57Bl/6J) were used. These mice were obtained by crossing *Gad1-GFP* male mice (Tamamaki et al., 2003), to identify GABAergic neurons, with second generation *Fmr1* knockout (*Fmr1*$^{-/x}$) females generated by excision of exon 1 of the *Fmr1* gene located on the X chromosome and its promoter (Mientjes et al., 2006)**.** The resulting progeny used for our experiments was either *Fmr1*$^{+/y}$*-Gad1-GFP* (rated WT) or *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* (knockout). Mice were maintained in collective cages. Cages were balanced for genotype and supplemented with cotton nestlets.

Behavioral assay

For all following behavioral test, mice (8-10 weeks old) were handled for two days and habituated for 30 minutes to the experimental room prior to testing.

Tape removal test

Mice underwent three days of gradual habituation to restriction in a round Plexiglas arena (14 cm diameter). Two patches of adhesive tape were attached to their hindpaws as described in (Bouet et al., 2009). The time before the first contact of each tape and the total time necessary for their removal were extracted using lab made python scripts.

Brush test

Mice underwent three days of gradual habituation to the elevated wire-mesh grid (14cm diameter) and to brush approaching (without any physical contact). Hindpaw was then stimulated with a medium paintbrush for 7 successive trials, each separated by a brief period of rest. The number of hindpaw withdrawals was then assessed.

Von Frey

Mice underwent three days of gradual habituation to the elevated wire-mesh grid (14cm diameter) and to Von Frey filament approaching (without any physical contact). Von Frey hair filaments of seven different bending forces (0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2g) were applied to the plantar surface of the right hind-paw and the paw withdrawal threshold was measured using the "up and down method" described by (Chaplan et al., 1994) starting with Von Frey filament 1g each separated by a brief period of rest. Briefly, the strength of the filament was decreased or increased following a negative or positive response respectively. Hindpaw withdrawal during or immediately after the stimulus was considered as a positive response.

To assess reactivity to non-painful mechanical stimuli, Von Frey hair of very low force (0.16g) was applied to the plantar surface of the right hindpaw, for 5 successive trials, each separated by a brief period of rest. The number of hindpaw withdrawals was then assessed.

Nest building

Mice were removed from their home cages and placed in individual cages with 3g of neslet (coton square) materials. Nest building quality was assessed 6h, 7h30, 10h and 11h30 after the separation on a rating scale from 1 to 5 according to (Deacon, 2006), (representative pictures of the nests rating scale are shown in ***Fig. 1A***). Nest quality was also assessed thanks to the weight of remaining unused material. Experiment was performed in dark cycle (with red light).

Elevated plus maze

Mice were placed in an elevated plus maze made of closed and opened arms with a luminosity of 10lux in the open arms, and let free to explore it for 10 minutes. The floor of the maze was equipped with infrared light detectable by the camera to enable the accurate detection of the mice especially in the closed arms. Automated tracking of the videos obtained from a camera

placed above the arena was performed with Ethovision (XT 17, Noldus Technology, Wageningen, Netherlands) to analyse time spent in the open arms and latency to first entry in the open arms.

Open Field

Mice were placed in a dark blue opaque plastic open field arena (40cmx40cm) with a luminosity of 60lux in the center, and let free to explore it for 10 minutes. Automated tracking of the videos obtained from a camera placed above the open field arenas was performed with Ethovision (XT 17, Noldus Technology, Wageningen, Netherlands) to analyse time spent in the center zone and distance travelled.

The following behavioral experiments were performed in dark cycle with infrared light to enable video recording.

Self-grooming

Mice were placed in a dark blue opaque plastic open field arena (40cmx40cm), and let free to explore it for 30 minutes. A camera was placed above the open field arenas to enable video recording. Total time spent self-grooming and total number of self-grooming events were calculated using lab made python scripts.

Open Field with texture

Mice were placed in a dark blue opaque plastic open field arena (40cmx40cm) containing each 2 squares of (20x20cm) either sandpaper or corrugated cardboard positioned in top left and down right corners of the arena. Mice were free to explore the arena for 30 minutes. A camera was placed above the open field arenas to enable video recording. Automated tracking of the videos was performed with Ethovision (XT 17, Noldus Technology, Wageningen, Netherlands) to analyse total time spent in the texture.

Marble burying

Mice were habituated in a polycarbonate rat cage (43x27cm) filled with 5cm depth of litter for 10min. 12 black marbles (15mm diameter, 5.2g weight) were then placed on the litter and mice were placed again in the polycarbonate cage and remain undisturbed in the cage for 30 minutes. A camera was placed above the cage to enable video recording. Mouse activity was

continuously recorded and marble buried score was assessed manually by taking pictures every 5 minutes and giving 1 point to each new marble buried, and 0.5 point to each half-buried marble. Digging time was also calculated manually.

Partition test

Mice were first habituated for 5 minutes in an empty polycarbonate rat cage (43x27cm) divided into two compartments by a perforated Plexiglas partition. Two-thirds of the cage were allocated to the test mouse, and the remaining one-third to an unfamiliar *Fmr1*$^{+/y}$ male conspecific. Each mouse (test and unfamiliar) was habituated separately in its designated compartment. After habituation, both mice were placed simultaneously into the cage for a 10-minute test session. A camera was positioned above the cage to enable video recording. Automated tracking was performed using EthoVision software (XT 17, Noldus Technology, Wageningen, Netherlands) to analyse the time spent by the test mouse in the interaction zone, defined as the one-third area of its compartment closest to the separating partition. Additionally, the time spent with the test mouse's nose in contact with the partition was manually scored.

Immunohistochemistry assay

Tissue preparation

Mice (8-10 weeks) were anesthetized with a mixture of exagon (300 mg/kg) and lidocaine (30 mg/kg) and then perfused transcardially with 20 mL 1X PBS followed by 20 mL of 4% paraformaldehyde (Sigma). The spinal cord was removed and post-fixed for 4 hours at 4°C. It was then cryoprotected (3-5 days) by immersion in a sucrose solution (30% sucrose in PBS, 0.05% sodium azide) (4°C), then the lumbar bulge was resected with a razor blade and embedded in optimal cutting temperature compound (OCT Tissue-Tek). The tissue was frozen in isopentane (Sigma, M3263) cooled with dry ice before being stored at -80°C. The lumbar spinal cords were then cut using a cryostat (Cryostar NX50), and 20µm thick cross-sections were made at the L3-L4 level and mounted on SuperFrost Gold glass slides (Thermoscientific). The slides were then dried at room temperature overnight and stored at -20°C.

Immunohistochemistry GFP/IB4 and GFP/CR

The outline of all lumbar spinal cord sections glued to each slide was traced using a PAP pen (Sigma), then the sections were washed with phosphate-buffered saline (PBS)-Triton 0.3% (PBS-T) four times for 15 minutes. The mixture of primary antibodies required for each labelling (GFP/IB4 or GFP/CR) was diluted to the desired concentration (Table 1) in a solution of PBS-T 0.3% and Normal Donkey Serum 5%. The mixture was then placed on the slides in a humid chamber at 4°C for 48 hours. The slides were rinsed again four times for 15 minutes in PBS-T 0.3% before being incubated for two hours at room temperature with the appropriate mixture of secondary antibodies (Table 1) diluted in PBS-T. Finally, the slides were rinsed three times for 15 minutes in PBS1X and mounted with ProLong Gold Antifade Mounting Medium without DAPI (Thermo Fisher Scientific). In addition, immunohistochemistry was performed in the absence of primary antibodies to verify the specificity of the secondary antibody (anti-rabbit). No labelling was detected on these sections.

Primary Antibodies				**Secondary Antibodies**				
Target	**Host**	**Dilution**	**Référence**	**Target**	**Host**	**Fluo (nm)**	**Dilution**	**Reference**
GFP	Goat	1:400	Sicgen AB0066-200	Anti-Goat	Donkey	488	1:500	Invitrogen A11055
CR	Rabbit	1:2000	Abcam ab244299	Anti-Rabbit	Donkey	594	1:500	Jackson Immunoresearch 711-585-152
				IB4	Orifonia simplicifoli	568	1:100	Invitrogen 121412

Table 1: Primary and secondary antibodies used for immunohistochemistry

Image acquisition and counting of GFP^+ | CR^+ neurons

For each animal, eight hemisections of the lumbar spinal cord were observed using a DM 5500B-CS confocal TCS SPE microscope (Leica TCS SPE/LSI RYBV) with 488 and 561 nm laser diodes. Images of eight dorsal horns per animal were captured with a 40X immersion objective (numerical aperture 1.15) using LEICA LASAF 2.4.1 software. For each image, 20 optical sections of 1µm were performed with a field of view of 183.69 x 183.69µm and a pixel size of

0.359µm. Image tiling and stitching were performed to reconstruct the full extent of the dorsal horn region.

Image analysis with Imaris

Image stacks were processed using Imaris 10.2.0 software (Bitplane, Oxford Instruments). Background subtraction was first applied to reduce non-specific signal. Neuronal counting was performed using the "Spots" function, which enables automated detection and quantification of GFP-positive neurons, followed by separate detection of CR-positive neurons. The spot diameter was set to 9.29µm to accurately match the average size of the labelled neurons. Although detection was primarily automated, manual corrections were performed due to the presence of high background fluorescence that could interfere with signal discrimination. To quantify colocalization, a filtering step was applied using the "Shortest Distance" filter between the two spot types, allowing identification of GFP^+ neurons also expressing CR^+. For layer-specific quantification, the "Surface" function was used to define anatomical layers based on IB4 staining. One surface was drawn to delimit the $IB4^+$ zone, with two additional surfaces placed immediately above and below it to represent adjacent laminae. Masks were then created for each surface and applied to the green (GFP) channel, so that only GFP^+ neurons within each defined region were included in the analysis.

Electrophysiology and transcriptomic analyses

Spinal cord slice preparation

Parasagittal spinal cord slices were obtained from adult male mice (4-5weeks). Animals were anesthetized through an intraperitoneal mixture of exagon (300mg/kg) and lidocaine (30mg/kg). Mice were then perfused transcardially with an iced-cold and pre-oxygenated for 15 minutes (95% O_2+5% CO_2) choline chloride solution (101 mM choline chloride, 3.8 mM KCl, 1.25 mM, 1.3 mM MgSO4, 1.2 mM KH2PO4, 10 mM HEPES, 25 mM glucose, 1 mM CaCl2, and 5 mM MgCl2. pH 7.3-7.4 and osmolarity 300-310 mOsm). The lumbar spinal cord was rapidly removed and immersed in cold, oxygenated choline (95% O_2 + 5% CO_2) and dissected free, meninges were removed. The lumbar bulge (L3-L5) was placed in an agarose wedge (4% in the sampling medium) which was then glued to the vibratome tank (Leica VT 1200S) and parasagittal sections 300µm thick were sliced. For dorsal root stimulation experiments, 300µm thick transverse spinal cord slices with dorsal roots attached were prepared. The slices were

incubated for a few seconds in a 20% polyethylene glycol (PEG) solution (dissolved in choline medium) before being rinsed with choline and finally incubated in oxygenated (95% O_2 + 5% CO_2), 32°C ACSF artificial cerebrospinal fluid (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH2PO4, 25 mM NaHCO3, 25 mM glucose, 2 mM CaCl2, and 1 mM MgCl2).

Patch-clamp recordings

Slices were transferred to a recording chamber and continuously perfused with oxygenated ACSF (32-34°C). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries to an average resistance of 4-6MΩ (GC150F-10, Harvard Apparatus) with a PC100 puller (Narishige). For patch-seq experiments, on GFP^+ neurons, pipettes were filled with an intracellular K-Gluconate solution (containing the following (in mM): 123 K-Gluconate, 12 KCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 0.3 GTP Tris Salt, 4 Na_2 ATP, 2.68 Biocytin, 2.10^{-6} Glycogen and 80U RNAse Inhibitor Ribolock (Thermo Scientific, EO 0382); pH: 7.35 balanced with KOH; osmolarity: 280-290mOsm adjusted with D-Mannitol). For dorsal root stimulation experiments, on GFP^- neurons, pipettes were filled with K-Gluconate solution (containing the following (in mM): 123 K-Gluconate, 12 KCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 0.3 GTP Tris Salt, 4 Na_2 ATP, 2.68 Biocytin and 2.10^{-6} Glycogen; pH: 7.35 balanced with KOH; osmolarity: 280-290mOsm adjusted with D-Mannitol). For the post-synaptic inhibitory currents (sIPSC) recordings, on GFP^- neurons, pipettes were filled with an internal solution enriched in chloride ions (containing the following (in mM): 140 KCl, 1.3 $MgCl_2$, 10 HEPES, 2 CaCl2, 1 EGTA, 0.1 GTP Tris Salt, 0.2 cAMP Na salt and 0.1 Leupeptine; pH 7.35 balanced with KOH; osmolarity: 290-295mOsm adjusted with D-Mannitol). Cells were visualized by fluorescence to recognize GFP^+ cells thanks to a X-Cite 120Q fluorescent lamp (Excelitas) followed by infrared differential interference contrast microscopy for patching. Electrophysiological signals were recorded using the whole-cell patch-clamp technique, using both the voltage and current-clamp method. Recordings were performed in lamina II-III of the dorsal horn of the spinal cord and were obtained under visual guidance using a 40x water-immersive objective. Data were obtained using a Multiclamp 700B amplifier, digitized using a Digidata 1550B interface and acquired using Clampex 11.2 software (Molecular Devices). All voltage-clamp recordings were performed at a potential of -60 mV. Throughout the experiment, the access resistance was regularly checked.

Intrinsic properties

Neuronal intrinsic properties were studied in current-clamp. Input resistance (Rin) was calculated using Ohm's law (Rin = ΔV / I) in which I = -25pA injected for 1s to the neuron to quantify the ΔV (membrane voltage deflexion) associated to this injection. Membrane time constant (τ) was estimated by fitting a single-exponential function to the voltage response following the onset of hyperpolarizing current injection. Capacitance (C) was calculated from the following equation C = τ / Rin. Rebound APs were elicited and counted when the membrane potential returned to its resting value following 2 second hyperpolarizing current pulses of increasing intensities (range -10, -100pA, 2s). Sag ratio was calculated in response to one of the strongest hyperpolarising injection (-80pA; 2s) with the following equation (Vs_{teady}-V_{rest})/(V_{peak}-V_{rest}) (with: V_{peak} being the most negative membrane potential reached in the beginning of the current step; V_{steady} being the voltage at the end of the pulse and V_{rest} being the resting membrane potential). Sag ratio was also calculated at a fixed membrane hyperpolarization of –15 mV (for a V_{steady} - V_{rest} = -15mV) to allow consistent comparison across cells. The membrane potential measured just before the onset of the hyperpolarizing current steps (i.e., more than 2 minutes after switching from voltage-clamp to current-clamp mode) was defined as the resting membrane potential (RMP). AP discharge patterns were characterized by injecting a series of depolarizing step-currents (2s duration, 10pA increments, delivered every 2 s, ranging from 0 to 100pA). AP discharge patterns were classified according to previously published criteria (Candelas et al., 2019). In brief, single spiking neurons were characterized by the discharge of a single AP; transient neurons were characterized by an activity duration < 1.4s in the 2s-long pulse; and tonic firing patterns were characterized by persistent AP discharge throughout the depolarizing step. Rheobase defined as the minimal current required to elicit at least one AP was measured in this same protocol. AP firing threshold was measured on first evoked spike at rheobase and was defined as the point where voltage first derivative reached 4V/s. AP half-width was measured by calculating the width of the first AP elicited when this one is reaching half of its amplitude. Fast After-Hyperpolarisation (fAHP) was calculated by measuring from the firing threshold, the amplitude of the hyperpolarisation in the end of this first AP elicited. Dynamic range was quantified as the current interval between the rheobase and the current intensity that evoked the maximal firing rate. The center point of the dynamic range was calculated as the average

median per genotype between these two current values. Medium after-hyperpolarisation (mAHP) was measured at the end of an induced (350pA; 2ms) train of 5 or 15 successive APs of different frequency (20, 40, 50, 60Hz), by measuring from the resting membrane potential, the amplitude of the hyperpolarisation in the end of the last AP induced. Rectification index was quantified in voltage-clamp using a ramp protocol ranging from -40mV to -120mV. The slope of the I–V curve was measured over the linear portions at hyperpolarized (-120 to -100 mV) and near-resting (-60 to -40 mV) potentials, and the rectification index was calculated as the ratio between these slopes.

For pharmacological blockade of HCN channels, baseline recordings of sag ratio and number of evoked APs were obtained before bath application of ZD7288 (10 µM; Cayman chemical, 15228). Recordings were repeated 15 min after drug perfusion to ensure steady-state effects.

Synaptic properties

Synaptic properties were recorded in voltage-clamp configuration (Vhold=-60mV). Spontaneous excitatory synaptic activity (sEPSC) was recorded for 5 minutes with K-Gluconate internal solution. After this recording, biocytin from the pipette was injected in the recorded neuron by injected small pulses of positive currents (75pA, 1s) to allow morphological reconstruction of the neuron.

For dorsal root stimulation experiments, synaptic currents were evoked with electrical stimulation of dorsal roots using a borosilicate glass suction electrode (Harvard Apparatus; GC150TF-10) connected to a Master 8 (A.M.P. Instrument Ltd) stimulator through an isoflex flexible stimulus isolation unit, at C-fiber strength (500 µA, 500µs) since Aβ (500µA-50µs) and Aδ (50µA-50µs) fiber strength usually did not evoke any response.

Spontaneous inhibitory synaptic activity (IPSC) was first recorded for 5 minutes in the absence of drugs, then for 5 minutes in the presence of AMPA/Kainate glutamatergic synaptic blockers CNQX (Sigma, C239) (20µM) and NMDA antagonist DL-AP5 (Tocris Bioscience, 3693/10) (20µM) to differentiate inhibitory events, appearing as inward currents with Cl^- enriched solution from excitatory events. IPSC and EPSC event analysis was performed using lab made python code (https://github.com/Yves33/TorchPSC).

Single-cell Patch-seq

At the end of the recordings (after sEPSC recordings and biocytin injection), cytosol from the recorded neuron was aspirated for 5 minutes. The pipette was then broken into an RNAse-free 200µl Eppendorf tube containing the lysis mix (0.05% Triton X-100 (Thermo Fisher A16046.AE), 8U RNAse Inhibitor Ribolock (Thermofisher Scientific, EO 0382), 2.5µM Smart-seq3 oligo-dT (custom synthesis by Eurogentec), 0.5mM dNTPs (R0191) diluted in RNAse-free water). Samples were then incubated at 72°C for 3min and kept on ice until reverse transcription (RT). After harvesting, reverse transcription of single cell mRNA was performed by adding RT mix (12U RNAse Inhibitor Ribolock (Thermofisher Scientific, EO 0382), 5µM Smart-seq-3 template switching oligonucleotide (TSO) (custom synthesis by Eurogentec), 20U Maxima RT H-minus (Thermo Fisher EP0752), 2X Maxima RT buffer (Thermo Fisher EP0752) diluted in RNAse-free water) into samples. All cDNA was generated after temperature steps as follows: 42°C for 90min, cycle of 50°C for 2 min followed by 42°C for 2min both repeated 10 times, 85°C for 5 min, using the SimpliAmp™ Thermocycler (Applied Biosystems™, Thermofisher Scientific).

After reverse transcription, preamplification was performed by PCR (25 cycles). The reaction mixture (2U/µl Phusion HF polymerase (Thermofisher Scientific, F530S), 0.5mM dNTPs (R0191), 0.2µM SmartSeq3 PCR primers (custom synthesis by Eurogentec), 2X Phusion HF Buffer (Thermo Fisher F530L), diluted in RNAse-free water, added to samples) was subjected to 25 PCR cycles consisting of an initial denaturation step at 98 °C for 3min followed by 25 cycles of 98 °C for 20s, 65°C for 30sec, 72°C for 5min and final extension at 72°C for 5min. PCR products were purified using AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) according to the manufacturer's recommendations. The quality and quantity of each sample were checked by Lab Chip GX touch HT (Perkin Elmer).

cDNA libraries were synthesized with the « Perkin Elmer Rapid XP V2 DNA-Seq kit » kit following the supplier procedures. Briefly, the first step consisted to fragment the cDNA and repair the ends in order to add 3' adenylated adapters and anchors to the strands. Finally, the obtained cDNA was amplified by PCR. The number of PCR cycles was adapted to the start material quantity. Libraries quality was checked with Xmark chip on the Lab Chip GX touch HT (Perkin Elmer).

All the samples were pooled in an equimolar manner. The quality and quantity of the pool were checked by qPCR (LC480) and Lab Chip GX touch HT (Perkin Elmer) before sequencing. Single RNA sequencing was performed using Nextseq 2000 Illumina (pair-end 2·150 bp) with a minimum of 30 millions reads per sample by the PGTB facility.

Single-cell RNA sequencing analysis

Raw sequencing data were first processed using Cutadapt to remove adapter sequences (Table 2). Only reads longer than 25 base pairs (bp) after trimming were retained for downstream analysis. Quality filtering was then performed with Fastp, which evaluates Phred quality scores to assess base-level sequencing accuracy. Reads were retained if they contained at least 25 bp with sufficient quality scores, ensuring reliable downstream interpretation. High-quality reads were then aligned to the mouse reference genome (GRCm39) with the STAR aligner (Spliced Transcripts Alignment to a Reference), which efficiently maps reads across exon-exon junctions in RNA-seq datasets. The following parameters were used to run STAR aligner: --outFilterScoreMinOverLread 0.66 --outFilterMatchNminOverLread 0.66 --outFilterMatchNmin 0 --outFilterMismatchNmax 10.

Name	Position	Sequence
ss3-oligodTVn	3'	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCGTATGCTGCT
ss3-TSO	3'	CCCNNNNNNNNCATTGCGCAAT
illumina-P5primer	3'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
illumina-P5primer_rev	3'	GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT
illumina-P7primer	3'	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT
illumina-P7primer_rev	3'	ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
illumina-read1primer	3'	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
illumina-read1primer_rev	3'	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
ss3-oligodTVn_rev	5'	AGCAGCATACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
ss3-TSO_rev	5'	GATTGCGCAATGNNNNNNNNGGG

Table 2: Adaptater sequences removed from libraries by cutadapt program

Bioinformatics Analysis

Missing electrophysiological values were centered and scaled after imputing missing values using sklearn's Iterative Imputer. PCA was performed using 'full' solver with 15 principal components. Logistic regression classifiers were run using 'l1' penalty using 'liblinear' solver. Repeated stratified K-fold (k=7, repeats=5) was used for classifier cross validation.

Read counts were first normalized to cell size (counts per million, cpm) then log transformed to pseudocounts (log2(cpm+1)). Reference dataset was extracted from (Sathyamurthy et al., 2018) under accession number GSE103892. Contamination indexes were computed as in (Tripathy et al., 2018) except that negative contaminations scores were not clipped to 0. Logistic regression classifiers were trained using 'l2' penalty and repeated stratified K-fold cross-validation (k=3, repeats=10) was performed to assess the robustness of predictions. Correlation matrix between cells and agglomerative clustering were performed using 'correlation' metrics and 'complete' linkage. Leiden clustering was performed after computing a k-nearest neighbors graphs (k=5) with 'correlation' metrics. Clustering robustness was assessed using a leave k-out procedure (k=10). The optimal number of clusters was determined manually based on Silhouette, Davies-Bouldin and Calinski-Harabasz scores observation. The top 15 genes contributing to each cluster identity were computed using scanpy's logreg method. Gene expression comparison between clusters was assessed suing Mann-Whitney rank sum test and Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) correction was applied to account for multiple comparisons.

Data availability

All custom software and code used for data analysis is available upon request to principal investigators. Raw read sequences and count matrix is available upon request to principal investigators.

Neuronal morphology reconstruction

Following biocytin injection (1 mg/mL; Sigma, 576-19-2) and cytosol harvesting, acute parasagittal spinal cord slices were collected and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4 °C for 24–48 hours. The PFA was then replaced with 1X PBS for 24–72 hours. Slices were washed three times for 10 minutes each in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBS-T). Slices were subsequently incubated overnight at 4°C in a solution containing Streptavidin Alexa Fluor™

555 (1:1000; Invitrogen S21381), 2% bovine serum albumin (BSA), and PBS-T. The next day, slices were washed four times in 1X PBS, air-dried, and mounted on Superfrost™ slides (Thermo Fisher Scientific) using ProLong™ Gold Antifade Mounting Medium without DAPI (Thermo Fisher Scientific). Neuronal morphology was reconstructed using a Neurolucida system (MBF Biosciences) equipped with a 100X oil immersion objective.

Capillary electrophoresis to quantify neurotransmitter concentrations

Spinal cord slice preparation

Spinal cord slices were obtained as described above for the electrophysiological experiments, except that 10 transversal slices were produced. Ventral horns of these transverse sections were excised using a razor blade and the dorsal horns were placed in a 2mL safe lock Eppendorf tube. Eppendorf was then frozen into isopentane (Sigma) cooled in dry ice and then stored at -80°C until next steps.

Neurotransmitters/Protein extraction

400 µL of 4% trichloroacetic acid (TCA) extraction solution was added to each Eppendorf tube, along with magnetic beads. Samples were homogenized using a TissueLyser (Qiagen) at an intensity of 20 for 2 minutes. The entire supernatant (containing amino acids) was separated from the remaining pellet that was stored at –20 °C for protein quantification. TCA was then removed from the supernatant with water-saturated diethyl ether and stored at -80 °C.

Protein quantification

Pellets were resuspended in 400 µL of distilled water, and sonicated (ultrasound, intensity 40, 10 seconds). Protein concentration was measured using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Cat. #23225) following the supplier procedures. Briefly, a BSA calibration curve was prepared using BSA solution (2 mg/mL), and mix working (MW) reagent was prepared. For each calibration point, BSA solutions were mixed with MW reagent. Absorbance was measured at 562 nm using a UV-visible spectrophotometer. The protein concentration of each sample was calculated using the calibration curve in order to normalize neurotransmitter levels to total protein content for each sample.

Derivatization and neurotransmitter quantification

Extracellular levels of neurotransmiter were then determined. Briefly, pooled slices were deproteinized by addition of cold trichloroacetic acid (TCA) to a 4% final concentration. The suspension was centrifuged at 16,800 g for 10 min to pellet the protein content used for protein quantification.

Samples were analyzed with a commercial laser-induced fluorescence capillary electrophoresis (CE-LIF) (CE: Beckman Coulter (Brea, California, US), P/ACE MDQ; LIF: Picometrics (Labège, France), LIF-UV-02, 410 nm 20 mW) as follows: samples were processed for micellar CE-LIF and were fluorescently derivatized at RT for 60 min with napthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) before being analyzed by CE using a hydroxypropyl-b-cyclodextrin (HP-b-CD) based chiral separation buffer. All electropherograms data were collected and analyzed using Karat 32 software v8.0 (Beckman Coulter, France). The amounts of neurotransmitters were normalized to the protein content determined from spinal cord slices by the Lowry method using the BCA protein Pierce assay (ThermoScientific, CA, USA) assay with bovine serum albumin (BSA) as a standard. The quantity of neurotransmitters in the samples was determined from a standardized curve while peak identification was made according the retention time of reference standards and by spiking the fraction with the corresponding neurotransmitter.

Statistical analyses

Behavioral analyses were performed using Prism (v9.5, Graphpad, USA). Electrophysiological and transcriptomic single-cell sequencing analysis were done using an in-house Python script. Imaris was used for all image analysis. All values are expressed as mean ± SEM. Data were analysed using unpaired Student's test, when the normality test (Shapiro-wilk) was allowing it. Otherwise, Mann-Whitney rank sum test was used. Significant and non-significant 2 way ANOVAs were followed by Tukey's post-hoc test when the conditions were allowing it according to (Wei et al., 2012). Proportions comparisons were made by using the Fisher exact probability test. $P<0.05$ indicates statistical significance.

Results

Fmr1$^{-/y}$*-Gad1-GFP* mice recapitulate some typical autistic traits.

The *Fmr1*$^{-/y}$ mouse model is widely used and well-characterized in the literature to study autism. However, findings across studies often remain contradictory or inconsistent particularly concerning behavioral phenotype (Ey et al., 2011; Kazdoba et al., 2014). In addition, our mouse model carries a *Gad1-GFP* construct which induces *Gad1* haploinsufficiency, a condition previously reported to influence pain sensitivity and sensory processing (Charron et al., 2024). This raises potential concerns regarding the relevance of using the *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* model in our study. To confirm that our mice still exhibited core autistic phenotypes, including sensory, social and anxiety related traits, we conducted a full panel of behavioral assessments before performing spinal interneurons characterization.

To first assess mechanosensory reactivity we used the adhesive tape removal test. *Fmr1*$^{-/y}$ mice exhibited a significantly increased latency to first contact the tape glued on their hindpaw (246.4 ± 55.13 sec) compared to WT littermates (113.6 ± 23.00sec; p=0.0330) (***Figure 1.A1***), suggesting decreased reactivity to light touch. This was not due to motor impairment, as the time required to remove the tape was not significantly different between groups (***Figure 1.A2***). We further examined tactile preference using a textured open field in which half of the area was composed of a different texture such as corrugated cardboard or sandpaper. WT mice displayed a preference for corrugated cardboard, spending significantly more than 50% of their time in this zone (58 ± 2.5%, p=0.0076 *one sample t-test*), whereas *Fmr1*$^{-/y}$ mice showed no preference (51 ± 1.6%, p=0.5097) (***Figure 1.B1***). Consistently, WT mice spent significantly more time in this zone than *Fmr1*$^{-/y}$ mice (p=0.0315). No group preference was observed when the corrugated cardboard was replaced by sandpaper (*Fmr1*$^{-/y}$: 55 ± 2.6%, p=0.11; WT: 55 ± 3.2%, p=0.25; *Fmr1*$^{-/y}$ vs WT: p=0.9273), indicating that the cardboard effect was not driven by novelty (***Figure 1.B2***). These results suggest that *Fmr1*$^{-/y}$ mice may not process certain tactile stimuli as behaviorally relevant.

Similarly, *Fmr1*$^{-/y}$ mice displayed reduced paw withdrawal responses to repeated brush stimulation (3.7 ± 0.47) compared to WT (5.083 ± 0.36; *p=0.0277*) (***Figure 1.C***), supporting tactile hyporeactivity. However, in contrast, low-force Von Frey filament testing (0.16g) revealed increased reactivity in *Fmr1*$^{-/y}$ mice (1.5 ± 0.22 vs 0.8 ± 0.19; *p=0.0489*) (***Figure 1.D1***),

suggesting that modality specific receptor subtypes and circuits may be differentially impaired in *Fmr1*$^{-/y}$ animals.

To assess pain-related reactivity, we measured paw withdrawal thresholds with calibrated Von Frey filaments and found no significant differences between genotypes (*Fmr1*$^{-/y}$: 1.392 ± 0.2090g; WT: 1.366 ± 0.1328g; *p*=0.8431) (***Figure 1.D2***), indicating that mechanical nociceptive responses, in contrast to tactiles, were not altered in our *Fmr1*$^{-/y}$ model.

We next evaluated socio-cognitive traits. In the elevated plus maze, *Fmr1*$^{-/y}$ mice spent more time in the open arms (79.2 ± 8.9 sec) than WT mice (52.7 ± 7.3 sec; *p*=0.0360) (***Figure 1.E***), indicating reduced anxiety or altered threat evaluation. However, this effect was not confirmed in the open field, where both groups spent similar time in the center zone (***Figure S1.A1***; *Fmr1*$^{-/y}$: 122.2 ± 13.06sec; WT: 102.8 ± 8.69sec; *p*=0.2503) and travelled comparable distances (*Fmr1*$^{-/y}$: 4757 ± 187.7cm; WT: 4773 ± 316.4cm; *p*=0.9648) (***Figure S1.A2***), suggesting no hyperactivity.

Nest building is a socially relevant behavior of adult rodents, as it contributes to protecting the litter from predators and environmental threats and is influenced by social and reproductive contexts (Olsson et al., 2009; Otabi et al., 2020). In this task, *Fmr1*$^{-/y}$ mice tend to build less structured nests (***Figure 1.F1;*** [10h30]: *Fmr1*$^{-/y}$: 2,958 ± 0,3963; WT: 4,125 ± 0,2795; *p*=0.093) and left more unturned material (***Figure 1.F2;*** [10h30]: *Fmr1*$^{-/y}$: 1,375 ± 0,2796g; WT: 0,600 ± 0,2027g; *p*=0.108), reflecting possible deficits in social motivation, goal-directed behavior and arousal-anxiety balance (McCarthy et al., 2024). In the partition test, which measures sociability toward an unfamiliar conspecific, no significant genotype differences were observed in the proportion of time spent in the interaction zone (***Figure 1.G1***; *Fmr1*$^{-/y}$: 0.5441 ± 0.0402; WT: 0.5579 ± 0.0380; *p*=0.8073), but a strong trend toward reduced direct nose-nose interaction was noted in *Fmr1*$^{-/y}$ mice (***Figure 1.G2;*** *Fmr1*$^{-/y}$*:* 76.06 ± 15.06sec; WT: 100.5 ± 11.48sec; *p*=0.0536), suggesting social deficits in *Fmr1*$^{-/y}$ mice.

Stereotyped behaviors were assessed using marble burying and self-grooming assays. Self-grooming assays did not show any difference between genotypes in neither the total grooming time (***Figure S1.B1:*** *Fmr1*$^{-/y}$: 115.2 ± 21.94sec; WT: 110.9 ± 25.01sec; *p*=0.8989) nor the number of grooming events (***Figure S1.B2:*** *Fmr1*$^{-/y}$: 28.64 ± 2.958; WT: 26.27 ± 2.359; *p*=0.5392). Similarly, in the marble burying test, neither the score of marble buried across time

(***Figure S1.C1***), the total digging time (***Figure S1.C2:*** *Fmr1*$^{-/y}$: 410.7 ± 49.15sec; WT: 331.3 ± 43.11sec; *p*=0.2387) nor the number of digging events (***Figure S1.C3:*** *Fmr1*$^{-/y}$: 87.36 ± 9.482; WT: 72.45 ± 7.814; *p*=0.2931) revealed any differences between genotypes, suggesting that our *Fmr1*$^{-/y}$ mice do not display any changes in stereotyped behaviors compared to their WT littermates.

Taken together, these results demonstrate that *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1*-GFP mice recapitulate several autistic phenotypes, particularly in tactile reactivity, some aspects of anxiety, nesting behavior and social deficits. Despite the presence of *Gad1* haploinsufficiency, this model remains relevant for investigating cellular correlates of autistic traits.

The GABAergic cytoarchitectural organisation does not seem to be different between the two genotypes.

To first investigate whether the global organisation of the GABAergic system in the dorsal horn of the spinal cord of *Fmr1*$^{-/y}$ mice was altered, we performed immunohistochemistry amplifying the GFP signal of the *Gad1-GFP* construct, to identify GABAergic neurons across the different laminae. Laminar boundaries were defined using isolectin B4 (IB4) staining, which labels non-peptidergic nociceptive afferents terminating in lamina IIi (Abraira et al., 2017). Accordingly, lamina I–IIo was defined as the region dorsal to the IB4^{+} area, and lamina III–IV as the region ventral to it (***Figure S2.A1 and A2***). Quantification revealed no significant differences between genotypes in the distribution of GFP^{+} neurons across laminae (I-IIo: *Fmr1*$^{-/y}$: 12.79 ± 0.6621 vs WT: 11.88 ± 1.028; *p*=0.8962 | IIi: *Fmr1*$^{-/y}$: 12.13 ± 1.029 vs WT: 11.25 ± 0.8921; *p*=0.5520 | III-IV: *Fmr1*$^{-/y}$: 45.92 ± 1.957 vs WT: 42.94 ± 2.278; *p*=0.2824 ***Figure S2.A3***). Similarly, the total number of GFP^{+} neurons per dorsal horn was not different (*Fmr1*$^{-/y}$: 70.83 ± 3.053 vs WT: 66.06 ± 2.767; *p*=0.2824 ***Figure S2.A3***), suggesting that the overall number and distribution of GABAergic interneurons are preserved in *Fmr1*$^{-/y}$ dorsal horn.

We next examined a specific GABAergic subpopulation by quantifying calretinin positive (CR^{+}) neurons and their colocalization with GFP (***Figure S2.B1-B3***). No differences were detected between genotypes in the total number of GFP^{+} neurons (*Fmr1*$^{-/y}$*:* 67.48 ± 3.171 vs WT: 68.83 ± 1.72; *p*=0.7093), in the number of CR^{+} neurons (*Fmr1*$^{-/y}$*:* 50.26 ± 3.153 vs WT: 53.50 ± 1.801; *p*=0.0706), or in the number of GFP^{+}CR^{+} colabeled neurons (*Fmr1*$^{-/y}$*:* 9.913 ± 1.123 vs WT: 8.208 ± 0.9305; *p*=0.2469*;* ***Figure S2.B3***). Overall, the proportion of CR^{+} neurons co-expressing

GFP remained low (WT 15% vs *Fmr1*$^{-/y}$ 19.7%), indicating that most CR^{+} neurons are non-GABAergic (or not labelled by the *Gad1-GFP* construct), but with no significant difference between genotypes.

Together those results indicate that the GABAergic cytoarchitectural organisation in dorsal horns spinal cord is comparable between *Fmr1*$^{-/y}$ mice and their WT littermates.

Spinal GABAergic interneurons in *Fmr1*$^{-/y}$ mice display altered intrinsic electrophysiological properties.

To assess intrinsic plasticity of SGI in *Fmr1*$^{-/y}$ mice, we first looked at passive membrane properties of GFP^{+} neurons in Rexed lamina II-III of dorsal horn spinal cord by using whole-cell patch-clamp recordings on acute spinal cord slices. We found an increased input resistance in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (695.11 MΩ ± 58.67MΩ) compared to WT ones (510.82 ± 36.29 MΩ; *p*=0.0211) (***Figure 2.A1-A2***), associated with an increased time constant (*Fmr1*$^{-/y}$: 36.9 ± 3.5ms vs WT: 26.2 ± 2.9ms; *p*=0.0308) (***Figure 2.A3***) but no change in membrane capacitance or resting membrane potential (RMP) (***Figure S3.A***).

To investigate which types of ion channels might be altered in our model, we assessed several electrophysiological parameters known to reflect specific channel activity. We first examined the sag ratio, an indicative parameter of HCN channel mediated sag currents, by injecting a series of hyperpolarizing current steps (-100 to -10pA, 2s) and measuring the ratio between the maximum hyperpolarization reached during the current injection (V_{peak}) and the steady-state voltage (V_{steady}) near the end of the step, from the resting membrane potential (V_{rest}) (i.e ($V_{steady} – V_{rest}$) / ($V_{peak} – V_{rest}$)) (***Figure 2.B1***). For a –80pA step, we observed a strong trend toward an increased sag ratio in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (0.71 ± 0.023) compared to WT ones (0.65 ± 0.021; *p*=0.058) (***Figure 2.B2***). To allow for consistent comparisons across cells, we also calculated the sag ratio at a fixed hyperpolarization (***Figure 2.B3***; V_{steady} = –15 mV), and found a significant increase in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (0.79 ± 0.025 vs 0.69 ± 0.026; *p*=0.00750). This suggests that sag currents and by extension, HCN channel activity are reduced in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI compared to WT. We also measured the medium after-hyperpolarisation (mAHP) after a train of induced action potentials (APs), (***Figure 2.C1***) particularly reflecting the BKCa channels activity. We identified an increased amplitude of the mAHP in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI compared to WT (*p<0.01*) (***Figure 2.C2***), which was very consistent across protocols inducing 5 or 15 APs at different frequencies.

Conversely, the rectification index reflecting the inwardly rectifying potassic current (Kir) activity was calculated following a voltage-clamp Ramp protocol (from -40mV to -120mV) but we could not observe any difference between genotypes (***Figure S3.A***).

We also looked at AP kinetics (***Figure 2.D1 and E1***) and found an increased half-width in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (1.35 ± 0.069ms) compared to WT ones (1.11 ± 0.081ms; *p*=0.0097) (***Figure 2.D2***), associated with a decreased rising slope (123.47 ± 7.7835 V/s vs 167.85 ± 13.556 V/s; *p*=0.0042) (***Figure 2.E2***). By contrast, other AP properties, including AP amplitude and fast AHP (fAHP), did not differ between genotypes (***Figure S3.A***).

In addition, a principal component analysis (PCA) performed on the main recorded electrophysiological parameters revealed a clear separation between the two genotypes (***Figure 2.F1***). A logistic regression classifier was also trained based on these parameters and was able to predict the genotype of neurons with an average accuracy of 70% (F1 score=0.73 for *Fmr1*$^{-/y}$ and 0.66 for WT, ***Figure 2.F2***), thereby reinforcing that SGI from these two genotypes exhibit very specific and distinct properties.
Finally, these differences between genotypes were not related to sampling bias since we could find the same proportions of different patterns of discharge (single, transient and tonic) between the two genotypes (***Figure S3.B***)

These results suggest that, *Fmr1*$^{-/y}$ and WT SGI display very different intrinsic properties, with potential alterations in HCN and BKCa channels in *Fmr1*$^{-/y}$.

SGI in *Fmr1*$^{-/y}$ display altered coding capabilities for high and low intensity stimulations.

Since *Fmr1*$^{-/y}$ and WT SGI exhibit markedly different intrinsic properties, we next investigated whether their excitability profiles were also altered. At low stimulation intensities (close to the RMP), *Fmr1*$^{-/y}$ SGI fired significantly more APs than WT SGI (***Figure 3.A1-A3***). In contrast, for highest current injections *Fmr1*$^{-/y}$ SGI were less excitable than their WT counterparts (***Figure 3.A2-A3***).

This hyperexcitability close to the RMP was associated with a reduced rheobase in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (***Figure 3.B;*** 11.1 ± 2.09pA vs 17.4 ± 1.91pA, *p*=0.0064) as well as a greater proportion of spontaneously active neurons (***Figure 3.C;*** 42% vs 18%; *p*=0.032). In accordance with these findings, *Fmr1*$^{-/y}$ SGI showed an increased number of rebounds AP following hyperpolarizing steps (***Figure 3.D***).

In parallel, we observed enhanced frequency adaptation in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (***Figure 3.E1***) meaning that interspike intervals increased more over increased AP number during sustained firing, and this was not accompanied by any change in the spike amplitude adaptation between genotypes (***Figure 3.E2***). These results support the idea that *Fmr1*$^{-/y}$ SGI become hypoexcitable under strong and sustained stimulations, which may explain why *Fmr1*$^{-/y}$ SGI's firing rate reach a plateau for the highest intensities.

To quantify these differences, we defined the dynamic range of each SGI as the current span between the rheobase and the current intensity inducing maximal firing rate. This range was narrower in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (***Figure 3.F;*** 60.91 ± 3.22pA vs 74.00 ± 3.26pA; *p*=0.006), and its center point was shifted toward lower intensities (40.91 ± 2.45pA) compared to WT SGI (53.86 ± 1.65pA; *p*=0.000085).

To further explore a potential link between the observed excitability changes and altered intrinsic properties previously described, we plotted the sag ratio against the maximum number of AP elicited (***Figure 3.G***), and identified a significant negative correlation (r^2=0.189; *p*=4.013e-05). By contrast, no correlation was observed between the amplitude of mAHP and the maximal firing frequency exhibited by SGI neurons (data not shown).

Together, these results reveal a dysregulation of intrinsic excitability in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI characterized by a lower rheobase and hyperexcitability to weak stimulation, but reduced capacity to sustain high-frequency firing under strong stimulation. Consequently, *Fmr1*$^{-/y}$ SGI display a narrowed dynamic range which likely impairs the ability of these neurons to properly integrate synaptic inputs and generate appropriately scaled discharge and potentially disrupts sensory processing in the spinal cord.

Reduced HCN function alone is insufficient to explain the altered excitability of *Fmr1*$^{-/y}$ SGI.

Because of the negative correlation reported above between sag ratio and the maximum number of AP elicited in SGI, we asked whether pharmacological manipulation of HCN channels could account for the altered excitability of *Fmr1*$^{-/y}$ SGI. We previously showed that sag currents and by extension, HCN activity were reduced in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI compared to WT. Since no HCN agonist is available, we applied the HCN blocker ZD7288 (10µM) to test whether reduced HCN activity could reproduce the *Fmr1*$^{-/y}$ phenotype in WT neurons. As expected,

ZD7288 increased sag ratio and by extension decreased sag currents in both WT (***Figure S4.A1–A2***) and *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (***Figure S4.B1–B2***), confirming its efficacy.

However, ZD7288 did not alter overall excitability neither in WT SGI (***Figure S4.A3***) nor in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI (***Figure S4.B3***). A mixed three-way ANOVA nevertheless revealed a significant interaction between genotype and drug treatment (p=0.041), suggesting that the effect of HCN channel blockade differs subtly between WT and *Fmr1*$^{-/y}$ SGI.

Together, these results indicate that decreased HCN activity alone cannot explain the excitability changes observed in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI and that additional ionic mechanisms beyond HCN dysfunction contribute to the excitability defects observed in this model.

Spontaneous excitatory inputs to SGI are reduced in *Fmr1*$^{-/y}$ mice, with slower kinetics.

To gain further understanding of the effects of this dysregulated excitability of *Fmr1*$^{-/y}$ SGI, we recorded spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSC) in SGI (***Figure 4.A***) by assessing their frequency, amplitude, and kinetics. As indicated by the shift in the interval cumulative distribution curve toward the right (***Figure 4.B left***), sEPSC frequency was significantly reduced in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI compared to WT counterparts, but the amplitude of sEPSC was not different (***Figure 4.B right***).

Regarding the averaged sEPSC decay kinetics (***Figure 4.C1***), comparison between genotypes revealed an increased time to peak (***Figure 4.C2;*** 1.3 ± 0.09ms vs 1.0 ± 0.072ms, p=0.0029), time constant (***Figure 4.C3;*** 6.39 ± 0.63ms vs 4.60 ± 0.55ms, p=0.037) and half-width (***Figure 4.C4;*** 4.2 ± 0.3ms vs 3.1 ± 0.2ms, p=0.026) in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI.

These findings suggest a reduction in the spontaneous excitatory synaptic drive onto *Fmr1*$^{-/y}$ SGI which might be partially counterbalanced by a prolongation of individual sEPSC. Moreover, the reduced frequency of EPSCs in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI suggests an increased inhibitory tone in the dorsal spinal cord network, possibly reflecting the hyperexcitability of SGI at resting potential.

SGI hyperexcitability close to the resting membrane potential has no effect on inhibitory synaptic transmission *ex vivo*.

To investigate whether the hyperexcitability of *Fmr1*$^{-/y}$ SGI close to the RMP resulted in alterations in the overall inhibitory tone in dorsal horn spinal cord of *Fmr1*$^{-/y}$ mice, we first quantified basal concentration of inhibitory neurotransmitters in dorsal horns spinal cord

slices (***Figure 5.A1-A2***) using capillary electrophoresis. GABA (*Fmr1*$^{-/y}$: 6.9 ± 0.31nmol/mg vs WT: 6.99 ± 0.39nmol/mg; *p*=0.80), Glycine (*Fmr1*$^{-/y}$: 12.6 ± 0.44nmol/mg vs WT: 12.4 ± 0.52nmol/mg; *p*=0.80) but also Glutamate (*Fmr1*$^{-/y}$: 12.99 ± 0.80nmol/mg vs WT: 13.2 ± 1.10nmol/mg; *p*=0.74) concentrations did not appear to be different between genotypes (***Figure 5.A3***). In addition, (GABA+Glycine)/Glutamate concentrations ratios (*Fmr1*$^{-/y}$: 1.52 ± 0.039 vs WT: 1.52 ± 0.07; *p*=0.99) did not show any difference between *Fmr1*$^{-/y}$ and WT slices, indicating no alterations of the inhibition-excitation ratio at basal level in *ex vivo* dorsal spinal slices.

We then recorded spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sIPSC) (***Figure 5.B1-B2***) using whole-cell patch-clamp recordings of excitatory neurons (GFP^{-}) with enriched chloride internal solutions and ACSF complemented with CNQX and APV to isolate inhibitory currents. Overall frequency of sIPSC did not differ between genotypes (***Figure 5.B3;*** *Fmr1*$^{-/y}$: 0.37 ± 0.30Hz vs WT: 0.26 ± 0.11Hz, *p*=0.71) and the averaged sIPSC decay kinetics (half-width: *Fmr1*$^{-/y}$: 6.1 ± 0.3ms vs WT : 7.0 ± 0.3ms, *p*=0.23, amplitude: *Fmr1*$^{-/y}$: 41.06 ± 3.29pA vs WT : 44.33 ± 2.68pA, *p*=0.19, and time to peak: *Fmr1*$^{-/y}$: 1.9 ± 0.08ms vs W : 1.8± 0.05ms, *p*=0.71) neither (***Figure 5.B4-B5***).

Finally, to investigate whether presynaptic inhibition of primary glutamatergic afferences mediated by SGI differs between WT and *Fmr1*$^{-/y}$, we recorded the synaptic responses evoked in GFP^{-} neurons by paired stimulations of attached dorsal roots (***Figure 5.C1-C2***). The paired-pulse ratio of the synaptic response did not differ between the two genotypes (***Figure 5.C3;*** *Fmr1*$^{-/y}$: 0.93 ± 0.041 vs WT: 0.87 ± 0.056; *p*=0.3475).

Altogether, our data indicate that despite the observed SGI hyperexcitability in *Fmr1*$^{-/y}$ mice, no functional consequence was detected on baseline somatosensory synaptic transmission at the spinal level *ex vivo*.

SGI in *Fmr1*$^{-/y}$ mice do not exhibit any dendritic remodelling.

To determine whether intrinsic properties and excitability alterations observed in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI could be associated with changes in their dendritic morphology, we performed biocytin injection of GFP^{+} neurons following electrophysiological recordings to allow post hoc reconstruction of their dendritic arborization. We classified our recorded neurons according to three of the main classes of dorsal horn inhibitory interneurons morphology already known

and well described in the literature (Grudt and Perl, 2002; Smith et al., 2015; Todd, 2017) : vertical, central and islet (***Figure S5.A***). The distribution of these morphological classes was comparable between genotypes, suggesting no sampling bias in our dataset (***Figure S5.B***).

For consistency and robustness, we focused subsequent analyses on islet cells, which were the most prevalent in our sample. Neither Sholl analysis (***Figure S5.C***) nor more global morphological parameters analysis such as the total number of nodes (*Fmr1*$^{-/y}$: 49.9 ± 8.68; WT: 64.4 ± 7.5 *p*=0.221) and terminal ends (*Fmr1*$^{-/y}$: 55.6 ± 9.11 WT: 72.2 ± 8.02 *p*=0.18; ***Figure S5.D***) revealed any significant differences between genotypes. It should be noted that combining the three morphological types to run the same analyses yielded similar negative results (data not shown).

Our results then indicate that *Fmr1*$^{-/y}$ SGI intrinsic excitability alterations are not associated with dendritic remodelling.

SGI recorded through patch-seq technique exhibit typical inhibitory spinal neuron transcriptomes in both *Fmr1*$^{-/y}$ and WT mice.

A large diversity of inhibitory interneurons types is involved in sensory information transmission in superficial laminae of dorsal horn spinal cord. Recent studies in RNA sequencing have further suggested that unbiased transcriptomic classification of these populations may outperform other classifications based on neurochemical or morphological analysis (Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018). In order to classify SGI into these different subpopulations based on their transcriptomic similarities, we used the patch-seq technique in which following electrophysiological recordings and biocytin injection of these GFP^{+} neurons, we collected their cytosol to perform the transcriptomic characterization.

Among 104 neurons recorded in both genotypes, 83 neurons displaying both high quality cDNA libraries and electrophysiological recordings were kept for analyses, representing *Fmr1*$^{-/y}$: 45 cells/18 animals; WT: 38 cells/22 animals. Overall, the saved cDNA libraries displayed similar quality metrics such as number of total reads (***Figure S6.A1***), ribosome and mitochondria percentage (***Figure S6.A2-A3***), and gene diversity with 2000 different gene identified in average in *Fmr1*$^{-/y}$ and WT (***Figure S6.A4***). Most of the saved cDNA fragments mapped to exonic regions of the mouse genome (***Figure S6.B1-B2***), with less than half of reads

mapping to intronic (20%) (***Figure S6.B1-B3***) or intergenic (25%) regions (***Figure S6.B1-B4***) of the genome. This distribution is expected in patch-seq datasets, as the nucleus is sometimes collected with the cytosol (22%) and because the nuclear envelope can occasionally break during collection releasing part of its contents into the collected cytosol. Overall, those percentages are very close to the ones obtained in the patch-seq literature (Fuzik et al., 2016), indicating both high reproducibility of the technique and high quality of recovered transcriptomes.

Several studies have suggested the possibility of glial cell contamination in patch-seq libraries derived from slices. To investigate this, we used a reference transcriptomic dataset (noted sNuc) (Sathyamurthy et al., 2018) to compute a contamination index suggested from (Tripathy et al., 2018) comparing the expression of glial marker genes specifically for astrocytes, oligodendrocytes, and microglia into neuronal cells between reference neurons and our patch-seq dataset. Contamination indexes for astrocytes, oligodendrocytes and microglial markers were, on average, lower in patch-seq neurons than in the reference dataset (***Figure S7.A***). Overall, the glial contamination index was similarly distributed in patch-seq and reference neurons, with no difference observed between *Fmr1*$^{-/y}$ and WT SGI (***Figure S7.B***). Then, to support these results, we applied a machine learning classification approach to assess whether the transcriptomes corresponded to neuronal transcriptomes. A logistic regression classifier was trained on the reference single-nucleus dataset to classify cell types and achieved over 98% accuracy (***Figure S7.C***). We next applied this classifier to our dataset, and found that the strong majority of recorded SGI (62/71) were classified as neurons (***Figure S7.D***).

Additionally, we explored the expression of key markers characterizing dorsal horn inhibitory and excitatory neurons (Abraira et al., 2017). We found that inhibitory markers were consistently expressed in patch-seq neurons from both genotypes, while markers of excitatory spinal interneurons were largely absent (***Figure S7.E***). Again, in accordance with these results, logistic regression classifier was trained on the sNuc dataset to classify neuron subtypes (Inhibitory, Excitatory, Mixed, Cholinergic) (***Figure S7.F***) with more than 87% accuracy, and the strong majority (66/71) of our patch-seq recorded neurons were classified as inhibitory neurons (***Figure S7.G***).

Altogether, analyses of recovered cDNA libraries demonstrate that the transcriptomes obtained from SGI in both *Fmr1*$^{-/y}$ and WT conditions are highly representative of spinal dorsal horn inhibitory neurons.

SGI recorded can be classified into 2 different subpopulations based on their transcriptomic properties.

After validating the quality of our SGI transcriptomes, we assessed whether different neuronal subpopulations could be identified based on transcriptomic similarities. We first computed a cell correlation matrix based on correlated gene expression. Hierarchical agglomerative clustering of the matrix revealed an apparent partition into two or three main clusters (***Figure 6.A***). However, further silhouette score analysis revealed that the two-cluster solution better captured the underlying data structure (data not shown). We next refined our clustering analysis using Leiden community detection algorithm and defined two well separated clusters (see UMAP projections on ***Figure 6.B1***). Overall, the clustering solutions yielded by agglomerative or Leiden algorithm were very similar (***Figure 6.B2***)***.*** Strikingly, the *Fmr1*$^{-/y}$ and WT SGI distribution was comparable between the two clusters, suggesting no sampling bias and the reliability of the clustering (***Figure 6.B3 and B4***).

To further investigate the gene expression profiles of these two clusters, we first examined the top 15 genes defining each cluster, as assessed by logistic regression classifier (***Figure 6.C***), but none of these genes appeared to be of particular relevance to our study. We then focused on the expression of selected neuronal marker including general synaptic markers such as *Synaptophysin (Syp)* and *Snap25*, but also *Slc6a1* which is more specific of inhibitory GABAergic neurons (***Figure 6.D, top line***). *Syp* and *Slc6a1* expression was similar between the two clusters, showing that both cluster express strong neuronal marker, although *Snap25* expression was higher in cluster 1 (***Figure 6.E***).

To gain insight into the potential subpopulations represented by these clusters, we next assessed the expression of key markers of dorsal horn inhibitory neurons subpopulations, including *Nitric oxide synthase 1 (Nos1)*, *Parvalbumin (Pvalb)* and *Neuropeptide Y (Npy)* (***Figure 6.D, bottom line***) and found that *Nos1* was significantly more expressed in cluster 0, whereas *Pvalb* and *Npy* both showed higher expression in cluster 1 (***Figure 6.E***).

Taken together, those results suggest that our recorded SGI could be divided into two distinct subpopulations, one characterized by high expression of *Nos1* (cluster 0), the other one by the strong expression of *Pvalb* and/or *Npy* (cluster 1).

Transcriptomic clusters correspond to distinct functional neuronal populations displaying electrophysiological differences independently of technical quality bias.

To gain deeper insight into the nature of each cluster, we analysed their respective electrophysiological profiles. The capacitance was higher in cluster 1 than in cluster 0 (***Figure 7.A2, left***; cluster 0: 47.12 ± 3.837pF vs cluster 1: 61.401 ± 5.454pF; *p*=0.032) whereas the input resistance (cluster 0: 590.479 ± 90.635 MΩ vs cluster 1: 461.137 ± 50.417 MΩ) and time constant (cluster 0: 27.5 ± 2.35ms vs cluster 1: 28.5 ± 2.43ms) were not different between clusters (***Figure 7.A1 and A2: middle and right***), suggesting that the clustering is not driven by differences in cell quality or viability.

We then compared the excitability profiles of the two clusters, by first looking at the different firing pattern. The proportions of tonic, transient, and single-spike firing were similar in clusters 0 and 1 (***Figure 7.B***) showing no sampling bias in the clustering. We observed a trend toward higher excitability in neurons from cluster 1 compared to cluster 0 at the lowest current injection intensities, although this difference did not reach statistical significance (***Figure 7.C left***). Rebounds AP did not differ between clusters (***Figure 7.C, right***).

We next focused more on AP kinetics (***Figure 7.D1***), and in accordance with previous result, we found that cluster 1 neurons displayed a more hyperpolarised spike threshold compared to cluster 0 (***Figure 7.D2 left***; cluster 0: -33.711 ± 1.0mV vs cluster 1: -36.547 ± 1.3 mV; *p*=0.021), together with a decreased fAHP amplitude (***Figure 7.D2 right***; cluster 0: 9.237 ± 0.999mV vs cluster 1: 6.116 ± 0.758 mV; *p*=0.025) supporting the trend toward increased excitability observed in cluster 1.

Taken together these results suggest that the two clusters are composed of healthy and viable neurons and that they both represent functionally distinct inhibitory neuron subtypes with different excitability profiles.

***Pvalb-Npy* but not *Nos1* positive population, undergo dramatic electrophysiological plasticity in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI.**

To determine whether *Fmr1*$^{-/y}$ related alterations in SGI coding properties and intrinsic properties are equally affecting both clusters, we compared the electrophysiological properties of WT and *Fmr1*$^{-/y}$ SGI within each cluster.

PCA performed on the main recorded electrophysiological parameters revealed a clear separation between the two genotypes only in the cluster 1 (*Pvalb-Npy*) (***Figure 8.A1-A2***), suggesting that functional alterations associated with *Fmr1*$^{-/y}$ genotype are more prominent in cluster 1 SGI (*Pvalb-Npy*). As both clusters are composed of equivalent numbers of *Fmr1*$^{-/y}$ and WT cells (***Figure 6.B4***), it is extremely unlikely that this segregation results from a sampling bias, but rather highlights different functional trajectories of cluster 0 and 1 SGI neurons upon *Fmr1* deletion.

We then focused on the excitability profiles of each genotype within each cluster. In cluster 0 (*Nos1*) WT and *Fmr1*$^{-/y}$ SGI exhibited similar excitability profile, whereas in cluster 1 (*Pvalb+Npy*) *Fmr1*$^{-/y}$ SGI were firing less AP for highest intensities of current injected (***Figure 8.B1***). In accordance with this result, we identified a narrower dynamic range for *Fmr1*$^{-/y}$ SGI from cluster 1 (***Figure 8.B2***; 51.111 ± 9.044pA vs 79.286 ± 4.122pA; p=0.0044), shifted towards smaller intensities of current injected (***Figure 8.B3***; 37.778 ± 5.4078pA vs 52.5 ± 2.33pA; p=0.0098) (as similarly seen in ***Figure 3*** while analysing the full dataset together). These findings indicate that only *Fmr1*$^{-/y}$ SGI from cluster 1 were exhibiting altered excitability.

To further investigate these electrophysiological differences, we analysed parameters that appeared to be different in previous analyses while comparing the entire dataset together. Sag ratio was more important in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI only in cluster 1 (*Pvalb+Npy*) compared to WT counterparts (***Figure 8.C1-C3***: cluster 1: (for ΔV=-15mV) *Fmr1*$^{-/y}$: 0.849 ± 0.0408 vs WT: 0.701 ± 0.0353; p=0.013), suggesting decreased sag-currents and by extension HCN activity specifically in *Fmr1*$^{-/y}$ *Pvalb* and *Npy* neurons. We also looked at AP kinetics (***Figure 8.D1 and E1***) and found an increased half-width in *Fmr1*$^{-/y}$ *Pvalb* and *Npy* neurons (1.846 ± 0.301ms) compared to WT ones (1.218 ± 0.146ms; p=0.0423) (***Figure 8.D2***), associated with a decreased rising slope (93.206 ± 17.210V/s vs 165.475 ± 17.541V/s; p=0.011) (***Figure 8.E2***). In the contrary *Fmr1*$^{-/y}$ *Nos 1* neurons did not display any changes in half-width (1.410 ± 0.114ms vs

1.347 ± 0.115ms; *p*=0.6980) nor rising slope (102.722 ± 12.725V/s vs 116.757 ± 15.534V/s; *p*=0.829) compared to their WT counterparts (***Figure 8.D2 and E2***), suggesting larger and longer AP only in *Fmr1*$^{-/y}$ *Pvalb* and *Npy* expressing neurons.

Together, our findings demonstrate that in *Fmr1*$^{-/y}$ mice, only part of SGI neurons, expressing *Pvalb* and *Npy* undergo strong functional plasticity, while *Nos1* positive neurons coding properties remain unaltered.

Reduced spontaneous excitatory drive onto *Pvalb-Npy* neurons in *Fmr1*$^{-/y}$ mice.

Finally, to examine whether the excitatory synaptic drive to SGI neurons is also altered in a cluster-specific manner upon *Fmr1* deletion, we analysed sEPSC frequency and kinetics between genotypes within each cluster. As indicated by the shift in the interval cumulative distribution curve toward the right only in cluster 1 (***Figure S8.A1 and A2***), sEPSC frequency was significantly reduced in *Pvalb-Npy Fmr1*$^{-/y}$ neurons compared to WT counterparts, but the amplitudes of sEPSC were not different between the two genotypes neither in cluster 0 nor cluster 1 (***Figure S8.A3-A4***).

Concerning the averaged sEPSC decay kinetics (***Figure S8.B1 and B3***), comparison between genotypes in each cluster did not reveal any changes neither in half-width (***Figure S8.B2 and B4;*** cluster 0, *Fmr1*$^{-/y:}$ 3.819 ± 0.696ms vs WT: 4.634 ± 1.780ms; *p*=0.658 | cluster 1, *Fmr1*$^{-/y}$: 4.130 ± 0.602ms vs WT: 3.3068 ± 0.396ms; *p*=0.260), time constant (***Figure S8.B5 and B7;*** cluster 0, *Fmr1*$^{-/y}$: 7.323 ± 1.275ms vs WT: 4.674 ± 1.153 ms; *p*=0.139 |cluster 1, *Fmr1*$^{-/y}$: 5.362 ± 0.807ms vs WT: 4.987 ± 0.822ms; *p*=0.783) nor time to peak (***Figure S8.B6 and B8;*** cluster 0, *Fmr1*$^{-/y}$: 1.232 ± 0.172ms vs WT: 0.990 ± 0.111ms; *p*=0.262 | cluster 1, *Fmr1*$^{-/y}$: 1.184 ± 0.122ms vs WT: 0.995 ± 0.102ms; *p*=0.286).

These findings suggest a reduction in the spontaneous excitatory synaptic frequency drive onto *Pvalb-Npy Fmr1*$^{-/y}$ neurons.

Discussion

In this study, we confirmed that the *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* mouse model remains a relevant tool to investigate cellular correlates of autism, despite *Gad1* haploinsufficiency. We demonstrated that spinal GABAergic interneurons in *Fmr1*$^{-/y}$ mice exhibit impairments in their intrinsic electrophysiological properties resulting in altered coding capabilities. Using transcriptomic clustering, we identified two distinct subpopulations of SGI which differed in intrinsic electrophysiological properties. In *Fmr1*$^{-/y}$ mice, altered excitability was restricted to the *Pvalb–Npy* subpopulation, while the *Nos1* neurons remained unaffected.

At the behavioral level, our findings partly diverge from previous reports. While most studies in autism models, including *Fmr1*$^{-/y}$, have described hairy skin tactile hyperreactivity to gentle touch (Orefice et al., 2016; Tasnim et al., 2024), our mice displayed hyporeactivity on glabrous skin, in brushing, tape removal, and textured open field but hyperreactivity to mechanical stimulation with the softest Von Frey filament. Specific tactile tasks such as deficits in texture discrimination (Orefice et al., 2016), also reveal diminished tactile engagement. By contrast, no difference was observed in mechanical nociceptive responses with calibrated Von Frey filaments, in line with (Price et al., 2007) but contradicted by (Martin et al., 2022), in which *Fmr1*$^{-/y}$ mice are shown to display mixed pain responses dependent on the sensory modality. Although we did not directly test different nociceptive modalities, we cannot exclude the possibility that other forms of pain sensitivity (thermal, chemical…) may also be altered in this model. These results align with the complexity and variability of behavioral phenotypes observed in *Fmr1*$^{-/y}$ mice depending on age, genetic background but also on testing paradigm (Ey et al., 2011; Pietropaolo et al., 2011; Spencer et al., 2011; Kazdoba et al., 2014). Such discrepancies may reflect the fact that different behavioral assays engage distinct populations of LTMRs, which could be differentially affected by the *Fmr1* mutation, leading to modality-specific sensory phenotypes. Beyond tactile behaviors, our data also confirm two robust features of the *Fmr1*$^{-/y}$ model: reduced anxiety-like behavior and social deficits. Both have been consistently reported in previous studies (Mineur et al., 2002; Hébert et al., 2014; Saré et al., 2016; Ferraguto et al., 2024), reinforcing the validity of this mouse line as a model for autism-related phenotypes. Interestingly, stereotyped behaviors were not affected in our model, in contrast to what has sometimes been reported (Pietropaolo et al., 2011; Ferraguto et al., 2024). Overall, the combination of altered tactile responses, reduced anxiety, and

impaired sociability in our cohort supports the relevance of the *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* model for investigating circuit mechanisms of autism, despite *Gad1* haploinsufficiency. However, it should be noted that sensory deficits associated with *Gad1* haploinsufficiency are more prominent in females than males (Charron et al., 2024), suggesting that the model may be most reliable in male mice.

At the cellular level, SGI in *Fmr1*$^{-/y}$ mice exhibited altered intrinsic properties, including increased input resistance and time constant, broader AP, and increased sag ratio. Comparable alterations of intrinsic excitability have been described in other brain regions of *Fmr1*$^{-/y}$ mice, such as pyramidal neurons in primary somatosensory cortex (Zhang et al., 2014), excitatory stellate cells and fast spiking GABAergic interneurons in layer 4 of barrel cortex (Domanski et al., 2019) and hippocampal neurons (Deng et al., 2013). Interestingly, while excitatory neurons such as pyramidal and stellate cells tend to show increased excitability (Zhang et al., 2014; Domanski et al., 2019), fast-spiking GABAergic cortical interneurons display reduced output under sustained depolarization (Domanski et al., 2019), a profile strikingly similar to the SGI alterations we report here. Our data further indicate that these changes selectively affect *Pvalb–Npy* neurons, consistent with prior evidence that *Pvalb* neurons gate somatosensory information including nociceptive one: their ablation induces mechanical allodynia, whereas their activation alleviates hypersensitivity in neuropathic pain models (Petitjean et al., 2015; Rankin et al., 2024). In line with this, we observed reduced firing of *Pvalb* neurons *ex-vivo* for the highest intensities of current injected in *Fmr1*$^{-/y}$ mice. Notably, direct evidence for altered intrinsic excitability of spinal *Pvalb* interneurons in pathological contexts is scarce. Qiu et al., 2024 recently reported that *Pvalb* neurons in a neuropathic pain model fail to sustain prolonged firing, and apart from age-related changes described in (Gradwell et al., 2022), no study has reported such deficits in a neurodevelopmental disorder. This highlights the novelty of our findings, providing the first evidence that excitability defects in spinal *Pvalb* interneurons may contribute to circuit dysfunction in an autism-related model. *NPY* neurons also showed impaired firing at high current intensities, consistent with their known inhibitory role in gating somatosensory transmission (notably pain and itch) (Boyle et al., 2023; Zeng et al., 2025). Together, these results suggest that SGI dysfunction in *Fmr1*$^{-/y}$ mice converge on the *Pvalb–Npy* population, a critical hub for sensory processing.

Such selective deficits in excitability raise the question of which ion channel dysfunctions, may drive these impairments. Given the correlation between sag ratio and the maximum number of evoked action potentials, HCN channels initially appeared as plausible candidates, although our preliminary attempts at manipulating their activity do not support a major contribution.

Another strong candidate is the large-conductance calcium-activated potassium (BKCa) channels which reduced activity has been repeatedly reported in *Fmr1*$^{-/y}$ mouse model, while pharmacological enhancement of BKCa activity rescued S1 pyramidal (Zhang et al., 2014; Bhaskaran et al., 2023) and hippocampal excitability (Deng et al., 2013), but also behavioral phenotypes (Hébert et al., 2014; Carreno-Munoz et al., 2018; Ferraguto et al., 2024; Semelidou et al., 2024). Those findings are supported by the demonstration showing that FMRP loss directly reduces BK channels activity (Kshatri et al., 2020). Finally, small-conductance Ca^{2+}-activated potassium (SK) channels also represent a compelling possibility. In a neuropathic pain model, Qiu et al., 2024 showed that inhibiting SK channels with the blocker Apamin restored tonic firing in spinal *Pvalb* interneurons exhibiting abnormal spike frequency adaptation. This observation closely mirrors the increased spike frequency adaptation and inability to sustain high-frequency firing that we observed in *Fmr1*$^{-/y}$ *Pvalb* neurons, supporting the hypothesis that SK channel dysfunction could contributes to their excitability defects.

Downregulation of *Pvalb* interneurons and Pvalb protein have been consistently reported across several autism mouse models (Selby et al., 2007; Peñagarikano et al., 2011; Filice et al., 2016; Vogt et al., 2018). Similarly, specific *Fmr1* deletion in *Pvalb* neurons resulted in selective behavioral deficits associated with fragile X syndrome and autism (Kalinowska et al., 2022). A first reason why these neurons might be selectively vulnerable lies in their fast-spiking phenotype, which is energetically highly demanding (Kann et al., 2014). To sustain this activity, Pvalb neurons contain more mitochondria than most neuronal subtypes, making them particularly sensitive to metabolic stress and excessive generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS, NOS; Kann, 2016). Increased ROS levels have indeed been proposed as a pathophysiological mechanism in autism (Tang et al., 2013; Pangrazzi et al., 2020) consistent with elevated ROS reported in postmortem autistic brain tissue (Siddiqui et al., 2016).

A second factor concerns the late postnatal maturation of *Pvalb* neurons, which overlaps with critical periods of circuit refinement. This makes them especially vulnerable to developmental

disturbances (Marín, 2016). In the opposite, *Nos1* expressing interneurons which were spared in our study, emerge earlier in development (Magno et al., 2012). Interestingly, *Pvalb* neurons maturation is further delayed in *Fmr1*$^{-/y}$ mice (Nomura, 2021), likely exacerbated by the prominent delay in the normal excitatory to inhibitory switch of GABA during postnatal development due to elevated levels of NKCC1 expression beyond the first postnatal week in *Fmr1*$^{-/y}$ mice (He et al., 2014; Tyzio et al., 2014). Such combined metabolic and developmental vulnerabilities may explain why *Pvalb–NPY* interneurons, but not *Nos1* neurons, exhibit altered excitability in the *Fmr1*$^{-/y}$ model.

It is important to keep in mind certain limitations of our approach. First, we were able to identify only two subpopulations of SGI, whereas transcriptomic studies have reported a much higher diversity (Häring et al., 2018b; Sathyamurthy et al., 2018; Russ et al., 2021). This restricted sampling might be related with the use of the *Gad1-GFP* construct, which does not seem to label the entire GABAergic population as already noted in the literature (Heinke et al., 2004; Gassner et al., 2013). In addition, the number of neurons profiled with patch-seq technique remains relatively limited compared to large-scale single-cell RNA-seq studies (Häring et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2018; Russ et al., 2021), which may also have constrained the resolution of our clustering.

Our study provides a substantial advance in understanding somatosensory processing in autism. We presented the first integrated electrophysiologic, morphologic, and transcriptomic characterization of spinal GABAergic interneurons in the *Fmr1*$^{-/y}$ mouse model, revealing a specific vulnerability of the *Pvalb–NPY* subpopulation. These neurons displayed a paradoxical excitability profile, hyperexcitable at low levels of current injection but unable to sustain high-frequency firing under stronger stimulation. Near resting membrane potential, this dysfunction did not appear to alter baseline inhibitory synaptic transmission *ex vivo*. However, the reduced capacity of *Pvalb–NPY* neurons to maintain firing at higher intensities is likely to limit their ability to provide inhibitory control during periods of strong sensory drive. Future studies using targeted approaches such as chemogenetic activation will be essential to directly assess the functional impact of this hypoexcitability on spinal circuit dynamics and sensory processing. Overall, this work provides new insights into the cellular substrates of tactile dysfunction in autism and highlights spinal inhibitory circuits as potential therapeutic targets.

Bibliography

Abraira VE et al. (2017) The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. Cell 168:295-310.e19.

Abraira VE, Ginty DD (2013) The Sensory Neurons of Touch. Neuron 79:618–639.

American Psychiatric Association ed. (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 5th ed. Washington, D.C: American Psychiatric Association.

Balasco L, Provenzano G, Bozzi Y (2020) Sensory Abnormalities in Autism Spectrum Disorders: A Focus on the Tactile Domain, From Genetic Mouse Models to the Clinic. Front Psychiatry 10 Available at: https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsyt.2019.01016/full

Bhaskaran AA, Gauvrit T, Vyas Y, Bony G, Ginger M, Frick A (2023) Endogenous noise of neocortical neurons correlates with atypical sensory response variability in the Fmr1−/y mouse model of autism. Nat Commun 14:7905.

Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Freret T (2009) The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. Nat Protoc 4:1560–1564.

Boyle KA, Polgar E, Gutierrez-Mecinas M, Dickie AC, Cooper AH, Bell AM, Jumolea E, Casas-Benito A, Watanabe M, Hughes DI, Weir GA, Riddell JS, Todd AJ (2023) Neuropeptide Y-expressing dorsal horn inhibitory interneurons gate spinal pain and itch signalling. eLife 12:RP86633.

Candelas M, Reynders A, Arango-Lievano M, Neumayer C, Fruquière A, Demes E, Hamid J, Lemmers C, Bernat C, Monteil A, Compan V, Laffray S, Inquimbert P, Le Feuvre Y, Zamponi GW, Moqrich A, Bourinet E, Méry P-F (2019) Cav3.2 T-type calcium channels shape electrical firing in mouse Lamina II neurons. Sci Rep 9:3112.

Carreno-Munoz MI, Martins F, Medrano MC, Aloisi E, Pietropaolo S, Dechaud C, Subashi E, Bony G, Ginger M, Moujahid A, Frick A, Leinekugel X (2018) Potential Involvement of Impaired BKCa Channel Function in Sensory Defensiveness and Some Behavioral Disturbances Induced by Unfamiliar Environment in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. Neuropsychopharmacol 43:492–502.

Cascio CJ, Moore D, McGlone F (2019) Social touch and human development. Developmental Cognitive Neuroscience 35:5–11.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods 53:55–63.

Charron A, Pepino L, Malapert P, Debrauwer V, Castets F, Salio C, Moqrich A (2024) Sex-related exacerbation of injury-induced mechanical hypersensitivity in GAD67 haplodeficient mice. Pain 165:192–201.

Chen Q, Deister CA, Gao X, Guo B, Lynn-Jones T, Chen N, Wells MF, Liu R, Goard MJ, Dimidschstein J, Feng S, Shi Y, Liao W, Lu Z, Fishell G, Moore CI, Feng G (2020) Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD. Nat Neurosci 23:520–532.

Deacon RM (2006) Assessing nest building in mice. Nat Protoc 1:1117–1119.

Deng P-Y, Rotman Z, Blundon JA, Cho Y, Cui J, Cavalli V, Zakharenko SS, Klyachko VA (2013) FMRP Regulates Neurotransmitter Release and Synaptic Information Transmission by Modulating Action Potential Duration via BK Channels. Neuron 77:696–711.

Domanski APF, Booker SA, Wyllie DJA, Isaac JTR, Kind PC (2019) Cellular and synaptic phenotypes lead to disrupted information processing in Fmr1-KO mouse layer 4 barrel cortex. Nat Commun 10:4814.

Ey E, Leblond CS, Bourgeron T (2011) Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. Autism Research 4:5–16.

Ferraguto C, Piquemal-Lagoueillat M, Lemaire V, Moreau MM, Trazzi S, Uguagliati B, Ciani E, Bertrand SS, Louette E, Bontempi B, Pietropaolo S (2024) Therapeutic efficacy of the BKCa channel opener chlorzoxazone in a mouse model of Fragile X syndrome. Neuropsychopharmacol 49:2032–2041.

Filice F, Vörckel KJ, Sungur AÖ, Wöhr M, Schwaller B (2016) Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. Mol Brain 9:10.

Fuzik J, Zeisel A, Máté Z, Calvigioni D, Yanagawa Y, Szabó G, Linnarsson S, Harkany T (2016) Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes. Nat Biotechnol 34:175–183.

Gaetz W, Bloy L, Wang DJ, Port RG, Blaskey L, Levy SE, Roberts TPL (2014) GABA estimation in the brains of children on the autism spectrum: measurement precision and regional cortical variation. Neuroimage 86:1–9.

Gassner M, Leitner J, Gruber-Schoffnegger D, Forsthuber L, Sandkühler J (2013) Properties of spinal lamina III GABAERGIC neurons in naïve and in neuropathic mice. European Journal of Pain 17:1168–1179.

Goel A, Cantu DA, Guilfoyle J, Chaudhari GR, Newadkar A, Todisco B, De Alba D, Kourdougli N, Schmitt LM, Pedapati E, Erickson CA, Portera-Cailliau C (2018) Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. Nat Neurosci 21:1404–1411.

Gradwell MA, Smith KM, Dayas CV, Smith DW, Hughes DI, Callister RJ, Graham BA (2022) Altered Intrinsic Properties and Inhibitory Connectivity in Aged Parvalbumin-Expressing Dorsal Horn Neurons. Front Neural Circuits 16:834173.

Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. The Journal of Physiology 540:189–207.

Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, La Manno G, Sharma N, Borgius L, Kiehn O, Lagerström MC, Linnarsson S, Ernfors P (2018) Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. Nat Neurosci 21:869–880.

He JL, Wodka E, Tommerdahl M, Edden RAE, Mikkelsen M, Mostofsky SH, Puts NAJ (2021) Disorder-specific alterations of tactile sensitivity in neurodevelopmental disorders. Commun Biol 4:97.

He Q, Nomura T, Xu J, Contractor A (2014) The Developmental Switch in GABA Polarity Is Delayed in Fragile X Mice. J Neurosci 34:446–450.

Hébert B, Pietropaolo S, Même S, Laudier B, Laugeray A, Doisne N, Quartier A, Lefeuvre S, Got L, Cahard D, Laumonnier F, Crusio WE, Pichon J, Menuet A, Perche O, Briault S (2014) Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1KO mice by a BKCa channel opener molecule. Orphanet J Rare Dis 9:124.

Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkühler J (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. The Journal of Physiology 560:249–266.

Huzard D, Marias M, Granat C, Oliva G, Soubeyre V, Grellier G, Negm A, Devaux J, Bourinet E, François A (2025) Primary sensory neuron dysfunction underlying mechanical itch hypersensitivity in a Shank3 mouse model of autism. Available at: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.12.29.630575 [Accessed August 23, 2025].

Huzard D, Martin M, Maingret F, Chemin J, Jeanneteau F, Mery P-F, Fossat P, Bourinet E, François A (2022) The impact of C-tactile low-threshold mechanoreceptors on affective touch and social interactions in mice. Science Advances 8:eabo7566.

Kalinowska M, Van Der Lei MB, Kitiashvili M, Mamcarz M, Oliveira MM, Longo F, Klann E (2022) Deletion of Fmr1 in parvalbumin-expressing neurons results in dysregulated translation and selective behavioral deficits associated with fragile X syndrome. Molecular Autism 13:29.

Kann O (2016) The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. Neurobiology of Disease 90:75–85.

Kann O, Papageorgiou IE, Draguhn A (2014) Highly Energized Inhibitory Interneurons are a Central Element for Information Processing in Cortical Networks. J Cereb Blood Flow Metab 34:1270–1282.

Kazdoba TM, Leach PT, Silverman JL, Crawley JN (2014) Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse. IRDR 3:118–133.

Kshatri A, Cerrada A, Gimeno R, Bartolomé-Martín D, Rojas P, Giraldez T (2020) Differential regulation of BK channels by fragile X mental retardation protein. Journal of General Physiology 152:e201912502.

Li L, Rutlin M, Abraira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD (2011) The Functional Organization of Cutaneous Low-Threshold Mechanosensory Neurons. Cell 147:1615–1627.

Magno L, Oliveira MG, Mucha M, Rubin AN, Kessaris N (2012) Multiple embryonic origins of nitric oxide synthase-expressing GABAergic neurons of the neocortex. Front Neural Circuits 6 Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2012.00065/abstract

Marco EJ, Hinkley LBN, Hill SS, Nagarajan SS (2011) Sensory Processing in Autism: A Review of Neurophysiologic Findings.

Marín O (2016) Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. Nat Med 22:1229–1238.

Martin LJ, Poulson SJ, Mannan E, Sivaselvachandran S, Cho M, Setak F, Chan C (2022) Altered nociceptive behavior and emotional contagion of pain in mouse models of autism. Genes Brain and Behavior 21:e12778.

McCarthy DM, Vied C, Trupiano MX, Canekeratne AJ, Wang Y, Schatschneider C, Bhide PG (2024) Behavioral, neurotransmitter and transcriptomic analyses in male and female Fmr1 KO mice. Front Behav Neurosci 18:1458502.

Mientjes EJ, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-Westerveld M, Severijnen L, Rifé M, Willemsen R, Nelson DL, Oostra BA (2006) The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. Neurobiology of Disease 21:549–555.

Mineur YS, Sluyter F, De Wit S, Oostra BA, Crusio WE (2002) Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse. Hippocampus 12:39–46.

Nomura T (2021) Interneuron Dysfunction and Inhibitory Deficits in Autism and Fragile X Syndrome. Cells 10:2610.

Olsson KH, Kvarnemo C, Svensson O (2009) Relative costs of courtship behaviours in nest-building sand gobies. Animal Behaviour 77:541–546.

Orefice LL, Mosko JR, Morency DT, Wells MF, Tasnim A, Mozeika SM, Ye M, Chirila AM, Emanuel AJ, Rankin G, Fame RM, Lehtinen MK, Feng G, Ginty DD (2019) Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. Cell 178:867-886.e24.

Orefice LL, Zimmerman AL, Chirila AM, Sleboda SJ, Head JP, Ginty DD (2016) Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. Cell 166:299–313.

Otabi H, Okayama T, Toyoda A (2020) Assessment of nest building and social interaction behavior in mice exposed to acute social defeat stress using a three-dimensional depth camera. Animal Science Journal 91:e13447.

Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y (2020) Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. IJMS 21:3293.

Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E, Geschwind DH (2011) Absence of CNTNAP2 Leads to Epilepsy, Neuronal Migration Abnormalities, and Core Autism-Related Deficits. Cell 147:235–246.

Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan L-Y, Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R (2015) Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. Cell Reports 13:1246–1257.

Pietropaolo S, Guilleminot A, Martin B, D'Amato FR, Crusio WE (2011) Genetic-Background Modulation of Core and Variable Autistic-Like Symptoms in Fmr1 Knock-Out Mice Cushing B, ed. PLoS ONE 6:e17073.

Price TJ, Rashid MH, Millecamps M, Sanoja R, Entrena JM, Cervero F (2007) Decreased Nociceptive Sensitization in Mice Lacking the Fragile X Mental Retardation Protein: Role of mGluR1/5 and mTOR. J Neurosci 27:13958–13967.

Puts NAJ, Wodka EL, Tommerdahl M, Mostofsky SH, Edden RAE (2014) Impaired tactile processing in children with autism spectrum disorder. Journal of Neurophysiology 111:1803–1811.

Qiu H, Miraucourt LS, Petitjean H, Xu M, Theriault C, Davidova A, Soubeyre V, Poulen G, Lonjon N, Vachiery-Lahaye F, Bauchet L, Levesque-Damphousse P, Estall JL, Bourinet E, Sharif-Naeini R (2024) Parvalbumin gates chronic pain through the modulation of firing patterns in inhibitory neurons. Proc Natl Acad Sci USA 121:e2403777121.

Rankin G, Chirila AM, Emanuel AJ, Zhang Z, Woolf CJ, Drugowitsch J, Ginty DD (2024) Nerve injury disrupts temporal processing in the spinal cord dorsal horn through alterations in PV+ interneurons. Cell Reports 43:113718.

Rice FL, Albrecht PJ (2008) Cutaneous Mechanisms of Tactile Perception: Morphological and Chemical Organization of the Innervation to the Skin. In: The Senses: A Comprehensive Reference, pp 1–31. Elsevier. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123708809003406 [Accessed August 23, 2025].

Russ DE, Cross RBP, Li L, Koch SC, Matson KJE, Yadav A, Alkaslasi MR, Lee DI, Le Pichon CE, Menon V, Levine AJ (2021) A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. Nat Commun 12:5722.

Saré RM, Levine M, Smith CB (2016) Behavioral Phenotype of Fmr1 Knock-Out Mice during Active Phase in an Altered Light/Dark Cycle. eneuro 3:ENEURO.0035-16.2016.

Sathyamurthy A, Johnson KR, Matson KJE, Dobrott CI, Li L, Ryba AR, Bergman TB, Kelly MC, Kelley MW, Levine AJ (2018) Massively Parallel Single Nucleus Transcriptional Profiling Defines Spinal Cord Neurons and Their Activity during Behavior. Cell Reports 22:2216–2225.

Selby L, Zhang C, Sun Q-Q (2007) Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. Neuroscience Letters 412:227–232.

Semelidou O, Gauvrit T, Vandromme C, Cornier A, Saint-Jean A, Feuvre YL, Ginger M, Frick A (2024) Disrupted stimulus encoding shapes tactile perception in autism. :2024.08.08.607129 Available at: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.08.607129v1.

Siddiqui MF, Elwell C, Johnson MH (2016) Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. Autism Open Access 6 Available at: https://www.omicsgroup.org/journals/mitochondrial-dysfunction-in-autism-spectrum-disorders-2165-7890-1000190.php?aid=81661.

Smith KM, Boyle KA, Madden JF, Dickinson SA, Jobling P, Callister RJ, Hughes DI, Graham BA (2015) Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. J Physiol 593:4319–4339.

Spencer CM, Alekseyenko O, Hamilton SM, Thomas AM, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2011) Modifying behavioral phenotypes in Fmr1 KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. Autism Research 4:40–56.

Suarez MA (2012) Sensory processing in children with autism spectrum disorders and impact on functioning. Pediatr Clin North Am 59:203–214, xii–xiii.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. J of Comparative Neurology 467:60–79.

Tang G, Gutierrez Rios P, Kuo S-H, Akman HO, Rosoklija G, Tanji K, Dwork A, Schon EA, DiMauro S, Goldman J, Sulzer D (2013) Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. Neurobiology of Disease 54:349–361.

Tasnim A, Alkislar I, Hakim R, Turecek J, Abdelaziz A, Orefice LL, Ginty DD (2024) The developmental timing of spinal touch processing alterations predicts behavioral changes in genetic mouse models of autism spectrum disorders. Nat Neurosci 27:484–496.

Thye MD, Bednarz HM, Herringshaw AJ, Sartin EB, Kana RK (2018) The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. Developmental Cognitive Neuroscience 29:151–167.

Todd AJ (2017) Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. Mol Pain 13:1744806917693003.

Tomchek SD, Dunn W (2007) Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. Am J Occup Ther 61:190–200.

Tripathy SJ, Toker L, Bomkamp C, Mancarci BO, Belmadani M, Pavlidis P (2018) Assessing Transcriptome Quality in Patch-Seq Datasets. Front Mol Neurosci 11:363.

Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, Khalilov I, Tsintsadze V, Brouchoud C, Chazal G, Lemonnier E, Lozovaya N, Burnashev N, Ben-Ari Y (2014) Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. Science 343:675–679.

Vogt D, Cho KKA, Shelton SM, Paul A, Huang ZJ, Sohal VS, Rubenstein JLR (2018) Mouse Cntnap2 and Human CNTNAP2 ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV+ Cortical Interneurons. Cerebral Cortex 28:3868–3879.

Wang L-H, Ding W-Q, Sun Y-G (2022) Spinal ascending pathways for somatosensory information processing. Trends in Neurosciences 45:594–607.

Wei J, Carroll RJ, Harden KK, Wu G (2012) Comparisons of treatment means when factors do not interact in two-factorial studies. Amino Acids 42:2031–2035.

Zeng Q, Li Y, Wu Y, Wu J, Xu K, Chen Y, Rao Y, Li N, Luo Y, Jiang C, Wu C, Wang Z (2025) Neuropeptide Y neurons mediate opioid-induced itch by disinhibiting GRP-GRPR microcircuits in the spinal cord. Nat Commun 16:7074.

Zhai J, Li X, Zhou Y, Fan L, Xia W, Wang X, Li Y, Hou M, Wang J, Wu L (2023) Correlation and predictive ability of sensory characteristics and social interaction in children with autism spectrum disorder. Front Psychiatry 14:1056051.

Zhang Y, Bonnan A, Bony G, Ferezou I, Pietropaolo S, Ginger M, Sans N, Rossier J, Oostra B, LeMasson G, Frick A (2014) Dendritic channelopathies contribute to neocortical and sensory hyperexcitability in Fmr1−/y mice. Nat Neurosci 17:1701–1709.

Figures and Legends:

Figure 1:

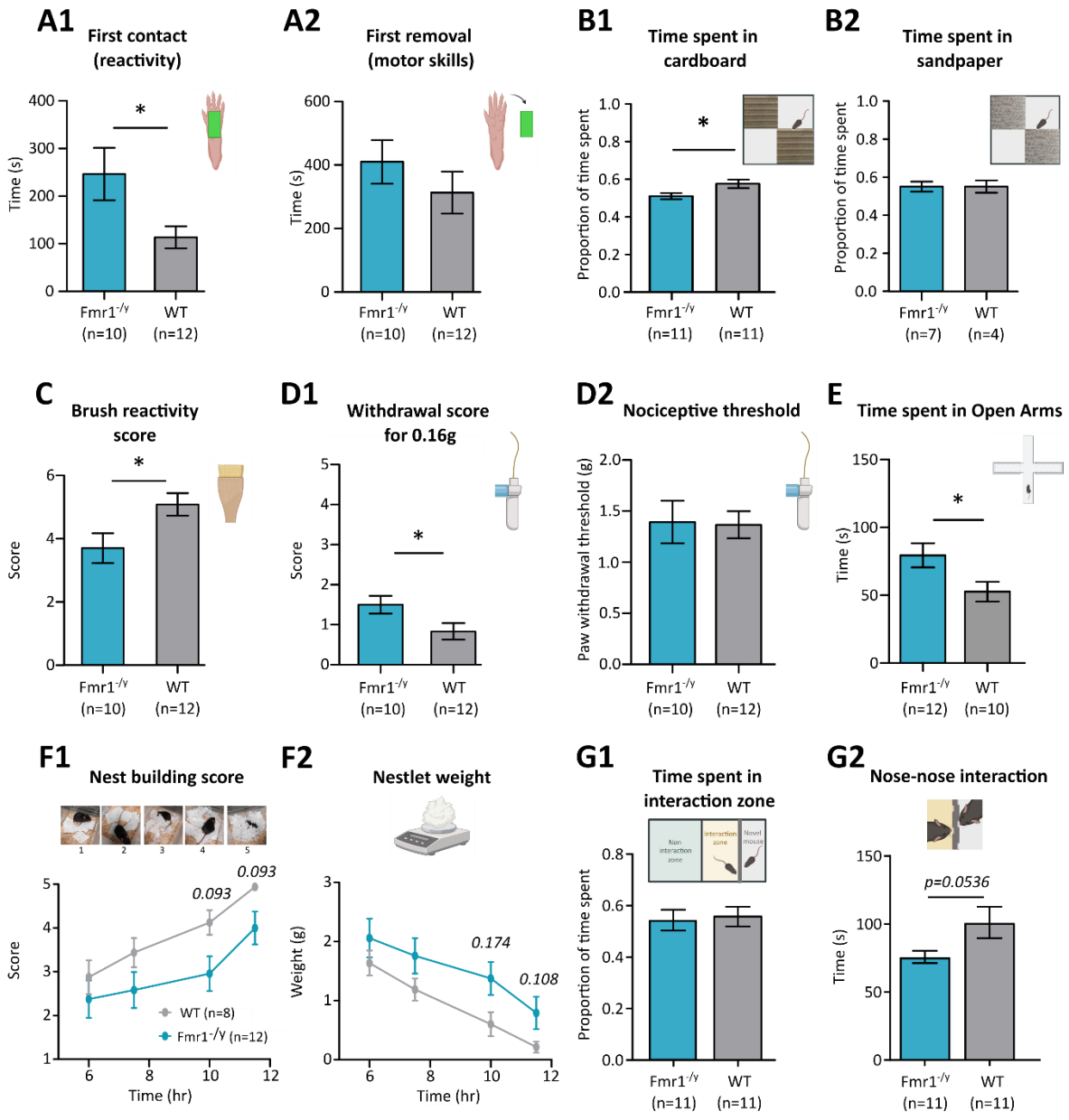


Figure 1: ***Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP*** **mice recapitulate some typical autistic traits.**

(A1) Latency to make the first contact with the tape glued to the hindpaw. **(A2)** Latency to remove the first tape glued to the hindpaw. **(B1)** Proportion of time spent in the cardboard texture placed in an open field. **(B2)** Proportion of time spent in the sandpaper texture placed in an open field. **(C)** Number of hindpaw withdrawals following 7 consecutive brush stimulations. **(D1)** Number of hindpaw withdrawal after 5 consecutive stimulations with a 0.16g Von Frey filament. **(D2)** Paw withdrawal threshold measured through the Von Frey test applying the "up and down method". **(E)** Time spent in the open arms of an elevated plus maze. **(F1)** Nest building score measured during night cycle as a function of time. Representative images above the graph illustrate the five scoring levels. **(F2)** Neslet weight of the remaining unturned materials. **(G1)** Proportion of time spent in the interaction zone of the partition test. **(G2)** Time spent with the nose directly interacting with the unfamiliar mouse. Statistics *p<0.05; Mean ± SEM. p-values were computed using unpaired t-test for panels **A**, **C**, **B1**, **E, G,** Mann-Whitney rank sum test for panels **D**, **B2** and mixed two-way ANOVA followed by Tukey HSD for panels **F**.

Figure 2:

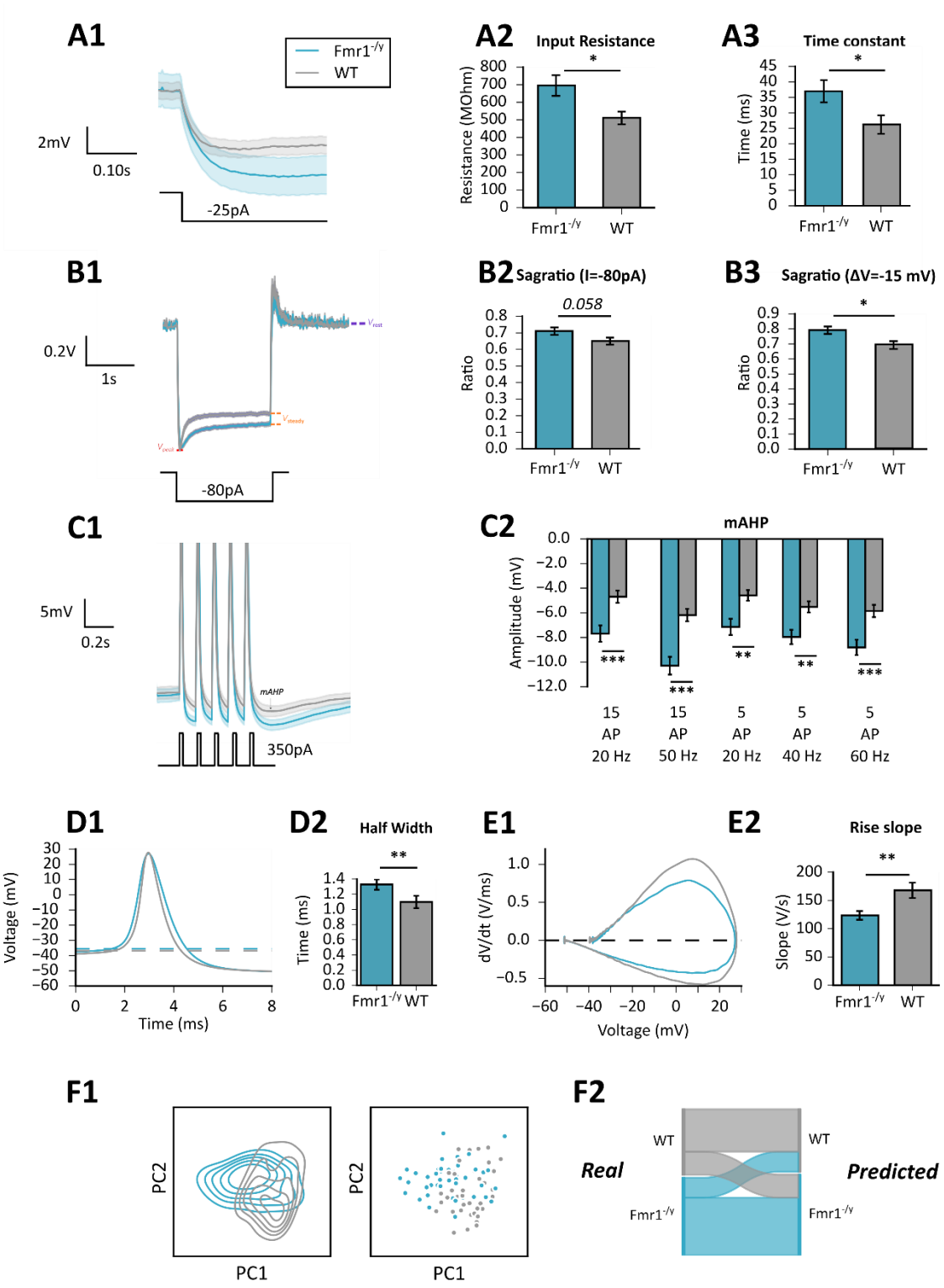
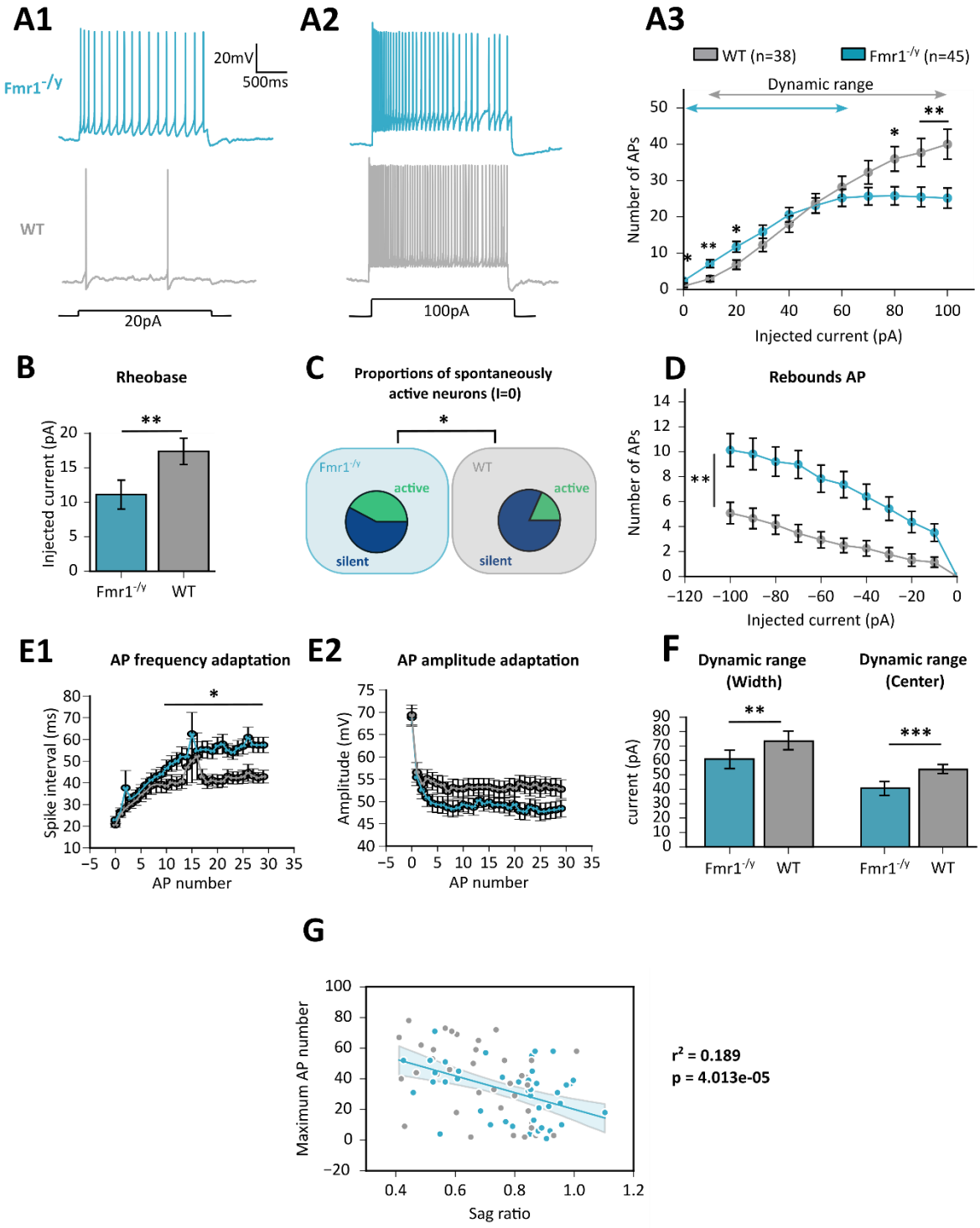

A1
Fmr1-/y
WT
2mV
0.10s
-25pA
A2
Input Resistance
Resistance (MOhm)
Fmr1-/y
WT
A3
Time constant
Time (ms)
B1
0.2V
1s
-80pA
B2
Sagratio (I=-80pA)
0.058
Ratio
B3
Sagratio (ΔV=-15 mV)
C1
5mV
0.2s
mAHP
350pA
C2
mAHP
Amplitude (mV)
15 AP 20 Hz
15 AP 50 Hz
5 AP 20 Hz
5 AP 40 Hz
5 AP 60 Hz
D1
Voltage (mV)
Time (ms)
D2
Half Width
E1
dV/dt (V/ms)
Voltage (mV)
E2
Rise slope
Slope (V/s)
F1
PC2
PC1
F2
Real
Predicted
WT
Fmr1-/y

Figure 2: Spinal GABAergic interneurons in *Fmr1*$^{-/y}$ mice display altered intrinsic electrophysiological properties.

(A1) Averaged voltage responses of *Fmr1*$^{-/y}$ (blue) or WT (grey) SGI in response to a small hyperpolarizing current injection (-25pA; 1s). Shaded areas represent ± SEM. Quantification of input resistance **(A2)**, and membrane time constant (τ) **(A3)**. **(B1)** Averaged voltage traces in response to a strong hyperpolarizing current injection (-80pA; 2s) showing the development of the sag current. *(V_{peak} in red, is the most negative membrane potential reached in the beginning of the current step; V_{steady} in orange, is the voltage at the end of the pulse and V_{rest} in purple is the resting membrane potential).* **(B2)** Sag ratio calculated in response to the -80pA injection. **(B3)** Sag ratio was also calculated at a fixed membrane hyperpolarization of –15 mV (for V_{steady} = -15mV) to allow consistent comparison across cells. **(C1)** Averaged voltage traces in response to 5 repeated current injections (350pA; 2ms). **(C2)** Quantification of mAHP amplitude for different number of induced APs and at different frequency. **(D1)** Averaged voltage traces of evoked AP. **(D2)** Quantification of evoked AP half-width. **(E1)** Averaged phase plane trajectories of evoked AP displaying the derivative of membrane potential (dV/dt) as a function of voltage. The rising phase appears as the upward curve, and the repolarization as the downward curve. This representation highlights differences in the speed and shape of action potential kinetics between genotypes. **(E2)** Quantification of AP rising slope. **(F1)** Principal component analysis (PCA) of electrophysiological features performed with 15 components, capturing the majority of variance across parameters. **(F2)** Sankey plot for logistic regression classifier predicting genotypes of SGI based on their electrophysiological properties displaying an average 70% accuracy.

Statistics *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 Mean ± SEM. p-values were computed using unpaired t-test for panels **B**, **C**, **E** and Mann-Whitney rank sum test for panels **A**, **D**. For all panels Fmr1$^{-/y}$ (blue; cells: n=45; mice: n=18) and WT (grey; cells: n=38; mice: n= 22).

Figure 3:

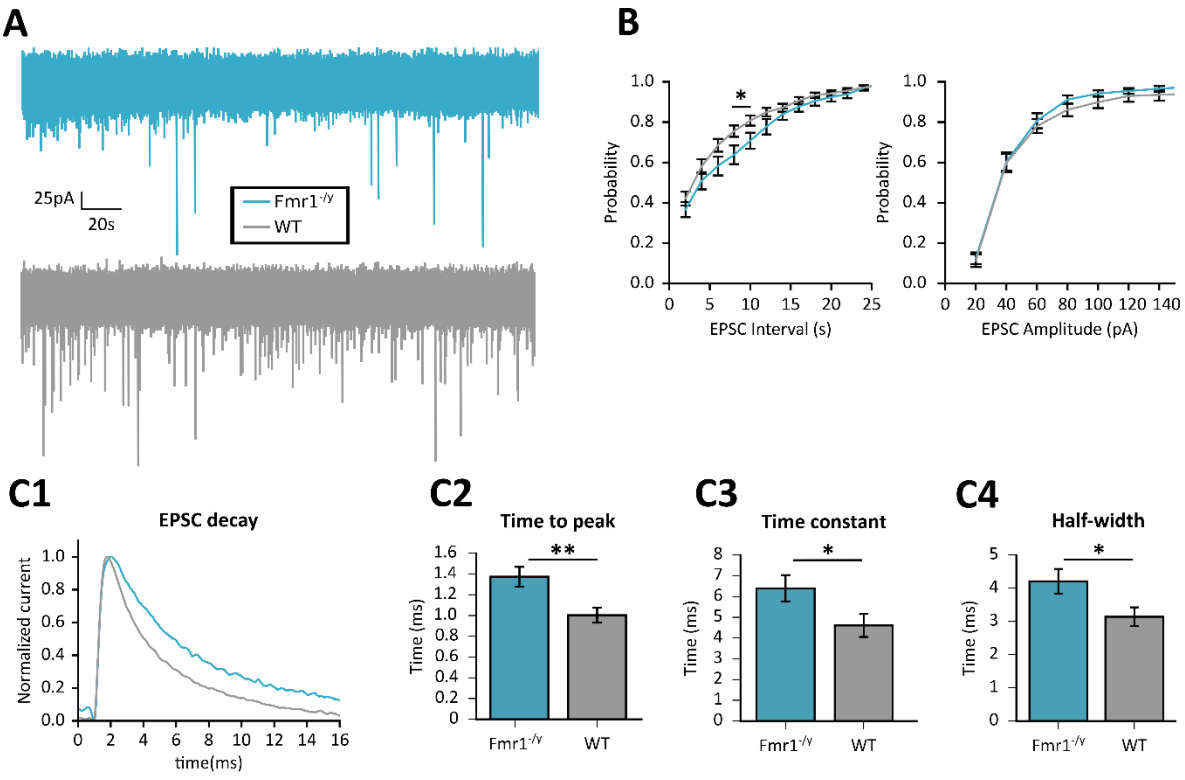

A1
Fmr1-/y
20mV
500ms
WT
20pA
A2
100pA
A3
WT (n=38)
Fmr1-/y (n=45)
Dynamic range
Number of APs
Injected current (pA)
B
Rheobase
Injected current (pA)
Fmr1-/y
WT
C
Proportions of spontaneously active neurons (I=0)
active
silent
D
Rebounds AP
Number of APs
Injected current (pA)
E1
AP frequency adaptation
Spike interval (ms)
AP number
E2
AP amplitude adaptation
Amplitude (mV)
AP number
F
Dynamic range (Width)
Dynamic range (Center)
current (pA)
G
Maximum AP number
Sag ratio
r2 = 0.189
p = 4.013e-05

<u>Figure 3</u>: SGI in *Fmr1*$^{-/y}$ are hyperexcitable for lowest intensities of stimulation but hypoexcitable for highest intensities of stimulation.

Example voltage traces of *Fmr1*$^{-/y}$ (blue) or WT (grey) SGI in response to either a small (20pA) **(A1)** or a high intensity (100pA) **(A2)** of a 500ms depolarizing current step. **(A3)** Mean number of AP plotted as function of the injected intensity current. **(B)** Quantification of rheobase. **(C)** Pie charts showing the percentage of neurons that were spontaneously active (green) or silent (dark blue). **(D)** Mean number of rebound AP elicited in SGI following 2s hyperpolarizing current pulses of increasing intensities (range -100, -10pA). Mean interval **(E1)** or amplitude **(E2)** of AP adaptation plotted as a function of the number of AP elicited. **(F)** Quantification of the dynamic range extend center point of the dynamic range. **(G)** Correlation between the maximum number of AP elicited and the sag ratio. Each dot represents a neuron. The blue line shows the linear regression (r^2 = 0.189; *p*=4.013e-05)

Statistics *p<0.05; **p<0.01; Mean ± SEM. p-values were computed using mixed two-way ANOVA followed by Tukey HSD for panels **A3**, **D**, **E1** and **E2,** unpaired t-test for panels **F**, Mann-Whitney rank sum test for panel **B**, Fisher exact for **C** and Pearson correlation for **G**. For all panels Fmr1$^{-/y}$ (blue; cells: n=45; animals: n=18) and WT (grey; cells: n=38; animals: n= 22).

Figure 4:


A
25pA
20s
Fmr1-/y
WT
B
Probability
EPSC Interval (s)
EPSC Amplitude (pA)
C1
EPSC decay
Normalized current
time(ms)
C2
Time to peak
Time (ms)
**
C3
Time constant
Time (ms)
*
C4
Half-width
Time (ms)
*
Fmr1-/y
WT

<u>Figure 4:</u> Spontaneous excitatory inputs to SGI are reduced in *Fmr1*$^{-/y}$ mice, with slower kinetics.

(A) Representative traces of spontaneous EPSC (Vhold=-60mV) in WT (grey) and Fmr1$^{-/y}$ (blue) animals. **(B)** Cumulative curves of EPSC intervals (left) and EPSC amplitude (right). **(C1)** Averaged normalized EPSC voltage traces. Quantification of **(C2)** time to peak, **(C3)** time constant, **(C4)** half-width of individuals EPSC.

Statistics *p<0.05; **p<0.01; Mean ± SEM. P-values were computed using unpaired t-test for **C** and paired t-test for panel **B**. For all panels Fmr1$^{-/y}$ (blue; cells: n=45; animals: n=18) and WT (grey; cells: n=38; animals: n= 22).

Figure 5:

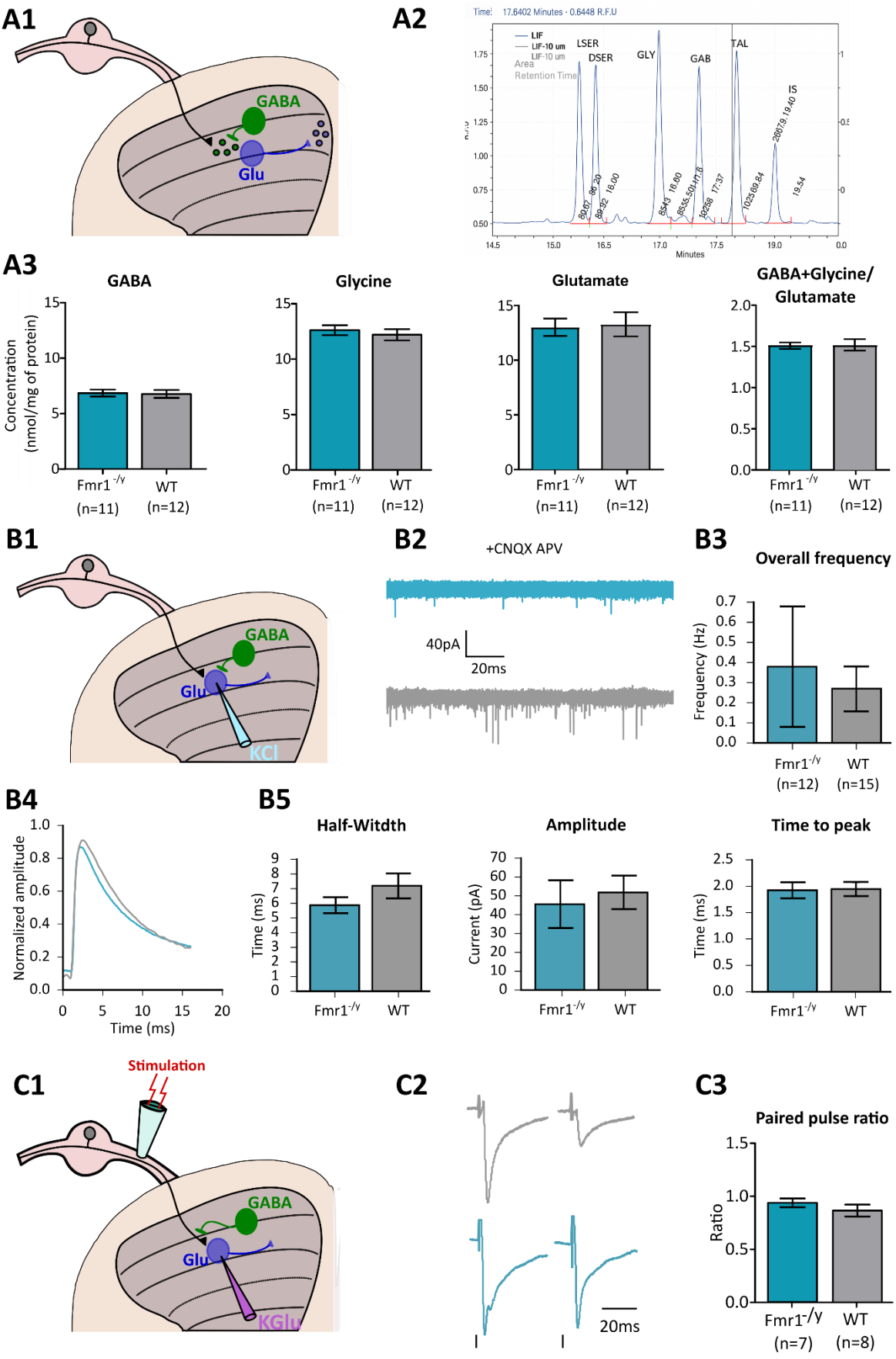

A1
GABA
Glu
A2
Time: 17.6402 Minutes · 0.6448 R.F.U
LIF
LIF-10 um
LIF-10 um
Area
Retention Time
LSER
DSER
GLY
GAB
TAL
IS
Minutes
A3
GABA
Glycine
Glutamate
GABA+Glycine/ Glutamate
Concentration (nmol/mg of protein)
Fmr1 -/y (n=11)
WT (n=12)
B1
GABA
Glu
KCl
B2
+CNQX APV
40pA
20ms
B3
Overall frequency
Frequency (Hz)
Fmr1 -/y (n=12)
WT (n=15)
B4
Normalized amplitude
Time (ms)
B5
Half-Width
Time (ms)
Amplitude
Current (pA)
Time to peak
Time (ms)
Fmr1 -/y
WT
C1
Stimulation
GABA
Glu
KGlu
C2
20ms
C3
Paired pulse ratio
Ratio
Fmr1 -/y (n=7)
WT (n=8)

Figure 5: SGI hyperexcitability close to the resting membrane potential has no effect on inhibitory synaptic transmission *ex vivo*.

(A1) Schematic representation of the spinal dorsal horn illustrating the simplified anatomical context in which capillary electrophoresis was performed to quantify basal neurotransmitter concentrations. **(A2)** Representative chromatogram obtained from capillary electrophoresis showing the detection peaks for various neurotransmitters, including glutamate (GLU), GABA (GAB), glycine (GLY), L-Serine (LSER), D-Serine (DSER), Taurine (TAU). "IS" corresponds to Internal Standard which is a standardisation reference. This raw trace illustrates the separation and quantification of neurotransmitters in dorsal spinal cord tissue samples. **(A3)** Concentration (nmol/mg protein) of each neurotransmitter of interest GABA, Glycine, Glutamate and (GABA+Glycine)/Glutamate. n(WT) = 12 mice; n($Fmr1^{-/y}$) = 11 mice **(B1)** Schematic representation of the experimental strategy to record spontaneous IPSC, by recording excitatory (GFP^-) neurons with electrodes filled with KCl internal solutions in order to isolate and amplify inhibitory inputs. **(B2)** Representative traces of spontaneous IPSC (Vhold=-60mV) in $Fmr1^{-/y}$ (blue, n(cells)=12; n(mice)=9) and WT (grey, n(cells)=15; n(mice)=10) animals, obtained with CNQX and APV drugs in the ACSF to block the glutamatergic currents. **(B3)** Quantification of the overall frequency of IPSCs. **(B4)** Averaged normalized IPSC voltage traces. Quantification of **(B5)** half-width (left), amplitude (middle) and time to peak (right) of individuals IPSC. **(C1)** Schematic representation of the experimental strategy to record evoked EPSC from excitatory neurons with the electrode filled with a KGluconate internal solution, by paired stimulation of the dorsal root of the spinal cord with a suction pipette. **(C2)** Representative traces of evoked responses of spinal excitatory neurons to paired pulse stimulation of dorsal root. **(C3)** Paired pulse ratio (amplitude second response/amplitude first response) quantification. ($Fmr1^{-/y}$: n(cells)= 7; n(mice)= 4 | WT: n(cells)=8, n(mice)= 4)

Mean ± SEM. P-values were computed using unpaired t-test for panels **A**, **C**, Mann-Whitney rank sum test for panels **B**.

Figure 6:

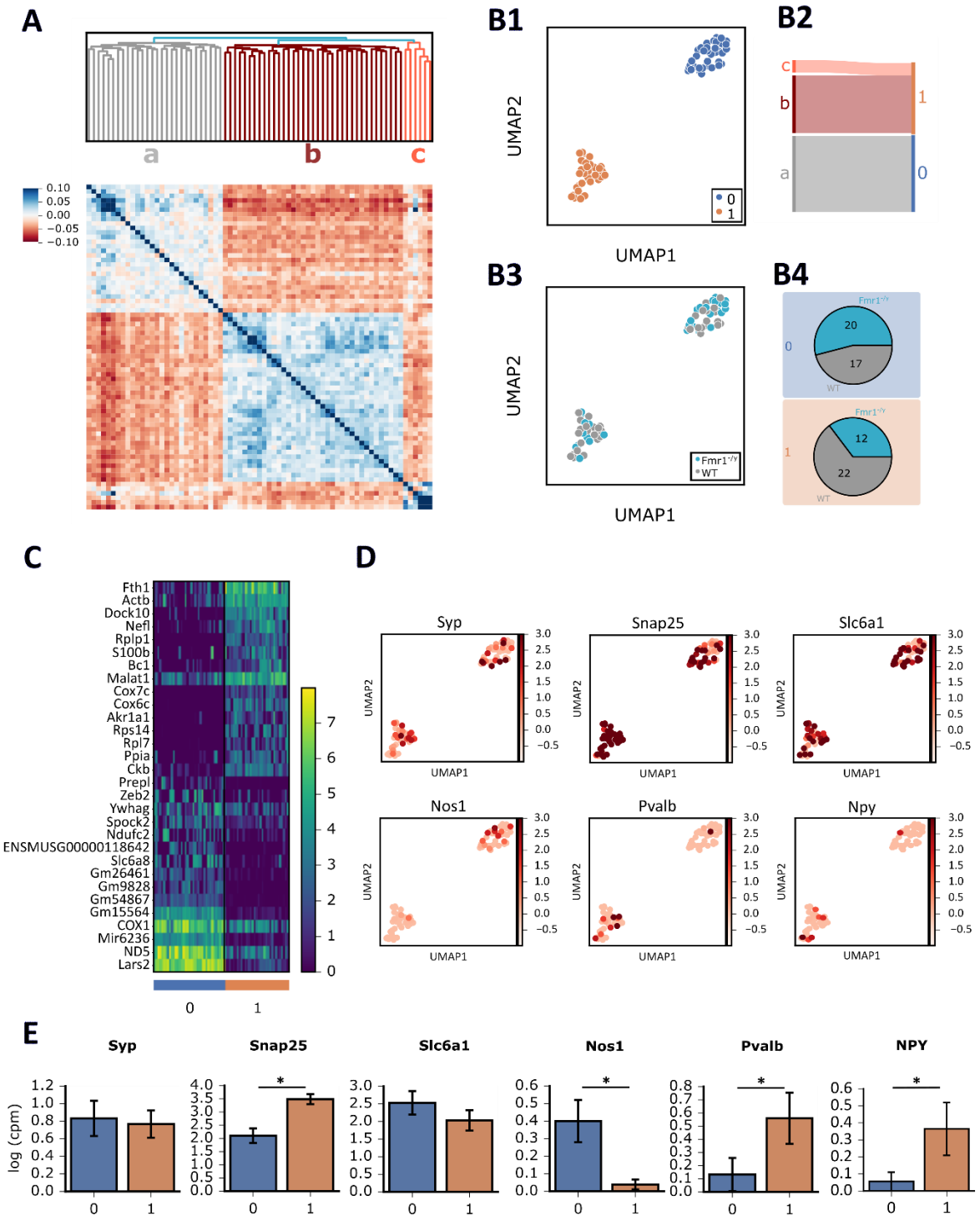

A
a
b
c
0.10
0.05
0.00
−0.05
−0.10
B1
UMAP2
UMAP1
0
1
B2
c
b
a
1
0
B3
UMAP2
UMAP1
Fmr1−/y
WT
B4
Fmr1−/y
20
17
WT
0
Fmr1−/y
12
22
WT
1
C
Fth1
Actb
Dock10
Nefl
Rplp1
S100b
Bc1
Malat1
Cox7c
Cox6c
Akr1a1
Rps14
Rpl7
Ppia
Ckb
Prepl
Zeb2
Ywhag
Spock2
Ndufc2
ENSMUSG00000118642
Slc6a8
Gm26461
Gm9828
Gm54867
Gm15564
COX1
Mir6236
ND5
Lars2
7
6
5
4
3
2
1
0
0
1
D
Syp
Snap25
Slc6a1
Nos1
Pvalb
Npy
UMAP2
UMAP1
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
−0.5
E
Syp
Snap25
Slc6a1
Nos1
Pvalb
NPY
log (cpm)
*
0
1

Figure 6: SGI recorded can be classified into 2 different subpopulations based on their transcriptomic profiles.

(A) Agglomerative clustering of transcriptomic profiles and correlation matrix of 83 SGI recorded according to gene expression correlation distance. Positive correlations are color-coded in blue and negative ones in red. **(B1)** UMAP representation of the same 83 SGI recorded, showing two major transcriptomic groups (0 and 1). Each dot represents a neuron. **(B2)** Sankey plot showing the correspondance between the agglomerative clustering (left) and the Leiden clustering (right) showing a fusion of cluster b and c into cluster 1. **(B3)** UMAP plot coloured by genotype (*Fmr1*$^{-/y}$ and WT), showing their distribution across the two clusters. **(B4)** Pie charts showing the percentage of *Fmr1*$^{-/y}$ and WT cells within each cluster revealing no repartition differences. **(C)** Heatmap showing the expression of the fifteen top discriminating genes in each cluster, expression level is indicated by blue-yellow color scale. **(D)** UMAP representation of the expression of different genes of interest in each cluster. Colors indicate the standardized (Z score) expression level of each gene of interest: *Synaptophysine [Syp]* (high left), *Synaptosomal-Associated Protein 25kDa [Snap25]* (high middle), *SoLute Carrier family 6 member 1 [Slc6a1]* (high right), *Nitric oxide synthase 1 [Nos1]* (down left), *Parvalbumin [Pvalb]* (down middle) and *Neuropeptide Y [NPY]* (down right). Darker red color indicates high level of expression and light orange indicate low expression. Each dot represents a neuron. **(E)** Quantification of each gene mentioned before in each cluster.

Statistics *p<0.05; Mean ± SEM. P-values were computed using Fisher exact for panel **B4**, Mann-Whitney rank sum followed by Benjamini-Hochberg multiple tests correction for panel **E**.

Figure 7:

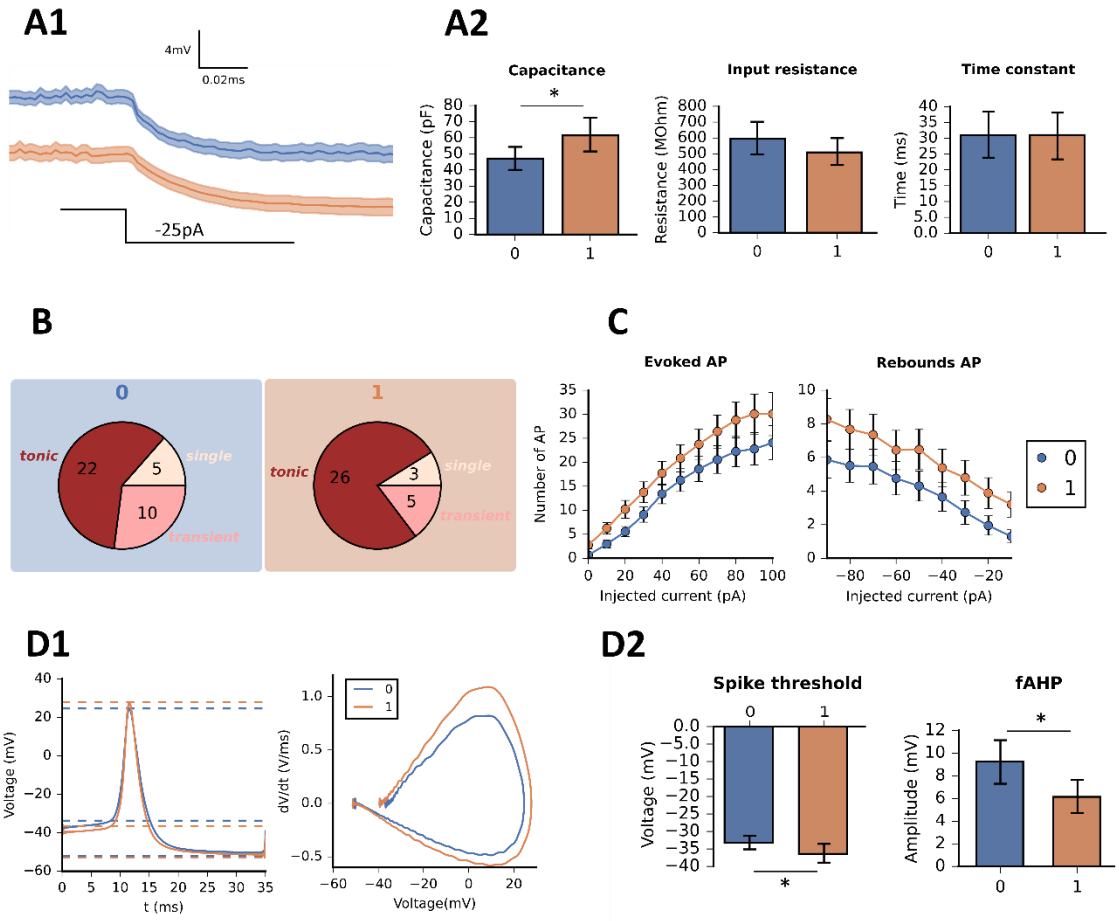

A1
4mV
0.02ms
-25pA
A2
Capacitance
Input resistance
Time constant
Capacitance (pF)
Resistance (MOhm)
Time (ms)
B
0
1
tonic
single
transient
22
5
10
26
3
5
C
Evoked AP
Rebounds AP
Number of AP
Injected current (pA)
Injected current (pA)
0
1
D1
Voltage (mV)
t (ms)
dV/dt (V/ms)
Voltage(mV)
D2
Spike threshold
fAHP
Voltage (mV)
Amplitude (mV)

Figure 7: Transcriptomic clusters correspond to distinct functional neuronal populations displaying electrophysiological differences independently of technical quality bias.
(A1) Averaged voltage responses of cluster 0 (blue) or 1 (orange) in response to a small hyperpolarizing current injection (-25pA; 1s). Shaded areas represent ± SEM. **(A2)** Quantification of capacitance (left), input resistance (middle) and time constant (right). **(B)** Pie chart showing repartition of neurons firing pattern (tonic, transient, single) for each cluster showing no sampling bias. **(C)** Mean number of evoked AP (left) or rebounds AP (right) plotted as function of the injected current. **(D1)** Averaged voltage traces of evoked AP, dotted lines correspond to threshold, peak and fast AHP values (left). Averaged phase plane trajectories of evoked AP displaying the derivative of membrane potential (dV/dt) as a function of voltage (right). The rising phase appears as the upward curve, and the repolarization as the downward curve. **(D2)** Quantification of spike threshold (left) and fast AHP (right). Cluster 0: n(cells)=37; n(mice)=14 | cluster 1: n(cells)=34; n(mice)=20.
Statistics *p<0.05; Mean ± SEM. P-values were computed using Fisher exact for panel **B**, Mann-Whitney rank sum test for panel **A, D,** mixed two-way ANOVA followed by Tukey HSD for panel **C**.

Figure 8:

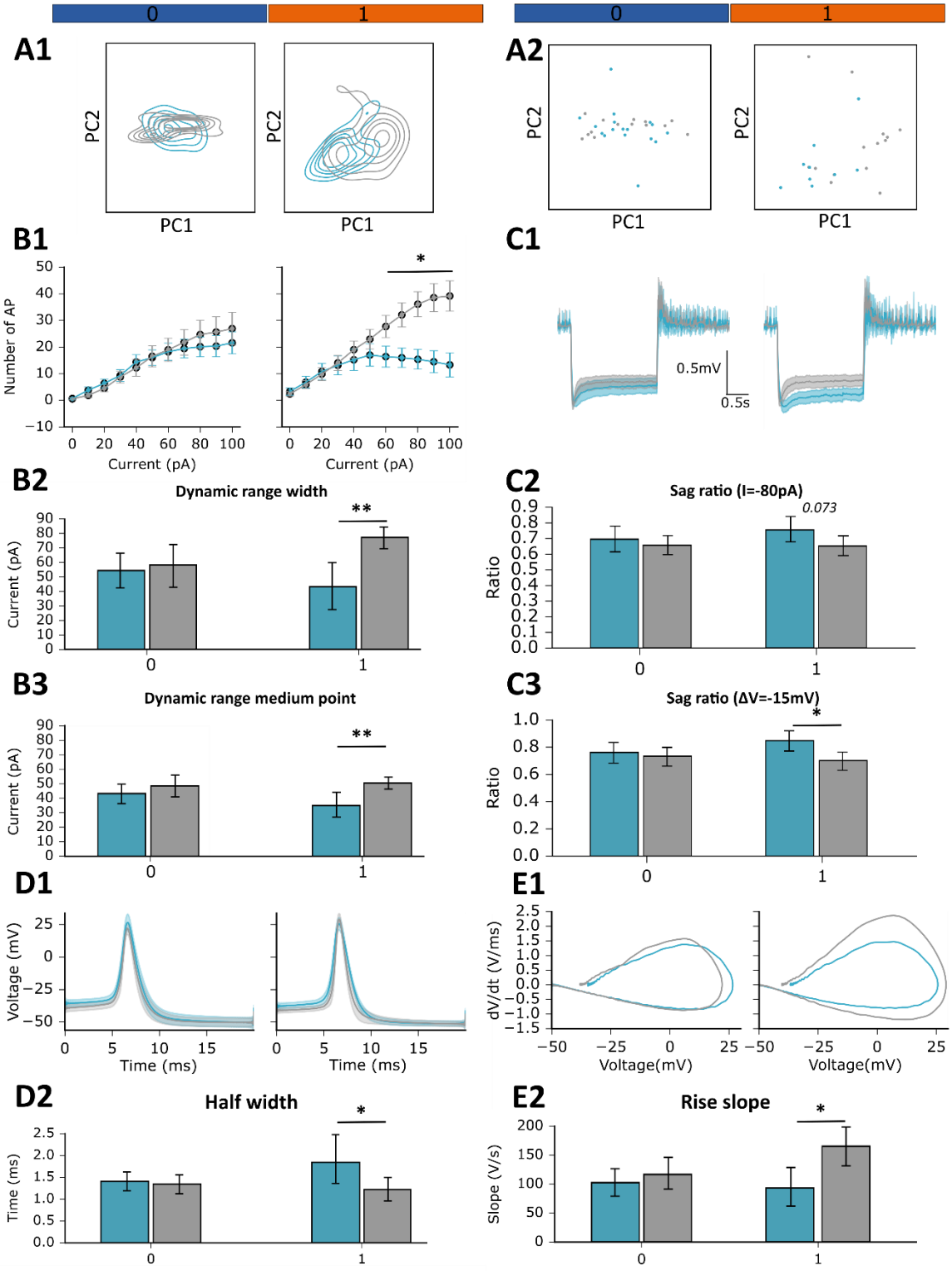

0
1
A1
PC2
PC1
A2
B1
Number of AP
Current (pA)
*
C1
0.5mV
0.5s
B2
Dynamic range width
**
Current (pA)
C2
Sag ratio (I=-80pA)
0.073
Ratio
B3
Dynamic range medium point
C3
Sag ratio (ΔV=-15mV)
D1
Voltage (mV)
Time (ms)
E1
dV/dt (V/ms)
Voltage(mV)
D2
Half width
Time (ms)
E2
Rise slope
Slope (V/s)

Figure 8: *Pvalb-Npy* but not *Nos1* positive population, undergo dramatic electrophysiological plasticity in *Fmr1*$^{-/y}$ SGI.

(A1) Density map computed from principal component analysis (PCA) of electrophysiological features performed with 15 components, capturing the majority of variance across parameters. Only the first two components are here shown, displaying no clear separation in cluster 0 but a clear one in cluster 1 between *Fmr1*$^{-/y}$ and WT. **(A2)** Same PCA representation but here each neuron is represented by a dot. **(B1)** Mean number of AP plotted as function of the injected current for each cluster (cluster 0: *Fmr1*$^{-/y}$, 20 cells, 7mice; WT, 17 cells, 7 mice | cluster 1: *Fmr1*$^{-/y}$, 12 cells, 8mice; WT, n= 22 cells, 12mice). **(B2)** Quantification of dynamic range width of WT and *Fmr1*$^{-/y}$ SGI in each cluster. **(B3)** Dynamic range center point in each cluster. **(C1)** Averaged voltage traces in response to a strong hyperpolarizing current injection (-80pA; 500ms) showing progressive development of sag current in each cluster. **(C2)** Sag ratio calculated in response to the -80pA injection in each cluster. **(C3)** Sag ratio was also calculated at a fixed membrane hyperpolarization of –15 mV to allow consistent comparison across cells in each cluster. **(D1)** Averaged voltage traces of evoked AP in each cluster. **(D2)** Quantification of AP half-width in each cluster. **(E1)** Averaged phase plane trajectories of evoked AP displaying the derivative of membrane potential (dV/dt) as a function of voltage in each cluster. **(E2)** Quantification of the rising slope in each cluster.

Statistics *p<0.05; **p<0.01; Mean ± SEM. p-values were computed using mixed three-way ANOVA followed by Tukey HSD for panel **B1** and two-way ANOVA followed by Tukey HSD for panels **B2, B3, C2, C3, D2, E2**.

Supplemental Figures and Legends:

Figure S1:

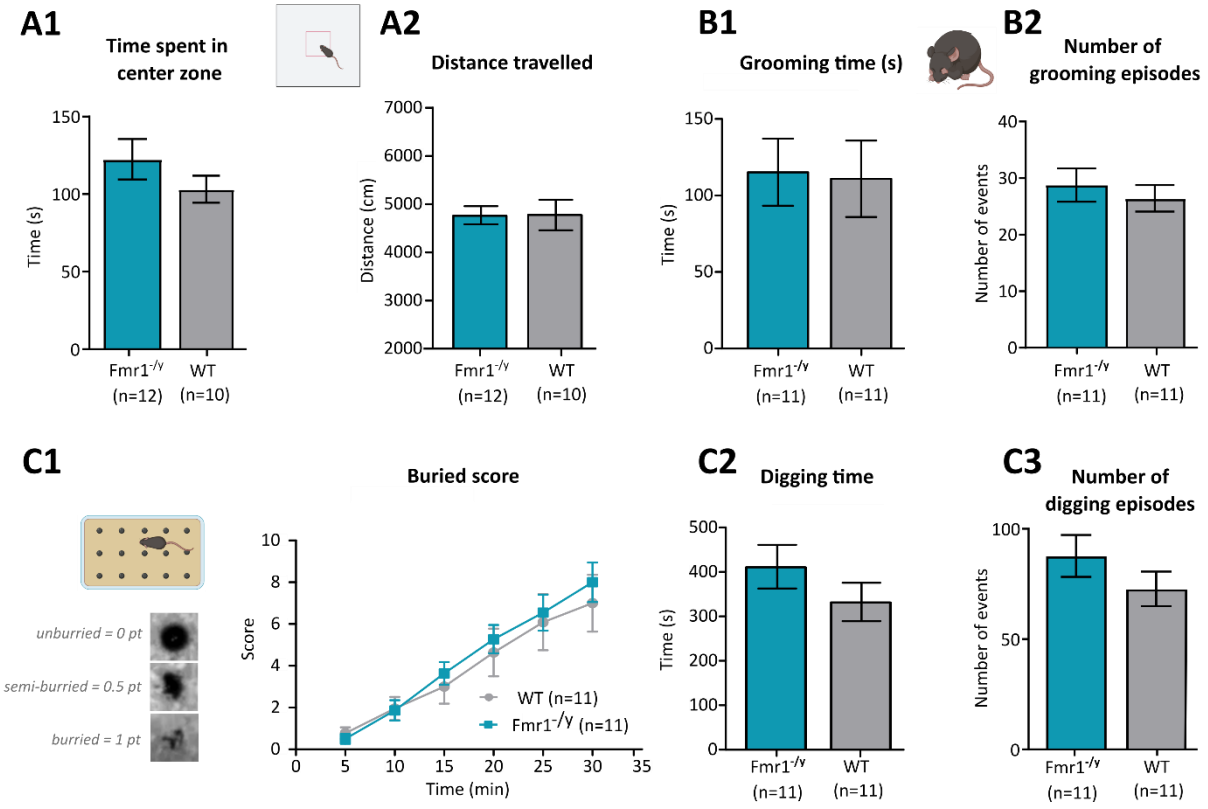
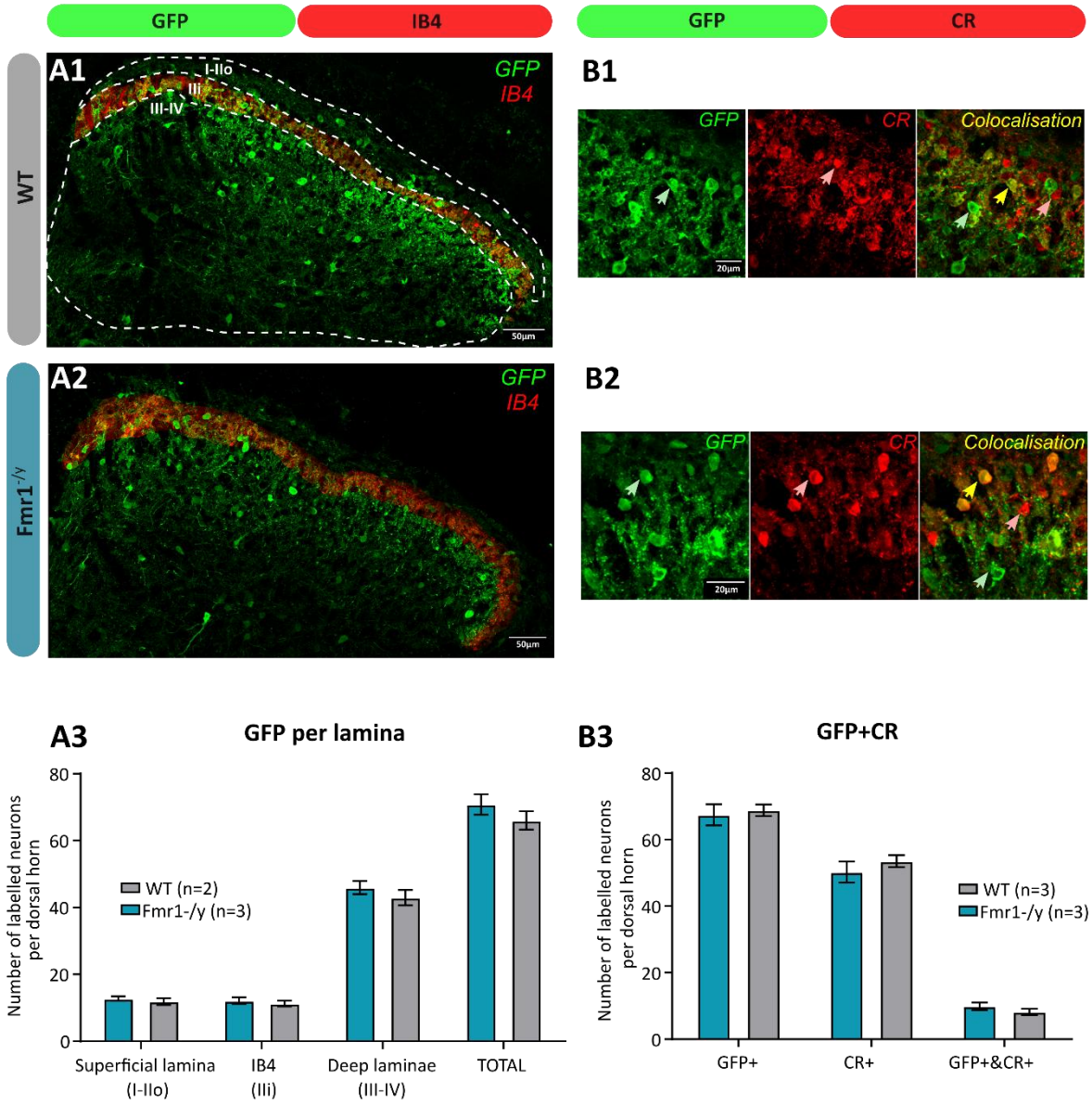


Figure S1: *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* mice do not show locomotor hyperactivity nor increased repetitive behaviors.

(A1) Time spent in the center zone of the open field. **(A2)** Distance travelled in the open field. **(B1)** Time spent grooming in an open field. **(B2)** Number of grooming episodes. **(C1)** Buried marble score as a function of time during the marble burying test. **(C2)** Time spent digging during the session. **(C3)** Number of digging episodes.

Mean ± SEM. p-values were computed using unpaired t-test for panels **A1, A2, B1, B2, C2, C3** and mixed two-way ANOVA for panel **C1**.

Figure S2:


GFP
IB4
GFP
CR
WT
A1
I-IIo
III
III-IV
GFP
IB4
50µm
B1
GFP
CR
Colocalisation
20µm
Fmr1-/y
A2
GFP
IB4
50µm
B2
GFP
CR
Colocalisation
20µm
A3
GFP per lamina
Number of labelled neurons per dorsal horn
80
60
40
20
0
WT (n=2)
Fmr1-/y (n=3)
Superficial lamina (I-IIo)
IB4 (IIi)
Deep laminae (III-IV)
TOTAL
B3
GFP+CR
Number of labelled neurons per dorsal horn
80
60
40
20
0
WT (n=3)
Fmr1-/y (n=3)
GFP+
CR+
GFP+&CR+

<u>Figure S2:</u> The GABAergic cytoarchitectural organisation does not seem to be different between the two genotypes.

(A) 40× confocal mosaic image of transversal section of spinal cord dorsal horn of a WT **(A1)** and Fmr1$^{-/y}$ **(A2)** animal, GFP is labelled in green, IB4 in red. **(A3)** Quantification of GFP^{+} neurons per laminae: superficial (I-IIo), IB4+ (IIi) and deep (III-IV), between the two genotypes (*Fmr1*$^{-/y}$: n(mice) = 3; n(dorsal horns) = 24 | WT: n(mice) = 2; n(dorsal horns) = 16). **(B)** Zoomed-in 40× confocal mosaic image of a transversal sections of spinal cord dorsal horn of a WT **(B1)** and *Fmr1*$^{-/y}$ **(B2)** animal. Left: GFP is labelled in green, green arrow is pointing to a GFP neuron, middle: Calretinin (CR) is labelled in red with red arrow pointing to a CR^{+} neuron, right: colocalised neurons are labelled in yellow with yellow arrow pointing at GFP^{+}CR^{+} neurons. **(B3)** Quantification of GFP^{+}, CR^{+} and double labelled GFP^{+}CR^{+} neurons between the two genotypes (*Fmr1*$^{-/y}$: n(mice) = 3; n(dorsal horns) = 24 | WT: n(mice) = 3; n(dorsal horns) = 24).

Mean ± SEM. p-values were computed using unpaired t-test for panels (**A3**: IB4 (IIi), Deep (III-IV) and total), (**B3**: GFP^{+}, GFP^{+}CR^{+}), Mann Whitney rank sum test for panels (**A3**: Superficial (I-IIo)) and (**B3**: CR+)].

Figure S3:

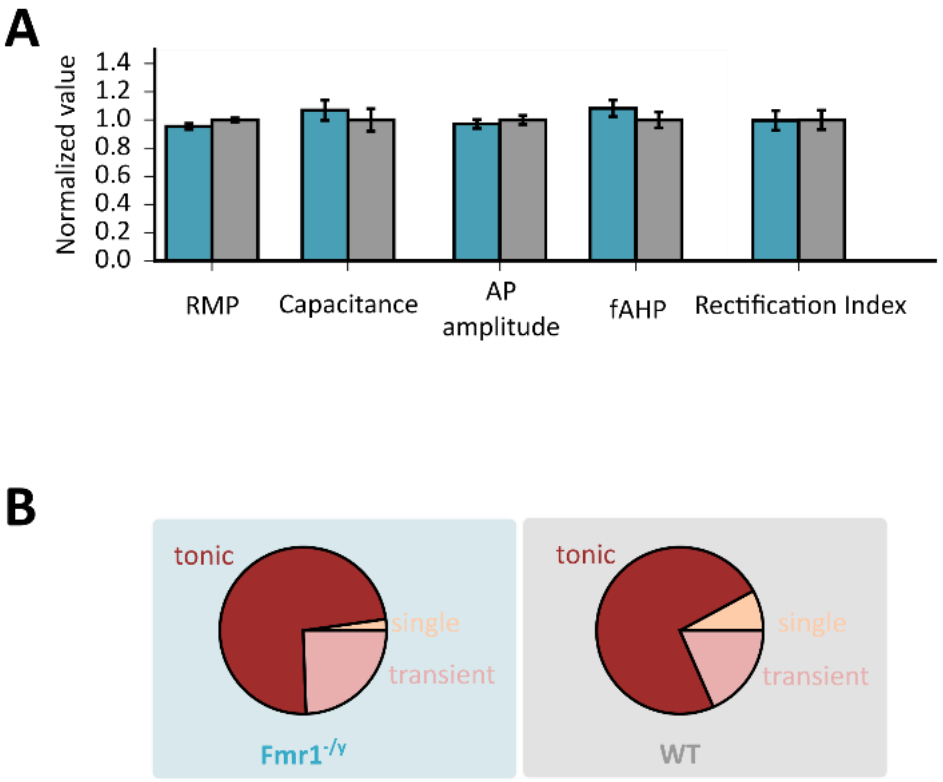
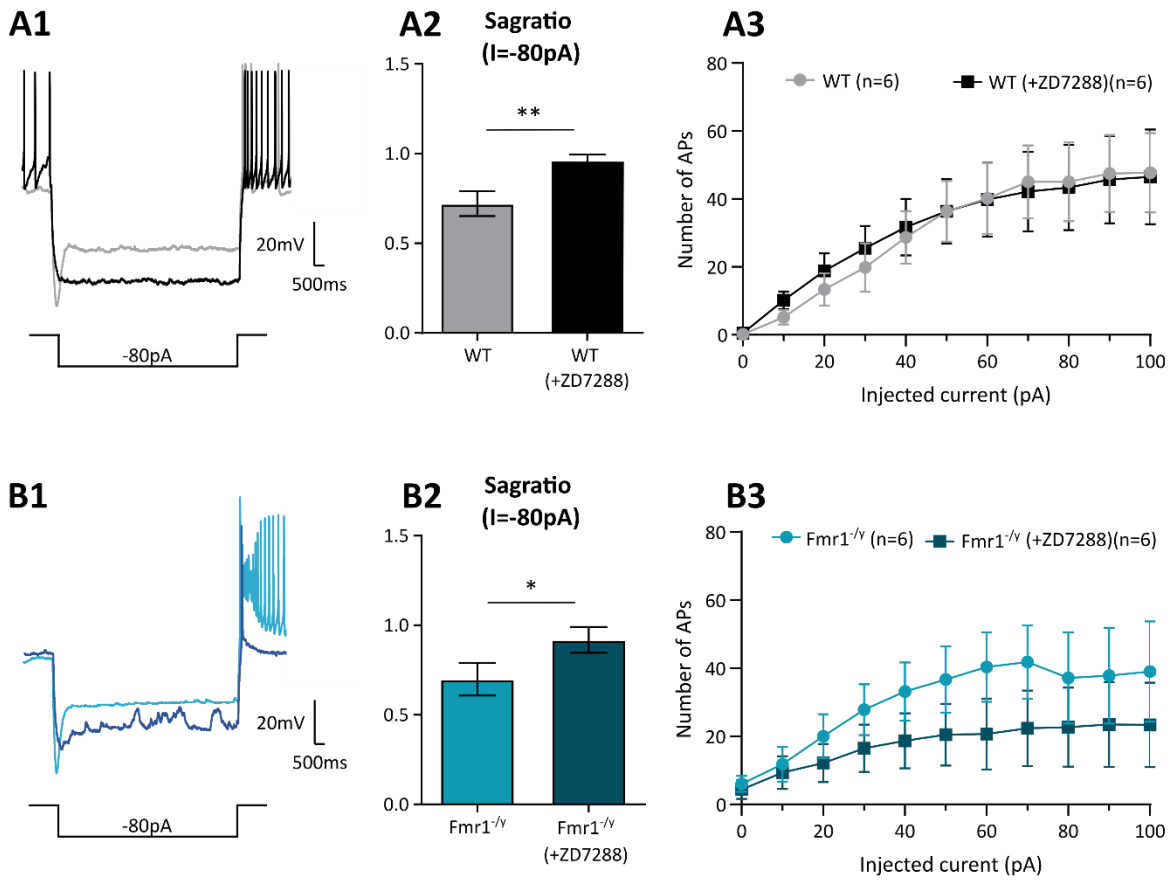

A
Normalized value
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
RMP
Capacitance
AP amplitude
fAHP
Rectification Index
B
tonic
single
transient
Fmr1-/y
tonic
single
transient
WT

Figure S3: Similarities on some electrophysiological parameters between WT and *Fmr1*$^{-/y}$ SGI.

(A) Normalized values of SGI properties in *Fmr1*$^{-/y}$, expressed as percent of WT average. **(B)** Pie chart showing percentage of neurons firing pattern (tonic, transient, single) for each genotype.

Mean ± SEM. p-values were computed using unpaired t-test (**A**: RMP, AP amplitude, fAHP), Mann-whitney rank sum test (**A**: Capacitance and Rectification index) or Fisher exact **B**.

Figure S4:


A1
20mV
500ms
-80pA
A2
Sagratio
(I=-80pA)
**
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
WT
(+ZD7288)
A3
WT (n=6)
WT (+ZD7288)(n=6)
Number of APs
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Injected current (pA)
B1
20mV
500ms
-80pA
B2
Sagratio
(I=-80pA)
*
1.5
1.0
0.5
0.0
Fmr1-/y
Fmr1-/y
(+ZD7288)
B3
Fmr1-/y (n=6)
Fmr1-/y (+ZD7288)(n=6)
Number of APs
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Injected curent (pA)

<u>Figure S4</u>: Reduced HCN function alone is insufficient to explain the altered excitability of *Fmr1*$^{-/y}$ SGI neurons.

(A1) Representative voltage traces in response to a strong hyperpolarizing current injection (-80pA; 2s) showing the development of the sag current in WT SGI (in grey), and the absence of sag current when ZD7288 was applied in the bath (black). **(B1)** Same with *Fmr1*$^{-/y}$ SGI. Sag ratio calculated in response to the 80pA injection **(A2)** for WT SGI and **(B2)** *Fmr1*$^{-/y}$ SGI. Mean number of AP plotted as function of the injected intensity current in **(A3)** WT and **(B3)** *Fmr1*$^{-/y}$.

Mean ± SEM. p-values were computed using paired t-test for panels **A2, B2**, and mixed three-way ANOVA for panels **A3, B3**.

Figure S5:

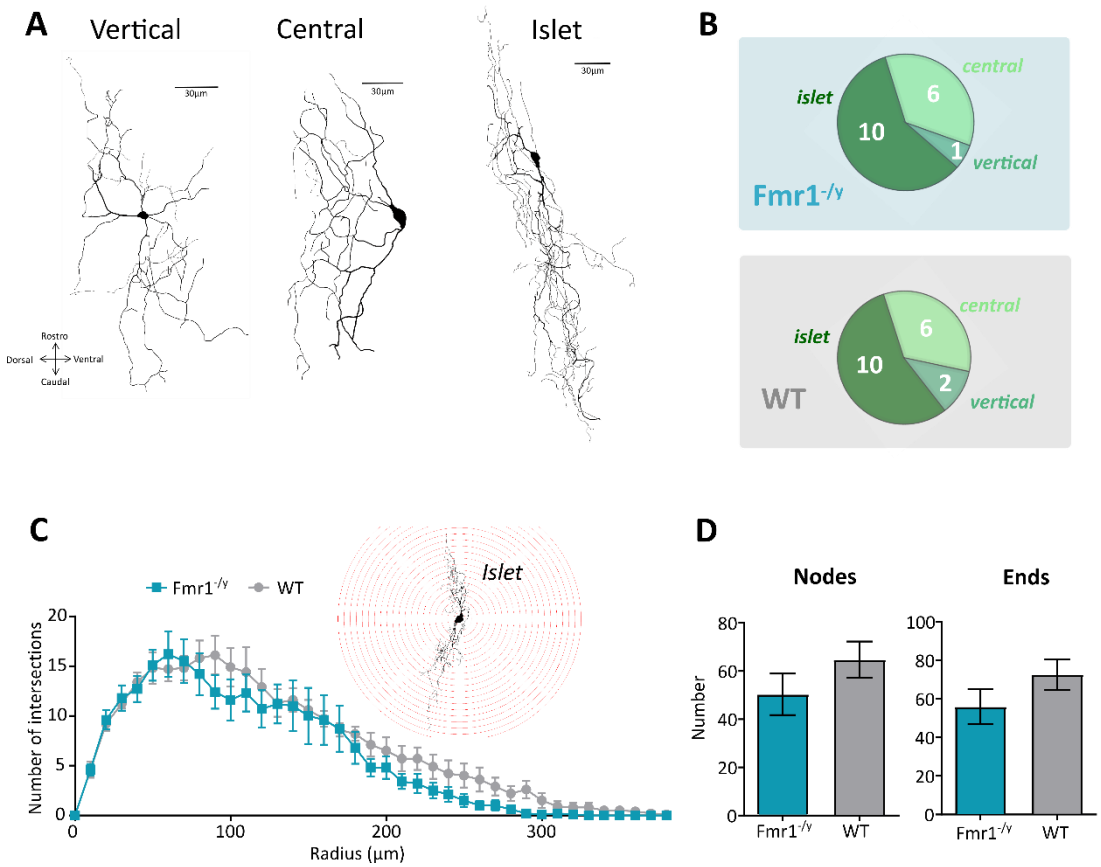
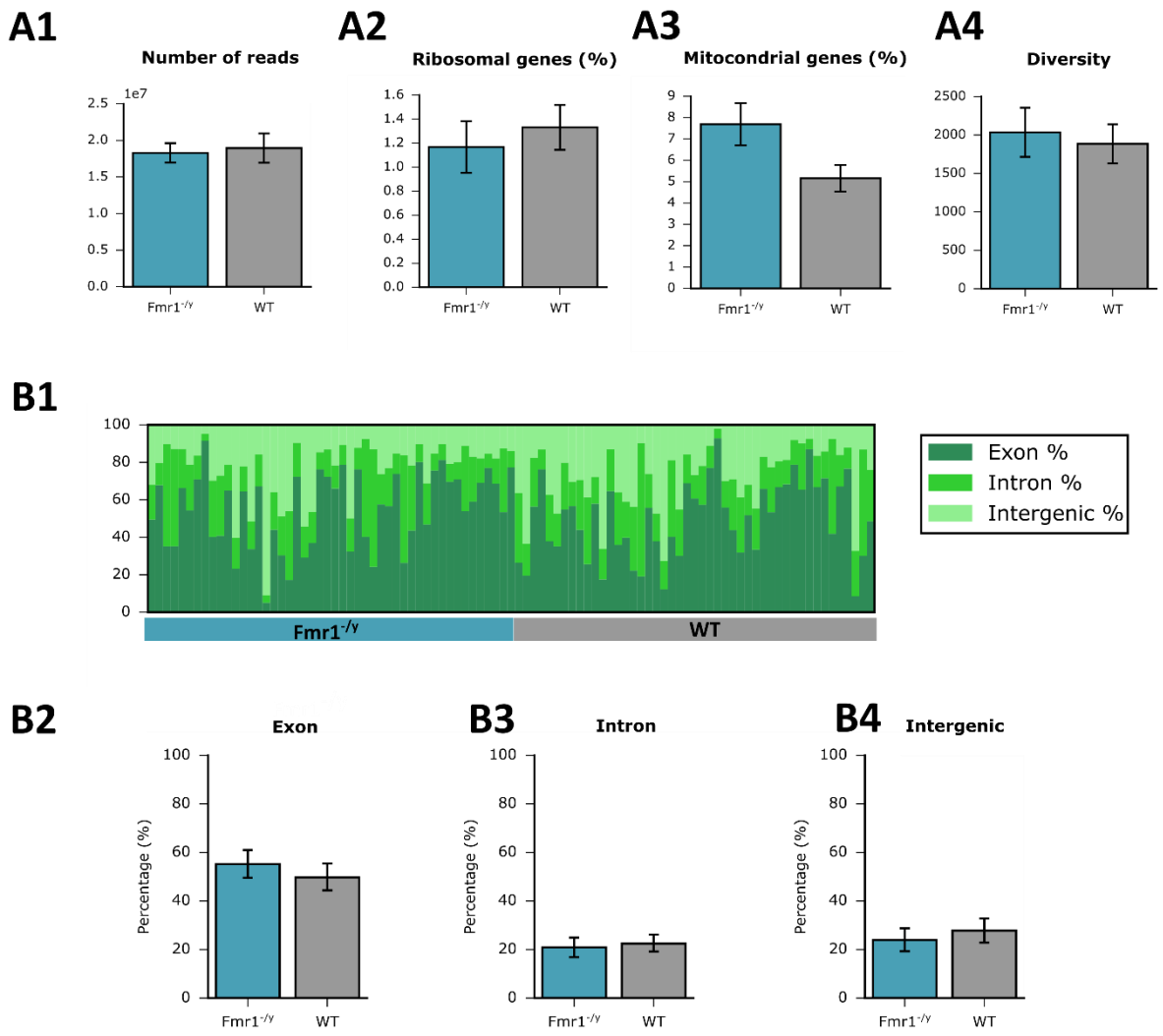

A
Vertical
Central
Islet
30µm
Rostro
Dorsal
Ventral
Caudal
B
islet
central
vertical
6
10
1
Fmr1-/y
islet
central
vertical
6
10
2
WT
C
Fmr1-/y
WT
Islet
Number of intersections
Radius (µm)
0
100
200
300
0
5
10
15
20
D
Nodes
Ends
Number
Fmr1-/y
WT
0
20
40
60
80
100

Figure S5: SGI in *Fmr1*$^{-/y}$ mice do not exhibit any dendritic remodelling.
(A) Morphological reconstruction of a representative biocytin-filled SGI for each subclass is shown: vertical (left), central (middle), islet (right). **(B)** Pie chart showing percentage of neurons morphology (vertical, central, islet) for each genotype showing no sampling bias. **(C)** Sholl analysis of islet neurons. **(D)** Quantification of total number of nodes (left) and ends (right) of islet neurons.
Mean ± SEM. P-values were computed using fisher exact for panel **B**, unpaired t-test for panel **D**, and mixed two-way ANOVA for panel **C**.

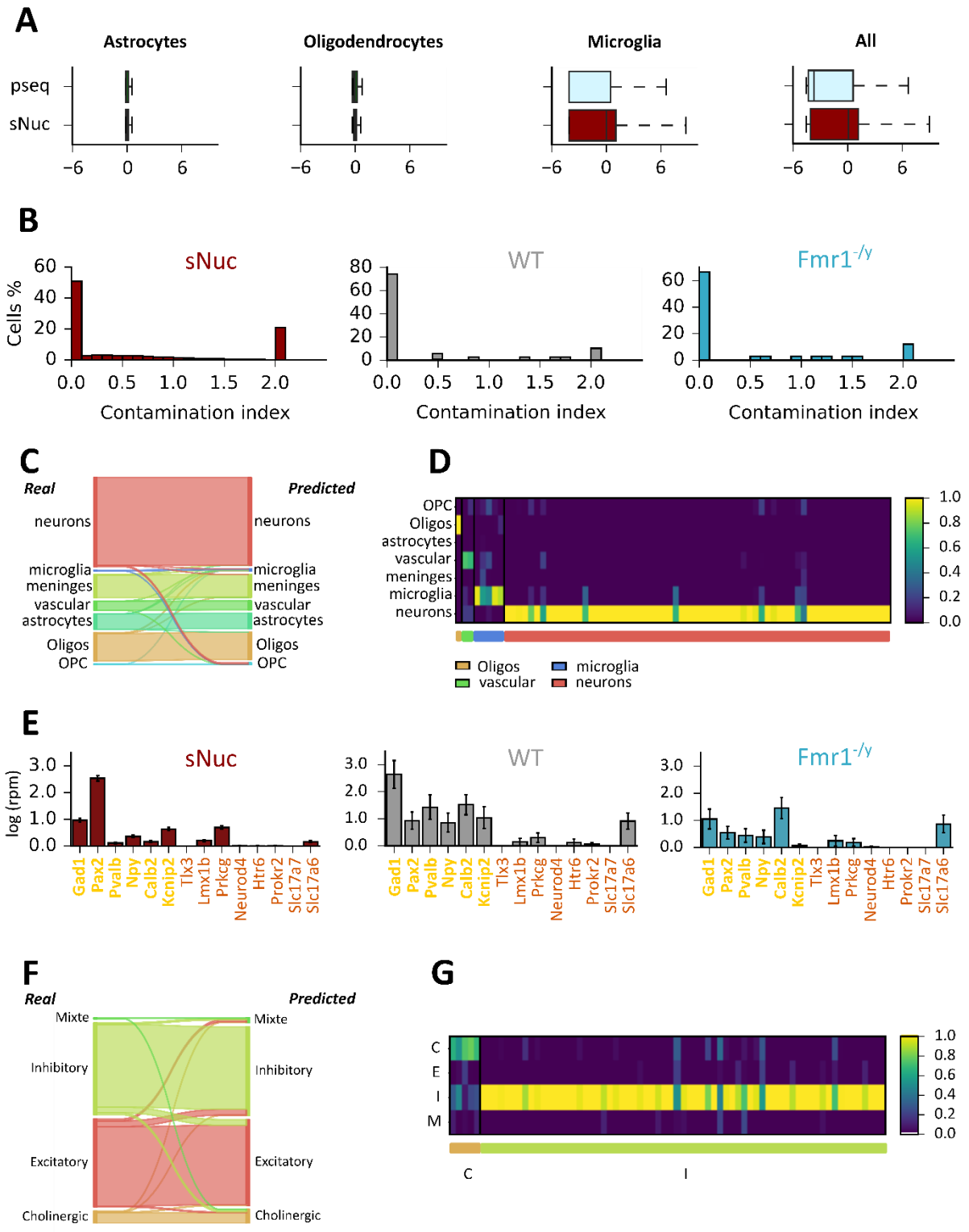
Figure S6:


A1
Number of reads
1e7
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Fmr1-/y
WT
A2
Ribosomal genes (%)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Fmr1-/y
WT
A3
Mitocondrial genes (%)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Fmr1-/y
WT
A4
Diversity
2500
2000
1500
1000
500
0
Fmr1-/y
WT
B1
100
80
60
40
20
0
Fmr1-/y
WT
Exon %
Intron %
Intergenic %
B2
Exon
Percentage (%)
100
80
60
40
20
0
Fmr1-/y
WT
B3
Intron
Percentage (%)
100
80
60
40
20
0
Fmr1-/y
WT
B4
Intergenic
Percentage (%)
100
80
60
40
20
0
Fmr1-/y
WT

<u>Figure S6</u>: Quality assessment of RNA-seq libraries confirming that the groups are comparable.

(A1) Quantification of total number of reads of *Fmr1*$^{-/y}$ and WT SGI. **(A2)** Quantification of ribosomal genes percentage. **(A3)** Quantification of mitochondrial genes percentage. **(A4)** Quantification of gene diversity between the two genotypes. **(B1)** Quantification of percentage of exon (dark green), intron (middle green), intergenic (light green) in each recorded neuron. **(B2)** Percentage of exon (left), intron (middle), intergenic (right) per genotype.
Mean ± SEM. P-values were computed using Mann-Whitney rank sum test for panel **A, B3, B4,** unpaired t-test for panel **B2**.

Figure S7:

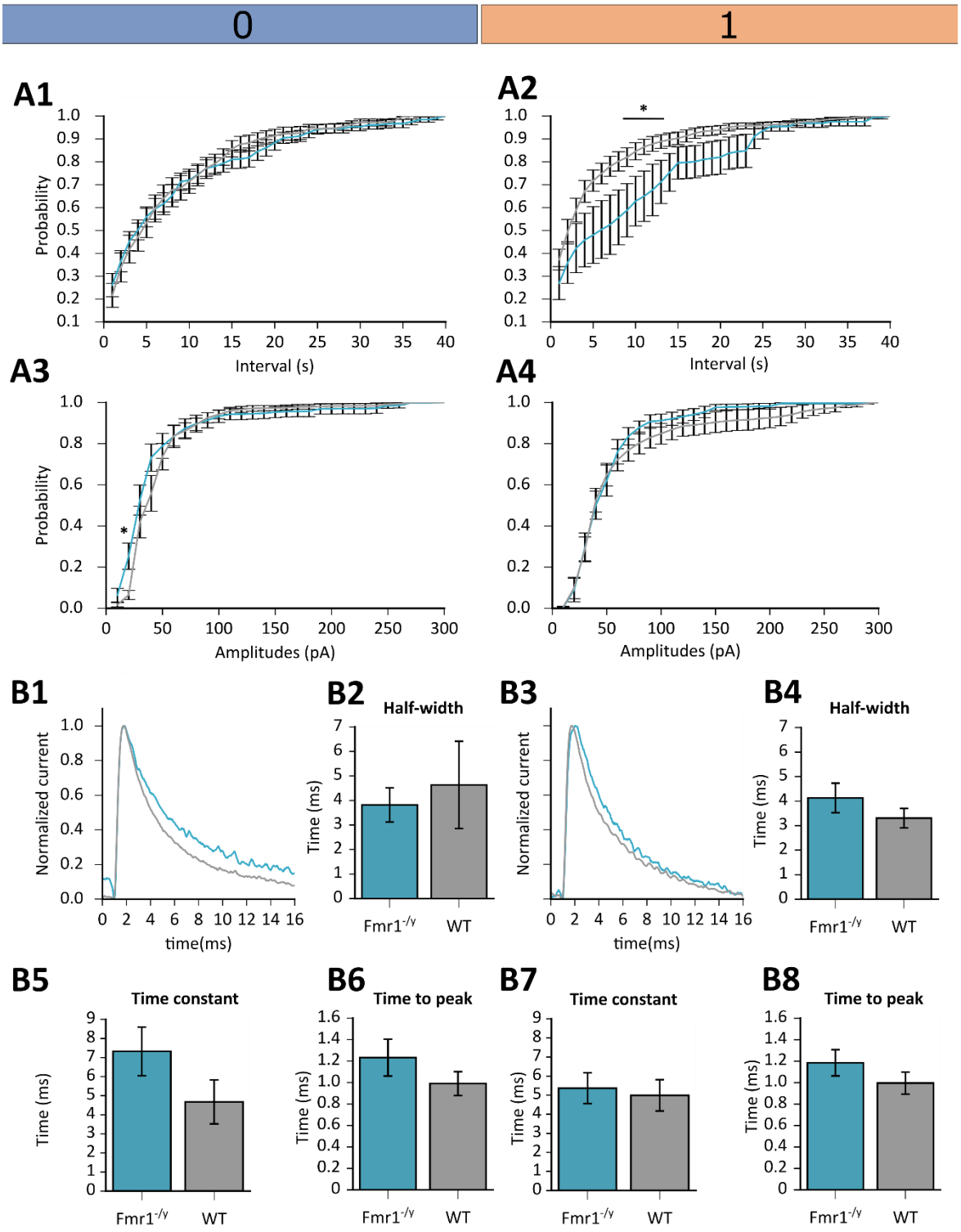

A
Astrocytes
Oligodendrocytes
Microglia
All
pseq
sNuc
−6
0
6
B
sNuc
WT
Fmr1-/y
Cells %
Contamination index
C
Real
Predicted
neurons
microglia
meninges
vascular
astrocytes
Oligos
OPC
D
OPC
Oligos
astrocytes
vascular
meninges
microglia
neurons
E
log (rpm)
Gad1
Pax2
Pvalb
Npy
Calb2
Kcnip2
Tlx3
Lmx1b
Prkcg
Neurod4
Htr6
Prokr2
Slc17a7
Slc17a6
F
Mixte
Inhibitory
Excitatory
Cholinergic
G
C
E
I
M

<u>Figure S7</u>: SGI recorded through patch-seq technique exhibit typical inhibitory spinal neuron transcriptomes in both *Fmr1*$^{-/y}$ and WT mice.

(A) Contamination index (Tripathy et al., 2018) calculated based on the average expression of markers of astrocytes (left), oligodendrocytes (middle left), microglia (middle right) and the three of them (right), within neuronal cells of a single nucleus reference dataset (Sathyamurthy et al., 2018) (sNuc, down) or SGI from our dataset (pseq, up). Boxes represent median, lower and upper quartiles. **(B)** Percentage of cell as a function of contamination index value in reference dataset SNuc (left), SGI recorded in WT (middle) and Fmr1$^{-/y}$ (right) animals. **(C)** Sankey plot for a logistic regression classifier trained to differentiate cell types based on the reference dataset (SNuc) and **(D)** predictions made for patch-seq recorded SGI, color scale indicates the reliability of the prediction. For C and D vascular encompasses both endovascular cells and vascular ones, meninges encompasses both Schwann and meningeal cells. **(E)** Expression profile of selected inhibitory (yellow) and excitatory (orange) spinal interneuron markers in reference dataset (left), and SGI from our dataset recorded in WT (middle) and *Fmr1*$^{-/y}$ (right) animals. **(F)** Sankey plot for a logistic regression classifier trained to differentiate neuron subtypes (M: mixed, I: inhibitory, E: excitatory, C: cholinergic) also based on the reference dataset (SNuc) and **(G)** predictions made for patch-seq recorded SGI.

Statistics *p<0.05; **p<0.01; For panel A data are represented as median, upper and lower quartile, for panel E data are represented as mean ± SEM. P-values were computed using Mann-Whitney rank sum test for panel **A.**

Figure S8:


0
1
A1
A2
A3
A4
Probability
Interval (s)
Amplitudes (pA)
*
B1
B2
B3
B4
Normalized current
time(ms)
Half-width
Time (ms)
Fmr1-/y
WT
B5
B6
B7
B8
Time constant
Time to peak

<u>Figure S8</u>: Reduced spontaneous excitatory drive onto *Pvalb-Npy* neurons in *Fmr1*$^{-/y}$ mice.
Cumulative curves of EPSC intervals **(A1, A2)** and EPSC amplitude **(A3, A4)** in cluster 0 **(A1, A3)** and cluster 1 **(A2, A4)**. Averaged normalized EPSC voltage traces in cluster 0 **(B1)** and in cluster 1 **(B3)**. Quantification of half-width in cluster 0 **(B2)** and cluster 1 **(B4)**, time constant in cluster 0 **(B5)** and cluster 1 **(B7)**, time to peak in cluster 0 **(B6)** and cluster 1 **(B8)** of individuals EPSC.
Statistics *p<0.05; **p<0.01; Mean ± SEM. p-values were computed using two-way ANOVA followed by Tukey HSD for all panels.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

De récentes études ont mis en évidence des altérations de la régulation GABAergique dans les premiers niveaux de traitement de l'information sensorielle tactile, en particulier au niveau des afférences sensorielles primaires qui présentent une réduction d'inhibition présynaptique médiée par les récepteurs $GABA_A$. Ces altérations participent directement à l'émergence des troubles sensoriels et sociaux-cognitifs caractéristiques de l'autisme (Orefice et al., 2016, 2019; Tasnim et al., 2024). Néanmoins, l'altération potentielle des interneurones spinaux GABAergiques agissant sur ces récepteurs $GABA_A$ n'a pour le moment pas été étudiée. Ces interneurones constituent pourtant un élément clé du contrôle inhibiteur spinal, et peuvent être subdivisés en plusieurs sous-populations distinctes, définies par leurs profils transcriptomiques. Dans ce contexte, nous avons donc posé l'hypothèse selon laquelle chez les individus autistes, certaines des différentes sous-populations d'interneurones GABAergiques seraient sélectivement altérées notamment dans leurs propriétés électrophysiologiques alors que d'autres ne seraient pas affectées. L'objectif de ce projet de thèse a donc été d'étudier la plasticité fonctionnelle de ces interneurones GABAergiques dans le modèle murin d'autisme *Fmr1*$^{-/y}$. Afin de corréler le profil transcriptomique aux propriétés électrophysiologiques de ces neurones nous avons utilisé la technique de patch-seq sur des tranches aiguës de moelle épinière de souris *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP*. Nous avons mis en évidence des altérations des propriétés électrophysiologiques intrinsèques des interneurones spinaux GABAergiques chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$, spécifiquement au sein de sous-populations neuronales co-exprimant Pvalb et NPY. Ces altérations se traduisent par une réduction de la plage dynamique de réponse de ces neurones qui présentent ainsi une capacité réduite à ajuster leur fréquence de décharge en fonction de l'intensité des stimulations reçues, suggérant un codage moins précis de l'information sensorielle afférente.

Le modèle *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP*

Ces résultats ont donc été obtenus à l'aide de la lignée transgénique *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* qui nous a permis d'identifier et d'enregistrer spécifiquement les interneurones GABAergiques spinaux exprimant *Gad1*. Le modèle murin *Fmr1*$^{-/y}$ est un modèle largement utilisé dans la littérature, connus et décrits dans la recherche sur la thématique de l'autisme. Tout comme déjà abordé dans la discussion de l'article, la caractérisation comportementale des souris *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* nous a permis de valider le phénotype du modèle, et de confirmer que l'haploinsuffisance en *Gad1* n'empêchait pas le développement des phénotypes comportementaux principaux de l'autisme. En effet, la construction *Gad1-GFP* était nécessaire pour pouvoir identifier et cibler les interneurones GABAergiques dans notre étude. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que cette haploinsuffisance induit logiquement une réduction de la quantité de GABA produite par rapport à des souris classiquement *Fmr1*$^{-/y}$. Plusieurs études ont en effet déjà montré que cette haploinsuffisance avait un impact sur le comportement des souris en question, puisqu'elle induit à elle seule des déficits sociaux, augmente la vulnérabilité au stress social, induit des comportements de types

dépressifs (Kolata et al., 2018; Nullmeier et al., 2020), ainsi qu'une hypersensibilité mécanique prolongée dans les modèles de douleur neuropathique et inflammatoire. Dans ce contexte, ces souris ne répondent pas aux analgésiques tels que le diazepam, et ces effets sont plus prononcées chez les souris femelles que chez les mâles. Cette aggravation des phénotypes douloureux est directement causé par la diminution de la concentration de GABA spinale (Charron et al., 2024). Il est donc important de garder à l'esprit que notre modèle *Fmr1*$^{-/y}$-*Gad1-GFP*, du fait de son haploinsuffisance en Gad1 pourrait donc présenter des phénotypes exagérés par rapport aux modèles classiques de l'autisme.

Un moyen d'éviter cette haploinsuffisance serait d'utiliser une lignée qui exprimerait la GFP sous le contrôle de la *Gad1* via un chromosome bactérien artificiel (BAC) permettant de conserver le locus endogène Gad1 intact (Heintz, 2001; Gong et al., 2003) et de la croiser avec une souris *Fmr1*$^{-/y}$. Toutefois, des études ont rapporté que l'expression du transgène dans certaines de ces lignées peut être ectopique ou partielle, ce qui impose une validation stricte de chaque lignée utilisée (Gong et al., 2007).

D'autre part, plusieurs autres modèles murins d'autisme ont été largement décrits et caractérisés dans la littérature, tels que le modèle *Shank3B*$^{+/-}$ ou *Shank3*$^{\Delta C/\Delta C}$, *Mecp2*$^{-/y}$, *Gabrb3*$^{+/-}$… Chacun de ces modèles présente également des altérations comportementales (déficits sociaux, comportements répétitifs, altérations sensorielles : hyper-sensibilité tactile au niveau des vibrisses (Chen et al., 2020) et hyper-réactivité de la peau poilue (Orefice et al., 2016, 2019)) reflétant différentes facettes du spectre de l'autisme. Ces modèles ont déjà été utilisés en recherche pour mieux comprendre les différences phénotypiques relatives à l'autisme et ont révélé des altérations du traitement des informations somatosensorielles au niveau périphérique et central (Orefice et al., 2016, 2016; Huzard et al., 2025). Dans ce contexte, le modèle *Fmr1*$^{-/y}$ chez lequel les altérations périphériques et spinales restent peu explorées, représente un modèle pertinent pour approfondir la compréhension des dysfonctions sensorielles et de leur contribution aux symptômes autistiques.

Ainsi, bien que d'autres modèles auraient pu être envisagés, le choix du modèle *Fmr1*$^{-/y}$-*Gad1-GFP* reste justifié grâce à la caractérisation comportementale réalisée et permettant de confirmer la présence de phénotypes typiques de l'autisme, soutenant la fiabilité et la validité de ce modèle pour notre étude.

Avantages et limites de la technique de patch-seq

La technique du patch-seq combinant l'enregistrement électrophysiologique en patch-clamp, la reconstruction morphologique et l'analyse transcriptomique unicellulaire, représente en théorie une approche puissante pour relier directement le phénotype fonctionnel, morphologique et moléculaire d'un même neurone. Dans le cadre de ce travail, cette méthode s'est avérée particulièrement pertinente puisqu'elle nous a permis d'identifier deux sous-populations d'interneurones GABAergiques spinaux et de déterminer les altérations électrophysiologiques dans une de ces sous-populations spécifiquement dans le

modèle *Fmr1*$^{-/y}$. Cependant, malgré ses atouts conceptuels le patch-seq présente, plusieurs limites techniques qui restreignent l'interprétation des résultats.

La principale contrainte réside dans la quantité extrêmement faible d'ARNm récupérée lors de l'aspiration du cytosol. La dilution de ce contenu dans la solution interne combinée à la dégradation rapide de l'ARNm pendant les enregistrements réduit considérablement la couverture transcriptomique mesurée. Cette faible quantité d'ARNm récoltée peut induire une sous-évaluation de l'expression de certains gènes, pouvant parfois aller jusqu'à une absence totale de détection appelé « dropout ». Cette absence de détection de l'expression ne reflète pas nécessairement une réelle absence biologique du gène en question, mais peut en fait être lié au fait que l'ARNm n'a pas pu être capturé ou amplifié. Ces *dropouts* peuvent alors biaiser l'interprétation, en particulier en ce qui concerne les gènes faiblement exprimés comme ceux codant pour certains canaux ioniques. Cette limite explique en partie pourquoi nous n'avons pas réussi à établir de corrélation fiable entre les altérations électrophysiologiques observées dans les interneurones GABAergiques spinaux *Fmr1*$^{-/y}$ et l'expression des gènes codants pour les conductances ioniques correspondantes. Par ailleurs, l'analyse différentielle d'expression génique entre les différents clusters identifiés n'a pas non plus permis d'obtenir de résultats concluants. En effet, les modèles statistiques disponibles pour ce type de données produisent des résultats hautement variables et peu robustes, rendant difficile l'identification de gènes différentiellement exprimés de manière fiable.

Par ailleurs, la qualité et la stabilité des ARNm varient fortement d'un gène à l'autre, ce qui influence l'efficacité de la PCR d'amplification et donc leur détection finale. De plus, comme la récolte du contenu cellulaire s'effectue exclusivement au niveau somatique, le patch-seq ne permet pas d'accéder au transcriptome localisé dans les dendrites ou les axones, où peuvent pourtant se trouver des ARNm impliqués dans la régulation locale de l'excitabilité. Il faut également rappeler que l'expression d'un ARNm ne garantit pas la présence d'une protéine fonctionnelle, de nombreux processus post-transcriptionnels (traduction, adressage, modifications post-traductionnelles…) intervenant avant l'incorporation du canal ou du récepteur dans la membrane.

D'autre part, le faible débit du patch-seq limite le nombre de neurones pouvant être analysés, ce qui restreint la couverture cellulaire et rend difficile l'identification de l'ensemble des sous-populations présentes. Cette contrainte explique en partie pourquoi nous n'avons identifié que deux sous-populations d'interneurones, alors que des approches à plus haut rendement comme le scRNA-seq (Häring et al., 2018) ou le snRNA-seq (Sathyamurthy et al., 2018) réalisées sur des blocs entiers de moelle épinière, ont permis de révéler une diversité bien plus étendue.

Ainsi, sur le plan théorique, le patch-seq représentait initialement la technique idéale pour répondre à notre question scientifique puisqu'elle était censée nous permettre i) d'identifier différentes sous-populations d'interneurones inhibiteurs par l'expression de marqueurs connues et déjà bien décrits de la littérature, combiné à une caractérisation

morphologique et fonctionnelle de ces neurones de façon individuelle, ii) nous permettre d'étudier l'expression de gènes différentiellement exprimés dans ces sous-populations et de mettre ainsi en évidence les causes biologiques à l'origine des altérations électrophysiologiques ou autres nouvelles cibles moléculaires thérapeutiques pertinentes. En pratique, seul le premier point s'est avéré réalisable, l'étude d'expression différentielle des gènes n'a pu être conduite de manière fiable, et nous n'avons pas pu faire de lien direct entre les propriétés électrophysiologiques et la présence au niveau transcriptomique des canaux ioniques correspondants. L'accès direct à la morphologie cellulaire après remplissage à la biocytine nous a permis d'intégrer une dimension structurelle supplémentaire au profil fonctionnel, même si suite à l'aspiration du cytosol, seule une faible proportion de neurones a pu être morphologiquement reconstruite.

La réduction de l'activité des canaux HCN n'est pas suffisante pour expliquer les altérations d'excitabilité intrinsèque des interneurones spinaux GABAergiques des souris *Fmr1*$^{-/y}$

Nous avons montré que les courants de sag, et par conséquent l'activité des canaux HCN, étaient réduits dans les interneurones spinaux GABAergiques Pvalb^{+} des souris *Fmr1*$^{-/y}$. L'activité de ces canaux a déjà été étudiée à de nombreuses reprises dans différents contextes et son rôle a notamment été mis en évidence dans le maintien et l'induction d'une décharge soutenue à haute fréquence dans les cellules en panier de l'hippocampe et du néocortex exprimant *Pvalb* (Roth and Hu, 2020). Dans un contexte d'autisme, chez des souris *Fmr1*$^{-/y}$, le courant Ih traversant les canaux HCN est augmenté dans les dendrites des neurones du CA1 de l'hippocampe, ce phénomène est associé à une diminution de la résistance d'entrée mesurée au niveau de ces mêmes dendrites ce qui les rendrait moins excitables (Brager et al., 2012). A l'inverse, toujours dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$, une réduction d'expression des protéines HCN1 et HCN2, ainsi que du courant Ih induit par ces canaux ont été mis en évidence dans les neurones pyramidaux de la couche L5 du S1. Ces altérations contribueraient apparemment à l'hyperexcitabilité de ces neurones (Zhang et al., 2014). Au niveau spinal et périphérique, le blocage des canaux HCN, soit dans les neurones spinaux soit dans les neurones sensoriels primaires, par l'injection de leur inhibiteur spécifique ZD7288 — administré respectivement par voie intrathécale ou périneurale — permet d'atténuer les douleurs neuropathiques (Dalle and Eisenach, 2005; Ma et al., 2024). Le ZD7288 est ainsi notamment capable de diminuer la fréquence de décharge des fibres afférentes Aβ et Aδ de 90% et 40% respectivement et de supprimer l'allodynie mécanique (Chaplan et al., 2003).

Ainsi, pour évaluer la contribution de ces canaux aux altérations d'excitabilité intrinsèque que nous avons observé dans notre modèle, nous avons appliqué le bloqueur sélectif ZD7288. Cependant, ce blocage n'a pas entraîné de modification significative de l'excitabilité, ni chez les neurones WT ni chez les neurones *Fmr1*$^{-/y}$, suggérant que la seule diminution de l'activité HCN ne suffit pas à expliquer les altérations observées dans ce modèle. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que le nombre de neurones enregistrés dans

chaque groupe est faible (n = 6), limitant la puissance statistique et la représentativité de l'échantillon. De plus, l'identité transcriptomique des neurones enregistrés n'a pas été déterminée. Or, nos analyses précédentes ont montré que les altérations d'excitabilité sont spécifiques aux interneurones Pvalb$^+$. Il est donc possible, voire probable, que notre échantillon contienne à la fois des neurones Pvalb$^+$ et des neurones Nos1$^+$, ce qui pourrait masquer un effet réel du blocage des canaux HCN au sein de cette sous-population. Ainsi, il serait pertinent de reproduire cette expérience dans des souris *Fmr1*$^{-/y}$*-Pvalb-GFP*, de façon à cibler spécifiquement les interneurones Pvalb$^+$. Une telle approche offrirait une meilleure résolution cellulaire et permettrait de confirmer si la réduction de l'activité HCN contribue effectivement aux altérations d'excitabilité intrinsèques observées dans cette sous-population particulière.

L'hyperexcitabilité des interneurones spinaux GABAergiques pour les faibles intensités de stimulation ne semble pas affecter la transmission synaptique inhibitrice *ex vivo*

Nous avons cherché à évaluer les conséquences potentielles de l'altération d'excitabilité observée chez les interneurones spinaux GABAergiques des souris *Fmr1*$^{-/y}$ sur le tonus inhibiteur global dans les cornes dorsales de la moelle épinière. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'hyperexcitabilité détectée pour les faibles intensités de stimulation, c'est-à-dire dans des conditions proches du potentiel de repos. Cependant, aucune différence significative entre les deux génotypes n'a été mise en évidence, ni sur les concentrations globales de neurotransmetteurs inhibiteurs dans les cornes dorsales, ni sur l'activité synaptique inhibitrice spontanée, ni sur l'inhibition présynaptique mesurée par le paired-pulse ratio (PPR). Ces résultats, bien que négatifs, doivent néanmoins être interprétés avec prudence en raison de plusieurs limitations techniques.

Ensuite, l'enregistrement de l'activité synaptique inhibitrice spontanée s'est heurté à plusieurs difficultés puisqu'un grand nombre de préparations ne montraient qu'une très faible, voire absence d'activité synaptique inhibitrice. Nous avons tenté d'y remédier en testant différentes conditions expérimentales : utilisation de solutions internes riches en Cl^- (résultats présentés), puis en gluconate mais en clampant cette fois le neurone enregistré à 0 mV, changement des anesthésiques (lidocaïne/exagon ou kétamine/xylazine), enrichissement du milieu extracellulaire en K^+, ou encore utilisation d'animaux plus jeunes. Aucune de ces approches n'a permis d'obtenir une activité synaptique inhibitrice spontanée robuste. Nous avons envisagé que cette faible activité puisse être liée à une diminution de la synthèse de GABA associée à l'haploinsuffisance du gène *Gad1*, mais des enregistrements réalisés sur des souris témoins (*Gad1*$^{+/+}$) ont montré un profil similaire, suggérant que cette explication n'est pas suffisante pour rendre compte du phénomène observé. Les résultats présentés ici reposent donc sur un nombre restreint d'enregistrements, limitant la portée des conclusions.

Concernant le paired-pulse ratio, l'absence de différence entre les génotypes pourrait être liée au protocole de stimulation utilisé : les stimulations appliquées (500 µA – 500 µs)

sont suffisantes pour recruter les fibres C, mais probablement trop fortes pour cibler spécifiquement les fibres Aβ ou Aδ, impliquées dans le toucher léger. Des stimulations plus sélectives (de respectivement 50 µA – 50 µs ou 500 µA – 50 µs) n'ont pas permis d'obtenir de réponses détectables dans les neurones enregistrés, y compris dans des neurones situés dans des laminae plus profondes. Une approche plus spécifique, telle que l'expression de channelrhodopsines spécifiquement dans les fibres Aβ, Aδ ou C permettrait de stimuler optogénétiquement ces afférences et de confirmer dans un premier temps si l'absence de réponse observée traduit une limitation technique ou un véritable défaut de connectivité avec les interneurones ciblés, et de pouvoir conclure spécifiquement sur une différence d'inhibition présynaptique ou non *ex vivo*.

Afin d'évaluer de potentielles altérations de l'inhibition présynaptique agissant sur les afférences primaires *ex vivo*, il serait également intéressant d'étudier les PAD (Primary Afferent Depolarisation) en mesurant les DRP (Dorsal Root Potential : potentiel de racine dorsale) qui correspondent à la somme des PAD produits par de nombreuses afférences. A partir d'une tranche de moelle épinière épaisse (assez épaisse pour contenir au minimum deux racines dorsales adjacentes ipsilatérales) il est possible de stimuler une racine (par exemple au niveau L5) via une électrode de succion, cette stimulation des afférences primaires permet l'activation des interneurones GABAergiques qui vont agir sur les récepteurs présynaptiques $GABA_A$ des afférences environnantes (des niveaux L4-L5-L6) puisque les interneurones GABAergiques possèdent une arborisation dendritique très étendue dans le sens rostro-caudale. La validation de cette expérience peut se faire par application d'antagonistes des récepteurs $GABA_A$ (bicuculline) qui devraient inhiber complétement la réponse DRP.

Enfin, ces expériences ont été réalisées *ex vivo* sur des tranches de moelle épinière, lesquelles subissent nécessairement des dommages lors de la préparation, notamment la section des racines dorsales et des afférences sensorielles. Cette contrainte limite forcément la représentativité des enregistrements par rapport aux conditions physiologiques *in vivo*. Ainsi, pour évaluer plus précisément les conséquences fonctionnelles de l'hyperexcitabilité des interneurones GABAergiques spinaux, des approches *in vivo* seraient plus adaptées. L'utilisation de miniscope, ou d'un microscope biphotonique par exemple (Nelson et al., 2019), pourrait permettre d'enregistrer simultanément l'activité calcique d'interneurones inhibiteurs (identifiés par GCamP (vert)) et excitateurs (identifiés par RCamP (rouge)) dans les cornes dorsales, en réponse à une stimulation périphérique contrôlée (par exemple une stimulation de la patte arrière avec un pinceau). Combinée à de la chémogénétique par injection intrapéritonéale de CNO, cette approche permettrait également de stimuler sélectivement les fibres Aβ- Aδ- ou C-LTMRs tout en mesurant l'activité calcique des interneurones excitateurs, fournissant ainsi une estimation indirecte du poids de l'inhibition pesant sur la synapse entre l'afférence et l'interneurone excitateur et donc de l'équilibre excitation/inhibition au sein des circuits spinaux.

Si nos résultats *ex vivo* n'ont pas permis de mettre en évidence un impact clair de l'hyperexcitabilité des interneurones GABAergiques spinaux sur la transmission inhibitrice, ils

soulignent néanmoins la complexité des mécanismes d'intégration au sein des circuits spinaux. Des approches *in vivo* plus intégratives, combinant enregistrements fonctionnels et manipulation chémogénétique des afférences sensorielles, apparaissent nécessaires pour déterminer dans quelle mesure ces altérations cellulaires influencent la balance excitation/inhibition et la perception tactile dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$.

Les interneurones spinaux GABAergiques des souris *Fmr1*$^{-/y}$ ne subissent pas de remodelage de l'arborisation dendritique

La reconstruction morphologique des interneurones spinaux GABAergiques, obtenue par patch-seq et marquage à la biocytine, n'a pas révélé de différence significative entre les deux génotypes, suggérant l'absence de remodelage dendritique majeur chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$. La couverture morphologique des neurones analysés reste toutefois partielle, principalement en raison des contraintes techniques inhérentes à la méthode du patch-seq, où l'aspiration du cytosol après injection de biocytine peut altérer la qualité du marquage. Malgré cela, une tendance à une arborisation légèrement plus restreinte et moins complexe a été observée chez les neurones *Fmr1*$^{-/y}$, ce qui pourrait refléter un appauvrissement subtil de leur connectivité excitatrice, puisque les entrées excitatrices ont plutôt tendance à contacter les neurones au niveau de l'arborisation distale (Megías et al., 2001; Ribeiro-da-Silva and De Koninck, 2008). Cette hypothèse est cohérente avec nos résultats électrophysiologiques, qui indiquent une diminution de la fréquence des EPSCs dans la sous-population GABAergique *Pvalb*$^{+}$*-NPY*$^{+}$ de ces souris. La réorganisation morphologique des interneurones spinaux des laminae IIi-III n'est pas un phénomène méconnu, puisqu'il a par exemple été déjà montré que les interneurones excitateurs PKCγ subissaient un remodelage de l'arborisation dendritique dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat (Alba-Delgado et al., 2018). Dans le contexte de l'autisme, les neurones pyramidaux de l'hippocampe présentent notamment une diminution du nombre d'épines dendritiques, une réduction de la ramification dendritique et de la longueur des projections des neurones corticaux dans le modèle *Clcn4ko* (Lee et al., 2025).

Une exploration plus ciblée, par exemple dans des lignées *Fmr1*$^{-/y}$*-Pvalb-GFP* combinant marquage morphologique et immunomarquage synaptique (vGluT2, PSD-95), permettrait de confirmer ce lien entre architecture dendritique et connectivité excitatrice. Ainsi, nos données, bien que limitées par la résolution morphologique accessible, suggèrent que les altérations d'excitabilité observées dans ce modèle pourraient s'accompagner de changements structurels subtils au sein des circuits inhibiteurs spinaux.

Lien entre la diminution de précision du codage de l'information tactile par les interneurones spinaux GABAergiques et les altérations de sensibilité tactiles observées dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$

Notre caractérisation comportementale du modèle a révélé que les souris *Fmr1*$^{-/y}$*-Gad1-GFP* présentaient une réactivité réduite au toucher léger par rapport à leur congénères

WT, notamment dans les tests de retrait de la bande adhésive, de stimulation de la patte au pinceau, et d'exploration de l'arène ouverte avec carton ondulé. Bien que ce profil d'hyporéactivité, soit moins étudié que l'hyperréactivité tactile, il constitue néanmoins un phénotype sensoriel largement expérimenté par les personnes autistes. L'hyposensibilité tactile est tout aussi impactante que l'hypersensibilité pour la qualité de vie des personnes concernées et se manifeste notamment par des comportements de recherches sensorielles plus importantes. De plus, des études ont montré que l'hypo- et l'hypersensibilité peuvent coexister chez un même individu autiste (Lane et al., 2010; Hazen et al., 2014; Siemann et al., 2020).

Ces observations comportementales corroborent avec les résultats obtenus dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$ sur les taches de discrimination de texture (Orefice et al., 2016), ainsi que dans une tache de détection vibrotactile appliquée sur la peau glabre des pattes avant (Semelidou et al., 2024). En revanche, ces résultats contrastent avec les tests de réactivité tactile mesurée par application d'un jet d'air sur la peau poilue du dos et montrant une hyperréactivité chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$ (Zhang et al., 2014; Orefice et al., 2016). Cette divergence de résultats pourrait s'expliquer par des altérations différentielles selon le type d'innervation périphérique propre à la peau glabre des paumes des pattes, et la peau poilue. En effet, comme évoqué dans l'introduction ces deux types de téguments ne sont pas totalement innervées par les mêmes types de fibres afférentes. La peau glabre est majoritairement innervée par des fibres Aβ-SA-LTMRs et la peau poilue est majoritairement innervée par des fibres Aβ-RA ; Aδ-RA et C-LTMRs. On peut donc envisager que ces différentes sous-populations de fibres soient différemment affectées dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$, ce qui pourrait contribuer à la variabilité des phénotypes sensoriels observés.

Au-delà de cette distinction périphérique, une approche intégrative permet de relier ces résultats contradictoires à la théorie du cerveau bruyant « noisy brain theory » (Ward, 2019). Selon cette hypothèse, les anomalies sensorielles de l'autisme découleraient d'une élévation du bruit neuronal endogène et d'une altération du rapport signal/bruit (SNR) dans les circuits sensoriels. Cette théorie a été explorée par plusieurs études de notre laboratoire. En effet, les résultats de Bhaskaran et al. (2023) et de Semelidou et al. (2024) permettent de proposer un cadre unifié expliquant comment l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux du cortex somatosensoriel primaire S1 peut se traduire, selon le contexte, par des phénotypes sensoriels opposés : hypersensibilité ou hyposensibilité.

Bhaskaran et al., 2023 ont mis en évidence une hyperexcitabilité des neurones pyramidaux de la couche 2/3 du S1 évoqué par une stimulation électrique de la patte arrière, chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$, associée à une variabilité accrue de l'amplitude et la largeur des potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSP) d'essai en essai. Cette variabilité est associée à une variance plus importante du potentiel membranaire de repos chez ces souris, indiquant un « bruit de fond endogène » élevé. Ces anomalies se traduisent ainsi par une diminution du SNR et une altération de la fiabilité du codage sensoriel. Les auteurs montrent également que la réduction de l'excitabilité des neurones pyramidaux du S1 par application locale d'un

agoniste des canaux BKCa (BMS191011) contribue en partie à la réduction de ce bruit (réduction de la variabilité du potentiel de repos mais absence d'effet sur la variabilité des EPSP d'essai en essai). En plus de la variabilité accrue des réponses chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$, ces mêmes réponses (EPSP) présentent une amplitude plus importante, suggérant une augmentation de l'intensité du signal perçu et arrivant aux neurones pyramidaux du S1 chez ces souris par rapport à leurs congénères WT, suggérant une réponse comportementale qui devrait être exagérée.

Semelidou et al. (2024) ont démontré, dans le même modèle, une augmentation du seuil de détection à des stimulations vibrotactiles induisant une réduction de la sensibilité tactile des souris *Fmr1*$^{-/y}$ à ce type de stimulations de faibles intensités. Cette altération est corrélée à un recrutement affaibli des neurones pyramidaux dans le S1 en réponse à ces stimulations et à une diminution du SNR. La correction de l'hyperexcitabilité par injection intrapéritonéale de BMS204352 a permis d'augmenter le SNR chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$ renforçant ainsi le codage des stimuli et améliorant in fine la perception tactile.

Ces deux ensembles de résultats ne sont pas contradictoires : ils reflètent plutôt deux expressions différentes d'un même mécanisme de désorganisation du codage sensoriel. En effet, lorsque le bruit de fond neuronal est élevé et que le signal sensoriel est faible, le SNR diminue, le signal se retrouve comme noyé dans le bruit ce qui entraîne une perte de détection (hyposensibilité). En revanche, lorsque le stimulus est plus fort, ce même bruit s'additionne au signal pertinent engendrant une amplification du signal qui atteint donc plus rapidement le seuil de détection et peut donc être perçu de façon hypersensible.

Dans ce contexte, nos résultats viennent compléter cette compréhension en amont du système sensoriel cortical, au niveau spinal. Nous avons montré que les interneurones spinaux GABAergiques présentent une altération bidirectionnelle de l'excitabilité intrinsèque chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$: une hyperexcitabilité pour les faibles intensités de stimulation et une hypoexcitabilité pour les fortes intensités. Ces données suggèrent que les anomalies d'intégration de l'information tactile pourraient émerger dès le premier niveau de traitement spinal, avant même les circuits corticaux. L'hyperexcitabilité à faible seuil pourrait réduire l'amplitude du signal de faibles intensités qui arrivant au S1 serait encore plus noyé dans le bruit et serait donc quasiment indétectable pour les souris *Fmr1*$^{-/y}$ menant alors à un phénomène d'hyposensibilité tactile. Tandis que l'hypoexcitabilité des interneurones spinaux GABAergiques et plus précisément des neurones Pvalb^{+} et NPY^{+} à forte intensité réduirait la capacité à inhiber efficacement les signaux sensoriels soutenus et de plus fortes intensités, transmettant ainsi une information d'intensité encore supérieur aux centres supraspinaux qui en s'additionnant au bruit de fond déjà présent à cause de l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux atteindrait plus rapidement le seuil de détection et serait perçu comme plus fort que ce qu'ils ne sont vraiment : engendrant une hypersensibilité à l'origine de l'hyperréactivité tactile.

Ensemble, ces observations soutiennent l'idée que la désorganisation de la balance E/I et du codage neuronal dans les circuits sensoriels est un mécanisme clé sous-jacent aux altérations de la perception tactile dans le syndrome de l'X fragile et plus largement dans l'autisme.

Afin de confirmer ce raisonnement, il serait possible d'utiliser la microscopie biphotonique ou un miniscope, pour enregistrer les interneurones spinaux GABAergiques (ou Pvalb$^+$ spécifiquement) (identifiés par GCamP (vert)) et les interneurones excitateurs (identifiés par RCamP (rouge)) couplé à des stimulations vibrotactiles d'une part pour reproduire les stimuli de faibles intensités (Semelidou et al., 2024) puis électrique sur un autre lot de souris pour reproduire les stimuli de plus fortes intensités (Bhaskaran et al., 2023). La réactivité des souris aux stimuli en parallèle de l'activité calcique des interneurones spinaux, nous permettrait de conclure sur l'hypo- hyperréactivité des souris *Fmr1*$^{-/y}$ selon le contexte et de lier directement ces réponses comportementales à l'activité calcique des interneurones spinaux.

En parallèle, Qiu et al., 2024 ont montré dans un modèle de douleur neuropathique que les interneurones Pvalb$^+$ spinaux n'était pas capables de soutenir une décharge tonique à haute fréquence pour les fortes intensités de stimulation, cette observation reflète étroitement ce que nous avons observé chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$. Ils montrent également que l'inhibition des canaux SK à l'aide du bloqueur Apamine permet de rétablir la décharge tonique dans les interneurones Pvalb$^+$ spinaux. Il pourrait donc être intéressant d'une part de tester cet effet *ex vivo* sur des tranches de moelle épinière de souris *Fmr1*$^{-/y}$, et si les résultats obtenus sont convaincants, l'inhibiteur des canaux SK pourrait être administré par injection intrathécale à des souris *Fmr1*$^{-/y}$ pour permettre de tenter de restaurer l'activité calcique des interneurones spinaux ainsi que la réactivité sensorielle pour les fortes intensités de stimulation des souris *in vivo*. À l'inverse, bien que les canaux BKCa aient été identifiés comme une cible thérapeutique pertinente dans le modèle *Fmr1*$^{-/y}$, où l'activation par le BMS191011 permet de corriger l'hyperexcitabilité des neurones pyramidaux du S1, cette approche ne semble pas adaptée à notre contexte. En effet, nous observons une augmentation de la mAHP dans les interneurones spinaux GABAergiques, ce qui suggère qu'une stimulation supplémentaire des BKCa serait contre-productive, et que cette voie ne constitue probablement pas une cible pertinente au niveau spinal.

L'hypothèse Parvalbumine de l'autisme

Enfin, nos données s'inscrivent dans l'hypothèse d'altérations des neurones Pvalb$^+$ dans l'autisme. En effet, de nombreuses études sur différents modèles murins de l'autisme ont montré une réduction du nombre de neurones Pvalb$^+$ mais aussi une réduction de la protéine Pvalb et de son ARNm dans différentes régions du cerveau (Selby et al., 2007; Peñagarikano et al., 2011; Filice et al., 2016; Vogt et al., 2018; Orefice et al., 2019), ces altérations ont également été observés post-mortem chez l'humain (Hashemi et al., 2017; Juarez and Martínez Cerdeño, 2022). Des altérations du fonctionnement des interneurones

Pvalb^{+} ont également été mises en avant, telle qu'une excitabilité réduite notamment pour les plus hautes intensités de stimulation dans le cortex en tonneau (situé au niveau de la couche 4 du S1) dans le modèle *NL3-R451C-KI* (He et al., 2025). La réduction de l'activité des neurones Pvalb^{+} a aussi été démontré *in vivo*, dans le cortex visuel primaire par exemple, dans lequel cette hypoactivité est à l'origine de l'altération de la discrimination visuelle chez les souris *Fmr1*$^{-/y}$ (Goel et al., 2018). Une activité spontanée réduite et des réponses évoquées plus faibles à la stimulation des vibrisses sont également retrouvés *in vivo* dans le cortex somatosensoriel (Kourdougli et al., 2023). De la même façon, la délétion du gène *Fmr1* spécifiquement dans les neurones Pvalb^{+} entrainent le développement de déficits comportementaux associés au SXF et à l'autisme (Kalinowska et al., 2022).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abraira VE et al. (2017) The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. Cell 168:295-310.e19.

Abraira VE, Ginty DD (2013) The Sensory Neurons of Touch. Neuron 79:618–639.

Alba-Delgado C, Mountadem S, Mermet-Joret N, Monconduit L, Dallel R, Artola A, Antri M (2018) 5-HT2A Receptor-Induced Morphological Reorganization of PKCγ-Expressing Interneurons Gates Inflammatory Mechanical Allodynia in Rat. J Neurosci 38:10489–10504.

Allain A-E, Corronc HL, Delpy A, Cazenave W, Meyrand P, Legendre P, Branchereau P (2011) Maturation of the GABAergic Transmission in Normal and Pathologic Motoneurons. Neural Plasticity 2011:905624.

American Psychiatric Association (1980) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd ed DSM-3. American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association ed. (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 5th ed. Washington, D.C: American Psychiatric Association.

Amestoy A, Mallet J, Iftimovici A, Lefebvre A, Stéphan F (2025) Les anomalies sensorielles: Une dimension objective et quantifiable en santé mentale. Med Sci (Paris) 41:469–476.

Arnett MT, Herman DH, McGee AW (2014) Deficits in Tactile Learning in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. PLOS ONE 9:e109116.

Asperger H (1944) Die „Autistischen Psychopathen" im Kindesalter. Archiv f Psychiatrie 117:76–136.

Augustine F, Nebel MB, Mostofsky SH, Mahone ME, Singer H (2021) Aberrant Prefrontal Cortical-Striatal Functional Connectivity in Children with Primary Complex Motor Stereotypies. Cortex 142:272–282.

Auyeung B, Taylor K, Hackett G, Baron-Cohen S (2010) Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old children. Mol Autism 1:11.

Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV (1995) Immunocytochemical Localization of trkA Receptors in Chemically Identified Subgroups of Adult Rat Sensory Neurons. Eur J Neurosci 7:1484–1494.

Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P (1998) A clinicopathological study of autism. Brain 121 (Pt 5):889–905.

Balasco L, Provenzano G, Bozzi Y (2020) Sensory Abnormalities in Autism Spectrum Disorders: A Focus on the Tactile Domain, From Genetic Mouse Models to the Clinic. Front Psychiatry 10 Available at: https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsyt.2019.01016/full [Accessed August 19, 2025].

Bardoni R, Takazawa T, Tong C-K, Choudhury P, Scherrer G, MacDermott AB (2013) Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. Annals of the New York Academy of Sciences 1279:90–96.

Baron-Cohen S, Lombardo MV, Auyeung B, Ashwin E, Chakrabarti B, Knickmeyer R (2011) Why Are Autism Spectrum Conditions More Prevalent in Males? PLOS Biology 9:e1001081.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. Cell 139:267–284.

Baudou E, Nemmi F, Peran P, Cignetti F, Blais M, Maziero S, Tallet J, Chaix Y (2022) Atypical connectivity in the cortico-striatal network in NF1 children and its relationship with procedural perceptual-motor learning and motor skills. Journal of Neurodevelopmental Disorders 14:15.

Bausch AE, Ehinger R, Straubinger J, Zerfass P, Nann Y, Lukowski R (2018) Loss of Sodium-Activated Potassium Channel Slack and FMRP Differentially Affect Social Behavior in Mice. Neuroscience 384:361–374.

Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG (2015) The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. Psychol Med 45:601–613.

Bedford SA et al. (2020) Large-scale analyses of the relationship between sex, age and intelligence quotient heterogeneity and cortical morphometry in autism spectrum disorder. Mol Psychiatry 25:614–628.

Begeer S, Mandell D, Wijnker-Holmes B, Venderbosch S, Rem D, Stekelenburg F, Koot HM (2013) Sex Differences in the Timing of Identification Among Children and Adults with Autism Spectrum Disorders. J Autism Dev Disord 43:1151–1156.

Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci 3:728–739.

Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. J Physiol 416:303–325.

Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. Physiological Reviews 87:1215–1284.

Ben-Ari Y, Tseeb V, Raggozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL (1994) γ-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. In: Progress in Brain Research (Van Pelt J, Corner MA, Uylings HBM, Lopes Da Silva FH, eds), pp 261–273 The Self-Organizing Brain: From Growth Cones to Functional Networks. Elsevier. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308605452 [Accessed October 14, 2025].

Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. Journal of Neurophysiology Available at: https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jn.1969.32.6.1025 [Accessed October 5, 2025].

Betley JN, Wright CVE, Kawaguchi Y, Erdélyi F, Szabó G, Jessell TM, Kaltschmidt JA (2009) Stringent Specificity in the Construction of a GABAergic Presynaptic Inhibitory Circuit. Cell 139:161–174.

Bhaskaran AA, Gauvrit T, Vyas Y, Bony G, Ginger M, Frick A (2023) Endogenous noise of neocortical neurons correlates with atypical sensory response variability in the Fmr1−/y mouse model of autism. Nat Commun 14:7905.

Bilousova TV, Dansie L, Ngo M, Aye J, Charles JR, Ethell DW, Ethell IM (2009) Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. J Med Genet 46:94–102.

Bleuler E (1912) The theory of schizophrenic negativism. New York : The Journal of nervous and mental disease publishing company. Available at: http://archive.org/details/theoryofschizoph00bleu [Accessed September 19, 2025].

Bölte S, Neufeld J, Marschik PB, Williams ZJ, Gallagher L, Lai M-C (2023) Sex and gender in neurodevelopmental conditions. Nat Rev Neurol 19:136–159.

Bonin RP, Wang F, Desrochers-Couture M, Ga¸secka A, Boulanger M-E, Côté DC, De Koninck Y (2016) Epidural optogenetics for controlled analgesia. Mol Pain 12:1744806916629051.

Botha M, Hanlon J, Williams GL (2023) Does Language Matter? Identity-First Versus Person-First Language Use in Autism Research: A Response to Vivanti. J Autism Dev Disord 53:870–878.

Bottema-Beutel K, Kapp SK, Lester JN, Sasson NJ, Hand BN (2021) Avoiding Ableist Language: Suggestions for Autism Researchers. Autism in Adulthood 3:18–29.

Bourane S, Duan B, Koch SC, Dalet A, Britz O, Garcia-Campmany L, Kim E, Cheng L, Ghosh A, Ma Q, Goulding M (2015) Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. Science 350:550–554.

Boyd BA, Baranek GT, Sideris J, Poe MD, Watson LR, Patten E, Miller H (2010) Sensory Features and Repetitive Behaviors in Children with Autism and Developmental Delays. Autism Res 3:78–87.

Boyle KA, Gutierrez-Mecinas M, Polgár E, Mooney N, O'Connor E, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2017) A quantitative study of neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord. Neuroscience 363:120–133.

Boyle KA, Polgar E, Gutierrez-Mecinas M, Dickie AC, Cooper AH, Bell AM, Jumolea E, Casas-Benito A, Watanabe M, Hughes DI, Weir GA, Riddell JS, Todd AJ (2023) Neuropeptide Y-expressing dorsal horn inhibitory interneurons gate spinal pain and itch signalling. eLife 12:RP86633.

Braat S, D'Hulst C, Heulens I, De Rubeis S, Mientjes E, Nelson DL, Willemsen R, Bagni C, Van Dam D, De Deyn PP, Kooy RF (2015) The GABAA receptor is an FMRP target with therapeutic potential in fragile X syndrome. Cell Cycle 14:2985–2995.

Braga JD, Thongngam M, Kumrungsee T (2024) Gamma-aminobutyric acid as a potential postbiotic mediator in the gut–brain axis. npj Sci Food 8:16.

Brager DH, Akhavan AR, Johnston D (2012) Impaired Dendritic Expression and Plasticity of h-Channels in the fmr1−/y Mouse Model of Fragile X Syndrome. Cell Reports 1:225–233.

Brandalise F, Kalmbach BE, Mehta P, Thornton O, Johnston D, Zemelman BV, Brager DH (2020) Fragile X Mental Retardation Protein Bidirectionally Controls Dendritic Ih in a Cell Type-Specific Manner between Mouse Hippocampus and Prefrontal Cortex. J Neurosci 40:5327–5340.

Brewer CL, Styczynski LM, Serafin EK, Baccei ML (2020) Postnatal maturation of spinal dynorphin circuits and their role in somatosensation. PAIN 161:1906.

Brohawn SG, Su Z, MacKinnon R (2014) Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K+ channels. Proc Natl Acad Sci U S A 111:3614–3619.

Brown AG (1981) Organization in the Spinal Cord. London: Springer. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4471-1305-8 [Accessed October 3, 2025].

Brown AG, Iggo A (1967) A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. J Physiol 193:707–733.

Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. J Neurophysiol 85:1561–1574.

Cameron D, Polgár E, Gutierrez-Mecinas M, Gomez-Lima M, Watanabe M, Todd AJ (2015) The organisation of spinoparabrachial neurons in the mouse. PAIN 156:2061.

Canitano R (2007) Epilepsy in autism spectrum disorders. Eur Child Adolesc Psychiatry 16:61–66.

Cantor DS, Thatcher RW, Hrybyk M, Kaye H (1986) Computerized EEG analyses of autistic children. J Autism Dev Disord 16:169–187.

Carreno-Munoz MI, Martins F, Medrano MC, Aloisi E, Pietropaolo S, Dechaud C, Subashi E, Bony G, Ginger M, Moujahid A, Frick A, Leinekugel X (2018) Potential Involvement of Impaired BKCa Channel Function in Sensory Defensiveness and Some Behavioral Disturbances Induced by Unfamiliar Environment in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. Neuropsychopharmacol 43:492–502.

Cascio CJ, Moore D, McGlone F (2019) Social touch and human development. Developmental Cognitive Neuroscience 35:5–11.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science 288:306–313.

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. Nature 398:436–441.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389:816–824.

Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI, Anderson DJ (2009) Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. Proc Natl Acad Sci U S A 106:9075–9080.

Cellot G, Cherubini E (2014) GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. Front Pediatr 2:70.

Chambers MR, Andres KH, von Duering M, Iggo A (1972) The structure and function of the slowly adapting type II mechanoreceptor in hairy skin. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 57:417–445.

Chaplan SR, Guo H-Q, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003) Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. J Neurosci 23:1169–1178.

Chapman E, Baron-Cohen S, Auyeung B, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G (2006) Fetal testosterone and empathy: evidence from the empathy quotient (EQ) and the “reading the mind in the eyes” test. Soc Neurosci 1:135–148.

Charron A, Pepino L, Malapert P, Debrauwer V, Castets F, Salio C, Moqrich A (2024) Sex-related exacerbation of injury-induced mechanical hypersensitivity in GAD67 haplodeficient mice. Pain 165:192–201.

Chen C-H, Huang C-C, Cheng M-C, Chiu Y-N, Tsai W-C, Wu Y-Y, Liu S-K, Gau SS-F (2014) Genetic analysis of GABRB3 as a candidate gene of autism spectrum disorders. Mol Autism 5:36.

Chen Q, Deister CA, Gao X, Guo B, Lynn-Jones T, Chen N, Wells MF, Liu R, Goard MJ, Dimidschstein J, Feng S, Shi Y, Liao W, Lu Z, Fishell G, Moore CI, Feng G (2020) Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD. Nat Neurosci 23:520–532.

Chesler AT, Szczot M, Bharucha-Goebel D, Čeko M, Donkervoort S, Laubacher C, Hayes LH, Alter K, Zampieri C, Stanley C, Innes AM, Mah JK, Grosmann CM, Bradley N, Nguyen D, Foley AR, Le Pichon CE, Bönnemann CG (2016) The Role of PIEZO2 in Human Mechanosensation. N Engl J Med 375:1355–1364.

Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back SK, Na HS, Harfe BD, Wang F, Raouf R, Wood JN, Oh U (2012) The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. Nat Neurosci 15:1015–1021.

Chung M-K, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (2004) TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. J Biol Chem 279:21569–21575.

Coleman GT, Bahramali H, Zhang HQ, Rowe MJ (2001) Characterization of tactile afferent fibers in the hand of the marmoset monkey. J Neurophysiol 85:1793–1804.

Consorthium TD-BFX et al. (1994) Fmr1 knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. Cell 78:23–33.

Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. Cerebral cortex (New York, NY : 1991) 8:108–116.

Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science 330:55–60.

Courchesne E, Carper R, Akshoomoff N (2003) Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. JAMA 290:337–344.

Crane L, Goddard L, Pring L (2009) Sensory processing in adults with autism spectrum disorders. Autism 13:215–228.

Cristino AS, Williams SM, Hawi Z, An J-Y, Bellgrove MA, Schwartz CE, Costa LDF, Claudianos C (2014) Neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders represent an interconnected molecular system. Mol Psychiatry 19:294–301.

Curia G, Papouin T, Séguéla P, Avoli M (2009) Downregulation of tonic GABAergic inhibition in a mouse model of fragile X syndrome. Cereb Cortex 19:1515–1520.

Dahlhaus R, El-Husseini A (2010) Altered neuroligin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome. Behav Brain Res 208:96–105.

Dalle C, Eisenach JC (2005) Peripheral Block of the Hyperpolarization-Activated Cation Current (Ih) Reduces Mechanical Allodynia in Animal Models of Postoperative and Neuropathic Pain: Regional Anesthesia and Pain Medicine 30:243–248.

Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KYS, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB (2011) FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. Cell 146:247–261.

Das I, Estevez MA, Sarkar AA, Banerjee-Basu S (2019) A multifaceted approach for analyzing complex phenotypic data in rodent models of autism. Molecular Autism 10:11.

de la Torre-Ubieta L, Won H, Stein JL, Geschwind DH (2016) Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. Nat Med 22:345–361.

de Pommery J, Roudier F, Menétrey D (1984) Postsynaptic fibers reaching the dorsal column nuclei in the rat. Neurosci Lett 50:319–323.

Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L (2011) Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. Nat Rev Neurosci 12:139–153.

Deng P, Klyachko VA (2016) Genetic upregulation of BK channel activity normalizes multiple synaptic and circuit defects in a mouse model of fragile X syndrome. The Journal of Physiology 594:83–97.

Deng P-Y, Carlin D, Oh YM, Myrick LK, Warren ST, Cavalli V, Klyachko VA (2019) Voltage-Independent SK-Channel Dysfunction Causes Neuronal Hyperexcitability in the Hippocampus of Fmr1 Knock-Out Mice. J Neurosci 39:28–43.

Deng P-Y, Klyachko VA (2021) Channelopathies in fragile X syndrome. Nat Rev Neurosci 22:275–289.

Deng P-Y, Rotman Z, Blundon JA, Cho Y, Cui J, Cavalli V, Zakharenko SS, Klyachko VA (2013) FMRP Regulates Neurotransmitter Release and Synaptic Information Transmission by Modulating Action Potential Duration via BK Channels. Neuron 77:696–711.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq J-P, Mandel J-L (1993) The FMR–1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat Genet 4:335–340.

D'Hulst C, De Geest N, Reeve SP, Van Dam D, De Deyn PP, Hassan BA, Kooy RF (2006) Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. Brain Res 1121:238–245.

D'Hulst C, Heulens I, Van der Aa N, Goffin K, Koole M, Porke K, Van De Velde M, Rooms L, Van Paesschen W, Van Esch H, Van Laere K, Kooy RF (2015) Positron Emission Tomography (PET) Quantification of GABAA Receptors in the Brain of Fragile X Patients. PLoS One 10:e0131486.

Ding Q, Sethna F, Wang H (2014) Behavioral analysis of male and female Fmr1 knockout mice on C57BL/6 background. Behavioural Brain Research 271:72–78.

Dougherty KJ, Sawchuk MA, Hochman S (2005) Properties of Mouse Spinal Lamina I GABAergic Interneurons. Journal of Neurophysiology 94:3221–3227.

Duan B, Cheng L, Bourane S, Britz O, Padilla C, Garcia-Campmany L, Krashes M, Knowlton W, Velasquez T, Ren X, Ross S, Lowell BB, Wang Y, Goulding M, Ma Q (2014) Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. Cell 159:1417–1432.

Duvekot J, van der Ende J, Verhulst FC, Slappendel G, van Daalen E, Maras A, Greaves-Lord K (2017) Factors influencing the probability of a diagnosis of autism spectrum disorder in girls versus boys. Autism 21:646–658.

El Idrissi A, Ding X-H, Scalia J, Trenkner E, Brown WT, Dobkin C (2005) Decreased GABAA receptor expression in the seizure-prone fragile X mouse. Neuroscience Letters 377:141–146.

Eliez S (2001) Brain anatomy, gender and IQ in children and adolescents with fragile X syndrome. Brain 124:1610–1618.

Emerson RW et al. (2017) Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age. Sci Transl Med 9:eaag2882.

Estes A, Zwaigenbaum L, Gu H, St John T, Paterson S, Elison JT, Hazlett H, Botteron K, Dager SR, Schultz RT, Kostopoulos P, Evans A, Dawson G, Eliason J, Alvarez S, Piven J, IBIS network (2015) Behavioral, cognitive, and adaptive development in infants with autism spectrum disorder in the first 2 years of life. J Neurodev Disord 7:24.

Falcão M, Monteiro P, Jacinto L (2024) Tactile sensory processing deficits in genetic mouse models of autism spectrum disorder. Journal of Neurochemistry 168:2105–2123.

Faraone SV, Larsson H (2019) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry 24:562–575.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Thuras PD (2009) GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. J Autism Dev Disord 39:223–230.

Ferraguto C, Piquemal-Lagoueillat M, Lemaire V, Moreau MM, Trazzi S, Uguagliati B, Ciani E, Bertrand SS, Louette E, Bontempi B, Pietropaolo S (2024) Therapeutic efficacy of the BKCa channel opener chlorzoxazone in a mouse model of Fragile X syndrome. Neuropsychopharmacol 49:2032–2041.

Ferrini F, Perez-Sanchez J, Ferland S, Lorenzo L-E, Godin AG, Plasencia-Fernandez I, Cottet M, Castonguay A, Wang F, Salio C, Doyon N, Merighi A, De Koninck Y (2020) Differential chloride homeostasis in the spinal dorsal horn locally shapes synaptic metaplasticity and modality-specific sensitization. Nat Commun 11:3935.

Fetit R, Hillary RF, Price DJ, Lawrie SM (2021) The neuropathology of autism: A systematic review of post-mortem studies of autism and related disorders. Neuroscience & Biobehavioral Reviews 129:35–62.

Filice F, Vörckel KJ, Sungur AÖ, Wöhr M, Schwaller B (2016) Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. Mol Brain 9:10.

Foss-Feig JH, Tadin D, Schauder KB, Cascio CJ (2013) A substantial and unexpected enhancement of motion perception in autism. J Neurosci 33:8243–8249.

Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H (1998) Changes in intracellular Ca2+ induced by GABAA receptor activation and reduction in Cl- gradient in neonatal rat neocortex. J Neurophysiol 79:439–446.

Gandal MJ et al. (2018) Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder. Science 362:eaat8127.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. Cell 105:521–532.

Gantois I, Vandesompele J, Speleman F, Reyniers E, D'Hooge R, Severijnen L-A, Willemsen R, Tassone F, Kooy RF (2006) Expression profiling suggests underexpression of the GABA(A) receptor subunit delta in the fragile X knockout mouse model. Neurobiol Dis 21:346–357.

Gaona VA (2024) [Etiology of autism]. Medicina (B Aires) 84 Suppl 1:31–36.

Gauducheau M, Lemaire-Mayo V, D'Amato FR, Oddi D, Crusio WE, Pietropaolo S (2017) Age-specific autistic-like behaviors in heterozygous Fmr1 -KO female mice. Autism Research 10:1067–1078.

Genovese A, Butler MG (2023) The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations. Genes 14:677.

Ghamdi K, AlMusailhi J (2024) Attention-deficit Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder: Towards Better Diagnosis and Management. Med Arch 78:159.

Gholizadeh S, Halder SK, Hampson DR (2015) Expression of fragile X mental retardation protein in neurons and glia of the developing and adult mouse brain. Brain Research 1596:22–30.

Gibson JR, Bartley AF, Hays SA, Huber KM (2008) Imbalance of Neocortical Excitation and Inhibition and Altered UP States Reflect Network Hyperexcitability in the Mouse Model of Fragile X Syndrome. Journal of Neurophysiology 100:2615–2626.

Giesler GJ, Nahin RL, Madsen AM (1984) Postsynaptic dorsal column pathway of the rat. I. Anatomical studies. J Neurophysiol 51:260–275.

Gobel S (1978) Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). J Comp Neurol 180:395–413.

Goel A, Cantu DA, Guilfoyle J, Chaudhari GR, Newadkar A, Todisco B, De Alba D, Kourdougli N, Schmitt LM, Pedapati E, Erickson CA, Portera-Cailliau C (2018) Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. Nat Neurosci 21:1404–1411.

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.

Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. Nature 425:917–925.

Gothelf D, Furfaro JA, Hoeft F, Eckert MA, Hall SS, O'Hara R, Erba HW, Ringel J, Hayashi KM, Patnaik S, Golianu B, Kraemer HC, Thompson PM, Piven J, Reiss AL (2008) Neuroanatomy of fragile X syndrome is associated with aberrant behavior and the fragile X mental retardation protein (FMRP). Ann Neurol 63:40–51.

Graham BA, Brichta AM, Callister RJ (2008) Recording temperature affects the excitability of mouse superficial dorsal horn neurons, in vitro. J Neurophysiol 99:2048–2059.

Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. The Journal of Physiology 540:189–207.

Gutierrez-Mecinas M, Bell AM, Shepherd F, Polgár E, Watanabe M, Furuta T, Todd AJ (2019) Expression of cholecystokinin by neurons in mouse spinal dorsal horn. J Comp Neurol 527:1857–1871.

Gutierrez-Mecinas M, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ (2016) A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I-III of the mouse spinal cord. Mol Pain 12:1744806916629065.

Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Hazlett HC, Bailey DB, Moine H, Kooy RF, Tassone F, Gantois I, Sonenberg N, Mandel JL, Hagerman PJ (2017) Fragile X syndrome. Nat Rev Dis Primers 3:17065.

Hantman AW, Van Den Pol AN, Perl ER (2004) Morphological and Physiological Features of a Set of Spinal Substantia Gelatinosa Neurons Defined by Green Fluorescent Protein Expression. J Neurosci 24:836–842.

Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, La Manno G, Sharma N, Borgius L, Kiehn O, Lagerström MC, Linnarsson S, Ernfors P (2018) Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. Nat Neurosci 21:869–880.

Hashemi E, Ariza J, Rogers H, Noctor SC, Martínez-Cerdeño V (2017) The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. Cereb Cortex 27:1931–1943.

Havdahl A, Bishop S (2019) Heterogeneity in prevalence of co-occurring psychiatric conditions in autism. The Lancet Psychiatry 6:794–795.

Hazen EP, Stornelli JL, O'Rourke JA, Koesterer K, McDougle CJ (2014) Sensory symptoms in autism spectrum disorders. Harv Rev Psychiatry 22:112–124.

Hazlett HC, Poe MD, Lightbody AA, Styner M, MacFall JR, Reiss AL, Piven J (2012) Trajectories of Early Brain Volume Development in Fragile X Syndrome and Autism. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry 51:921–933.

He CX, Cantu DA, Mantri SS, Zeiger WA, Goel A, Portera-Cailliau C (2017) Tactile Defensiveness and Impaired Adaptation of Neuronal Activity in the Fmr1 Knock-Out Mouse Model of Autism. J Neurosci 37:6475–6487.

He Q, Nomura T, Xu J, Contractor A (2014) The Developmental Switch in GABA Polarity Is Delayed in Fragile X Mice. J Neurosci 34:446–450.

He Y, Li J, Zheng W, Liu J, Dong Z, Yang L, Tang S, Zou Y, Gao T, Yang Y, Mo Z, Wang S, He Y, Tang C, Luo J, Zhao J, Guo G, Li H, Xiao L (2025) Hypomyelination in autism-associated neuroligin-3 mutant mice impairs parvalbumin interneuron excitability, gamma oscillations, and sensory discrimination. Nat Commun 16:6382.

Hébert B, Pietropaolo S, Même S, Laudier B, Laugeray A, Doisne N, Quartier A, Lefeuvre S, Got L, Cahard D, Laumonnier F, Crusio WE, Pichon J, Menuet A, Perche O, Briault S (2014) Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1KO mice by a BKCa channel opener molecule. Orphanet J Rare Dis 9:124.

Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkühler J (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. The Journal of Physiology 560:249–266.

Heintz N (2001) Bac to the future: The use of bac transgenic mice for neuroscience research. Nat Rev Neurosci 2:861–870.

Heulens I, Suttie M, Postnov A, De Clerck N, Perrotta CS, Mattina T, Faravelli F, Forzano F, Frank Kooy R, Hammond P (2013) Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man. Eur J Hum Genet 21:816–823.

Hirota T, King BH (2023) Autism Spectrum Disorder: A Review. JAMA 329:157.

Hoeft F, Lightbody AA, Hazlett HC, Patnaik S, Piven J, Reiss AL (2008) Morphometric Spatial Patterns Differentiating Boys With Fragile X Syndrome, Typically Developing Boys, and Developmentally Delayed Boys Aged 1 to 3 Years. Arch Gen Psychiatry 65:1087.

Hours C, Recasens C, Baleyte J-M (2022) ASD and ADHD Comorbidity: What Are We Talking About? Front Psychiatry 13:837424.

Hu H-J, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RW (2006) The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. Neuron 50:89–100.

Huang J, Polgár E, Solinski HJ, Mishra SK, Tseng P-Y, Iwagaki N, Boyle KA, Dickie AC, Kriegbaum MC, Wildner H, Zeilhofer HU, Watanabe M, Riddell JS, Todd AJ, Hoon MA (2018) Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. Nat Neurosci 21:707–716.

Hughes DI, Sikander S, Kinnon CM, Boyle KA, Watanabe M, Callister RJ, Graham BA (2012) Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. The Journal of Physiology 590:3927–3951.

Hughes DI, Todd AJ (2020) Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. Neurotherapeutics 17:874–885.

Huguet G, Ey E, Bourgeron T (2013) The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. Annual Review of Genomics and Human Genetics 14:191–213.

Huzard D, Oliva G, Marias M, Granat C, Soubeyre V, do Nascimento Pereira G, Negm A, Grellier G, Devaux J, Bourinet E, François A (2025) Primary sensory neuron dysfunction underlying mechanical itch hypersensitivity in a Shank3 mouse model of autism. Transl Psychiatry 15:259.

Huzard D, Martin M, Maingret F, Chemin J, Jeanneteau F, Mery P-F, Fossat P, Bourinet E, François A (2022) The impact of C-tactile low-threshold mechanoreceptors on affective touch and social interactions in mice. Science Advances 8:eabo7566.

Ikeda M, Toyoda H, Yamada J, Okabe A, Sato K, Hotta Y, Fukuda A (2003) Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl- homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus. Brain Res 984:149–159.

Ismail FY, Shapiro BK (2019) What are neurodevelopmental disorders? Current Opinion in Neurology 32:611–616.

Iwagaki N, Garzillo F, Polgár E, Riddell JS, Todd AJ (2013) Neurochemical Characterisation of Lamina II Inhibitory Interneurons that Express GFP in the PrP-GFP Mouse. Mol Pain 9:1744-8069-9–56.

Jänig W (2018) Peripheral thermoreceptors in innocuous temperature detection. In: Handbook of Clinical Neurology, pp 47–56. Elsevier. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444639127000023 [Accessed October 6, 2025].

Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. Human Molecular Genetics 13:159–170.

Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu C-C, Kopke RD, Wu J-Y (2003) Demonstration of functional coupling between γ-aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:4293–4298.

Johansson RS, Vallbo AB (1979) Detection of tactile stimuli. Thresholds of afferent units related to psychophysical thresholds in the human hand. J Physiol 297:405–422.

Johansson RS, Vallbo AB (1980) Spatial properties of the population of mechanoreceptive units in the glabrous skin of the human hand. Brain Res 184:353–366.

Johnson KO, Hsiao SS (1992) Neural mechanisms of tactual form and texture perception. Annual Review of Neuroscience 15:227–250.

Johnson KO, Yoshioka T, Vega-Bermudez F (2000) Tactile functions of mechanoreceptive afferents innervating the hand. J Clin Neurophysiol 17:539–558.

Juarez P, Martínez Cerdeño V (2022) Parvalbumin and parvalbumin chandelier interneurons in autism and other psychiatric disorders. Front Psychiatry 13 Available at: https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsyt.2022.913550/full [Accessed October 21, 2025].

Juczewski K, von Richthofen H, Bagni C, Celikel T, Fisone G, Krieger P (2016) Somatosensory map expansion and altered processing of tactile inputs in a mouse model of fragile X syndrome. Neurobiology of Disease 96:201–215.

Kalinowska M, Van Der Lei MB, Kitiashvili M, Mamcarz M, Oliveira MM, Longo F, Klann E (2022) Deletion of Fmr1 in parvalbumin-expressing neurons results in dysregulated translation and selective behavioral deficits associated with fragile X syndrome. Molecular Autism 13:29.

Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. Nervous Child 2:217–250.

Katusic MZ, Myers SM, Weaver AL, Voigt RG (2021) IQ in Autism Spectrum Disorder: A Population-Based Birth Cohort Study. Pediatrics 148 Available at: https://publications.aap.org/pediatrics/article/148/6/e2020049899/183390/IQ-in-Autism-Spectrum-Disorder-A-Population-Based [Accessed September 30, 2025].

Kaufmann WE, Kidd SA, Andrews HF, Budimirovic DB, Esler A, Haas-Givler B, Stackhouse T, Riley C, Peacock G, Sherman SL, Brown WT, Berry-Kravis E (2017) Autism Spectrum Disorder in Fragile X Syndrome: Cooccurring Conditions and Current Treatment. Pediatrics 139:S194–S206.

Kazdoba TM, Leach PT, Silverman JL, Crawley JN (2014) Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse. IRDR 3:118–133.

Kern JK, Trivedi MH, Garver CR, Grannemann BD, Andrews AA, Savla JS, Johnson DG, Mehta JA, Schroeder JL (2006) The pattern of sensory processing abnormalities in autism. Autism 10:480–494.

Kidd SA, Lachiewicz A, Barbouth D, Blitz RK, Delahunty C, McBrien D, Visootsak J, Berry-Kravis E (2014) Fragile X Syndrome: A Review of Associated Medical Problems. Pediatrics 134:995–1005.

Knibestöl M (1973) Stimulus—response functions of rapidly adapting mechanoreceptors in the human glabrous skin area. J Physiol 232:427–452.

Knickmeyer R, Baron-Cohen S, Raggatt P, Taylor K (2005) Foetal testosterone, social relationships, and restricted interests in children. J Child Psychol Psychiatry 46:198–210.

Kolata SM, Nakao K, Jeevakumar V, Farmer-Alroth EL, Fujita Y, Bartley AF, Jiang SZ, Rompala GR, Sorge RE, Jimenez DV, Martinowich K, Mateo Y, Hashimoto K, Dobrunz LE, Nakazawa K (2018) Neuropsychiatric Phenotypes Produced by GABA Reduction in Mouse Cortex and Hippocampus. Neuropsychopharmacol 43:1445–1456.

Kourdougli N, Suresh A, Liu B, Juarez P, Lin A, Chung DT, Graven Sams A, Gandal MJ, Martínez-Cerdeño V, Buonomano DV, Hall BJ, Mombereau C, Portera-Cailliau C (2023) Improvement of sensory deficits in fragile X mice by increasing cortical interneuron activity after the critical period. Neuron 111:2863-2880.e6.

Kshatri A, Cerrada A, Gimeno R, Bartolomé-Martín D, Rojas P, Giraldez T (2020) Differential regulation of BK channels by fragile X mental retardation protein. Journal of General Physiology 152:e201912502.

Kuner T, Augustine GJ (2000) A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. Neuron 27:447–459.

Lai M-C, Kassee C, Besney R, Bonato S, Hull L, Mandy W, Szatmari P, Ameis SH (2019) Prevalence of co-occurring mental health diagnoses in the autism population: a systematic review and meta-analysis. Lancet Psychiatry 6:819–829.

Lai M-C, Lombardo MV, Auyeung B, Chakrabarti B, Baron-Cohen S (2015) Sex/Gender Differences and Autism: Setting the Scene for Future Research. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry 54:11–24.

Lane AE, Young RL, Baker AEZ, Angley MT (2010) Sensory processing subtypes in autism: association with adaptive behavior. J Autism Dev Disord 40:112–122.

Lee SM, Choi Y, Kim D, Jeong HJ, Do YH, Jung S, Lee B, Choi HJ, Kim S, Oh J-M, Jeon S, Han J, Kim Y (2025) Developmental deficits, synapse and dendritic abnormalities in a Clcn4 KO autism mice model: endophenotypic target for ASD. Transl Psychiatry 15:28.

Leem JW, Willis WD, Chung JM (1993) Cutaneous sensory receptors in the rat foot. Journal of Neurophysiology Available at: https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jn.1993.69.5.1684 [Accessed October 3, 2025].

Leitner Y (2014) The Co-Occurrence of Autism and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children " What Do We Know? Front Hum Neurosci 8 Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2014.00268/abstract [Accessed September 27, 2025].

Lemonnier, Degrez, Tyzio, josse, Grandgeorges (2012) A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children | Translational Psychiatry. Available at: https://www.nature.com/articles/tp2012124 [Accessed October 15, 2025].

Li L, Rutlin M, Abraira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. Cell 147:1615–1627.

Lichtenstein P, Carlström E, Råstam M, Gillberg C, Anckarsäter H (2010) The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. Am J Psychiatry 167:1357–1363.

Liljencrantz J, Olausson H (2014) Tactile C fibers and their contributions to pleasant sensations and to tactile allodynia. Front Behav Neurosci 8:37.

Lima D, Coimbra A (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. J Comp Neurol 244:53–71.

Liu M-Z, Chen X-J, Liang T-Y, Li Q, Wang M, Zhang X-Y, Li Y-Z, Sun Q, Sun Y-G (2019) Synaptic control of spinal GRPR+ neurons by local and long-range inhibitory inputs. Proceedings of the National Academy of Sciences 116:27011–27017.

Löken LS, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Olausson H (2009) Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. Nat Neurosci 12:547–548.

Lord C (2012) Autism diagnostic observation schedule: ADOS-2.

Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, Jones EJH, Jones RM, Pickles A, State MW, Taylor JL, Veenstra-VanderWeele J (2020) Autism spectrum disorder. Nat Rev Dis Primers 6:5.

Lordan R, Storni C, De Benedictis CA (2021) Autism Spectrum Disorders: Diagnosis and Treatment. In: Autism Spectrum Disorders (Grabrucker AM, ed). Brisbane (AU): Exon Publications. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573609/ [Accessed September 23, 2025].

Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. J Neurosci 23:8752–8758.

Lu Y, Perl ER (2005) Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II). J Neurosci 25:3900–3907.

Lubs HA (1969) A marker X chromosome. Am J Hum Genet 21:231–244.

Lutchmaya S, Baron-Cohen S, Raggatt P (2001) Foetal testosterone and vocabulary size in 18- and 24-month-old infants. Infant Behavior and Development 24:418–424.

Lutchmaya S, Baron-Cohen S, Raggatt P (2002) Foetal testosterone and eye contact in 12-month-old human infants. Infant Behavior & Development 25:327–335.

Lynn B (1971) The form and distribution of the receptive fields of Pacinian corpuscles found in and around the cat's large foot pad. J Physiol 217:755–771.

Lyons JI, Kerr GR, Mueller PW (2015) Fragile X Syndrome: Scientific Background and Screening Technologies. The Journal of Molecular Diagnostics 17:463–471.

Ma DQ, Whitehead PL, Menold MM, Martin ER, Ashley-Koch AE, Mei H, Ritchie MD, Delong GR, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML, Hussman JP, Gilbert JR, Pericak-Vance MA (2005) Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism. Am J Hum Genet 77:377–388.

Ma Y, Chen J, Chen C, Wei B, Liu X (2024) Suppression of HCN channels in the spinal dorsal horn restores KCC2 expression and attenuates diabetic neuropathic pain. Neuroscience Letters 822:137626.

Marco EJ, Hinkley LBN, Hill SS, Nagarajan SS (2011) Sensory Processing in Autism: A Review of Neurophysiologic Findings.

Marco EJ, Khatibi K, Hill SS, Siegel B, Arroyo MS, Dowling AF, Neuhaus JM, Sherr EH, Hinkley LNB, Nagarajan SS (2012) Children With Autism Show Reduced Somatosensory Response: An MEG Study. Autism Research 5:340–351.

Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, Zoghbi HY (2009) Merkel cells are essential for light-touch responses. Science 324:1580–1582.

Martin JP, Bell J (1943) A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. J Neurol Psychiatry 6:154–157.

Martin LJ, Poulson SJ, Mannan E, Sivaselvachandran S, Cho M, Setak F, Chan C (2022) Altered nociceptive behavior and emotional contagion of pain in mouse models of autism. Genes Brain and Behavior 21:e12778.

Masuda F, Nakajima S, Miyazaki T, Yoshida K, Tsugawa S, Wada M, Ogyu K, Croarkin PE, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Mimura M, Noda Y (2019) Motor cortex excitability and inhibitory imbalance in autism spectrum disorder assessed with transcranial magnetic stimulation: a systematic review. Transl Psychiatry 9:110.

Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A, Morris R (2007) Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. The Journal of Physiology 584:521–533.

McCarthy DM, Vied C, Trupiano MX, Canekeratne AJ, Wang Y, Schatschneider C, Bhide PG (2024) Behavioral, neurotransmitter and transcriptomic analyses in male and female Fmr1 KO mice. Front Behav Neurosci 18:1458502.

McDuffie A, Thurman AJ, Hagerman RJ, Abbeduto L (2015) Symptoms of Autism in Males with Fragile X Syndrome: A Comparison to Nonsyndromic ASD Using Current ADI-R Scores. J Autism Dev Disord 45:1925–1937.

McGlone F, Wessberg J, Olausson H (2014) Discriminative and Affective Touch: Sensing and Feeling. Neuron 82:737–755.

McNaughton CH, Moon J, Strawderman MS, Maclean KN, Evans J, Strupp BJ (2008) Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. Behavioral Neuroscience 122:293–300.

Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. Neuroscience 102:527–540.

Melzack R, Wall PD (1965) Pain Mechanisms: A New Theory. Science 150:971–979.

Mientjes EJ, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-Westerveld M, Severijnen L, Rifé M, Willemsen R, Nelson DL, Oostra BA (2006) The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. Neurobiology of Disease 21:549–555.

Mines MA, Yuskaitis CJ, King MK, Beurel E, Jope RS (2010) GSK3 Influences Social Preference and Anxiety-Related Behaviors during Social Interaction in a Mouse Model of Fragile X Syndrome and Autism Smith MA, ed. PLoS ONE 5:e9706.

Mineur YS, Sluyter F, De Wit S, Oostra BA, Crusio WE (2002) Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse. Hippocampus 12:39–46.

Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A (2017) Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. Molecular Autism 8:13.

Möhrle D, Fernández M, Peñagarikano O, Frick A, Allman B, Schmid S (2020) What we can learn from a genetic rodent model about autism. Neurosci Biobehav Rev 109:29–53.

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. Neuron 19:849–861.

Morin F (1955) A new spinal pathway for cutaneous impulses. Am J Physiol 183:245–252.

Morris-Rosendahl DJ, Crocq M-A (2020) Neurodevelopmental disorders—the history and future of a diagnosticconcept. Dialogues in Clinical Neuroscience 22:65–72.

Mostofsky SH, Mazzocco MM, Aakalu G, Warsofsky IS, Denckla MB, Reiss AL (1998) Decreased cerebellar posterior vermis size in fragile X syndrome: correlation with neurocognitive performance. Neurology 50:121–130.

Moyses-Oliveira M, Yadav R, Erdin S, Talkowski ME (2020) New gene discoveries highlight functional convergence in autism and related neurodevelopmental disorders. Current Opinion in Genetics & Development 65:195–206.

Mutluer T, Aslan Genç H, Özcan Morey A, Yapici Eser H, Ertinmaz B, Can M, Munir K (2022) Population-Based Psychiatric Comorbidity in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. Front Psychiatry 13:856208.

Nelson NA, Wang X, Cook D, Carey EM, Nimmerjahn A (2019) Imaging spinal cord activity in behaving animals. Exp Neurol 320:112974.

Niu M, Han Y, Dy ABC, Du J, Jin H, Qin J, Zhang J, Li Q, Hagerman RJ (2017) Autism Symptoms in Fragile X Syndrome. J Child Neurol 32:903–909.

Nullmeier S, Elmers C, D'Hanis W, Sandhu KVK, Stork O, Yanagawa Y, Panther P, Schwegler H (2020) Glutamic acid decarboxylase 67 haplodeficiency in mice: consequences of postweaning social isolation on behavior and changes in brain neurochemical systems. Brain Struct Funct 225:1719–1742.

Olmos-Serrano JL, Paluszkiewicz SM, Martin BS, Kaufmann WE, Corbin JG, Huntsman MM (2010) Defective GABAergic Neurotransmission and Pharmacological Rescue of Neuronal Hyperexcitability in the Amygdala in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. J Neurosci 30:9929–9938.

Orefice LL, Mosko JR, Morency DT, Wells MF, Tasnim A, Mozeika SM, Ye M, Chirila AM, Emanuel AJ, Rankin G, Fame RM, Lehtinen MK, Feng G, Ginty DD (2019) Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. Cell 178:867-886.e24.

Orefice LL, Zimmerman AL, Chirila AM, Sleboda SJ, Head JP, Ginty DD (2016) Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. Cell 166:299–313.

Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to gaba than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci 3:715–727.

Paluszkiewicz SM, Martin BS, Huntsman MM (2011) Fragile X Syndrome: The GABAergic System and Circuit Dysfunction. Dev Neurosci 33:349–364.

Pan P-Y, Bölte S (2020) The association between ADHD and physical health: a co-twin control study. Sci Rep 10:22388.

Pardo CA, Eberhart CG (2007) The Neurobiology of Autism. Brain Pathology 17:434–447.

Parenti I, Rabaneda LG, Schoen H, Novarino G (2020) Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. Trends in Neurosciences 43:608–621.

Park HR, Lee JM, Moon HE, Lee DS, Kim B-N, Kim J, Kim DG, Paek SH (2016) A Short Review on the Current Understanding of Autism Spectrum Disorders. Exp Neurobiol 25:1–13.

Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002a) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell 108:705–715.

Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002b) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. Science 296:2046–2049.

Peirs C, Seal RP (2016) Neural circuits for pain: Recent advances and current views. Science 354:578–584.

Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E, Geschwind DH (2011) Absence of CNTNAP2 Leads to Epilepsy, Neuronal Migration Abnormalities, and Core Autism-Related Deficits. Cell 147:235–246.

Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST (2007) The Pathophysiology of Fragile X Syndrome. Annu Rev Genom Hum Genet 8:109–129.

Perl ER (2007) Ideas about pain, a historical view. Nat Rev Neurosci 8:71–80.

Perry MJ, Lawson SN (1998) Differences in expression of oligosaccharides, neuropeptides, carbonic anhydrase and neurofilament in rat primary afferent neurons retrogradely labelled via skin, muscle or visceral nerves. Neuroscience 85:293–310.

Petitjean H, Bourojeni FB, Tsao D, Davidova A, Sotocinal SG, Mogil JS, Kania A, Sharif-Naeini R (2019) Recruitment of Spinoparabrachial Neurons by Dorsal Horn Calretinin Neurons. Cell Reports 28:1429-1438.e4.

Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan L-Y, Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R (2015) Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. Cell Reports 13:1246–1257.

Pietropaolo S, Guilleminot A, Martin B, D'Amato FR, Crusio WE (2011) Genetic-Background Modulation of Core and Variable Autistic-Like Symptoms in Fmr1 Knock-Out Mice Cushing B, ed. PLoS ONE 6:e17073.

Piton A, Jouan L, Rochefort D, Dobrzeniecka S, Lachapelle K, Dion PA, Gauthier J, Rouleau GA (2013) Analysis of the effects of rare variants on splicing identifies alterations in GABAA receptor genes in autism spectrum disorder individuals. Eur J Hum Genet 21:749–756.

Polgár E, Durrieux C, Hughes DI, Todd AJ (2013a) A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn. PLoS One 8:e78309.

Polgár E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ (1999) The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. Brain Res 833:71–80.

Polgár E, Sardella TCP, Tiong SYX, Locke S, Watanabe M, Todd AJ (2013b) Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. PAIN 154:2606.

Posserud M-B, Skretting Solberg B, Engeland A, Haavik J, Klungsøyr K (2021) Male to female ratios in autism spectrum disorders by age, intellectual disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. Acta Psychiatr Scand 144:635–646.

Prescott SA, De Koninck Y (2002) Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. J Physiol 539:817–836.

Prescott SA, Ma Q, De Koninck Y (2014) Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. Nat Neurosci 17:183–191.

Price TJ, Rashid MH, Millecamps M, Sanoja R, Entrena JM, Cervero F (2007) Decreased Nociceptive Sensitization in Mice Lacking the Fragile X Mental Retardation Protein: Role of mGluR1/5 and mTOR. J Neurosci 27:13958–13967.

Punnakkal P, Schoultz C, Haenraets K, Wildner H, Zeilhofer HU (2014) Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn. J Physiol 592:759–776.

Puskár Z, Polgár E, Todd AJ (2001) A population of large lamina I projection neurons with selective inhibitory input in rat spinal cord. Neuroscience 102:167–176.

Puts NAJ, Wodka EL, Tommerdahl M, Mostofsky SH, Edden RAE (2014) Impaired tactile processing in children with autism spectrum disorder. Journal of Neurophysiology 111:1803–1811.

Qiu H, Miraucourt LS, Petitjean H, Xu M, Theriault C, Davidova A, Soubeyre V, Poulen G, Lonjon N, Vachiery-Lahaye F, Bauchet L, Levesque-Damphousse P, Estall JL, Bourinet E, Sharif-Naeini R (2024) Parvalbumin gates chronic pain through the modulation of firing patterns in inhibitory neurons. Proc Natl Acad Sci USA 121:e2403777121.

Ramaswami G, Won H, Gandal MJ, Haney J, Wang JC, Wong CCY, Sun W, Prabhakar S, Mill J, Geschwind DH (2020) Integrative genomics identifies a convergent molecular subtype that links epigenomic with transcriptomic differences in autism. Nat Commun 11:4873.

Ramírez-López A, Pastor A, De La Torre R, La Porta C, Ozaita A, Cabañero D, Maldonado R (2021) Role of the endocannabinoid system in a mouse model of Fragile X undergoing neuropathic pain. European Journal of Pain 25:1316–1328.

Ranade SS, Woo S-H, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qiu Z, Wood JN, Lewin GR, Patapoutian A (2014) Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. Nature 516:121–125.

Redcay E, Courchesne E (2005) When Is the Brain Enlarged in Autism? A Meta-Analysis of All Brain Size Reports. Biological Psychiatry 58:1–9.

Reiss AL, Abrams MT, Greenlaw R, Freund L, Denckla MB (1995) Neurodevelopmental effects of the FMR-1 full mutation in humans. Nat Med 1:159–167.

Reiss AL, Lee J, Freund L (1994) Neuroanatomy of fragile X syndrome: the temporal lobe. Neurology 44:1317–1324.

Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. J Comp Neurol 96:414–495.

Ribeiro S, Sherrard RM (2023) Cerebellum and neurodevelopmental disorders: RORα is a unifying force. Front Cell Neurosci 17 Available at: https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2023.1108339/full [Accessed September 27, 2025].

Ribeiro-Da-Silva A, Coimbra A (1982) Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I–III of the rat spinal cord. J of Comparative Neurology 209:176–186.

Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y (2008) Morphological and Neurochemical Organization of the Spinal Dorsal Horn. In: The Senses: A Comprehensive Reference, pp 279–310. Elsevier. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123708809001638 [Accessed October 6, 2025].

Ribeiro-da-Silva A, Tagari P, Cuello AC (1989) Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: a quantitative study. J Comp Neurol 281:497–415.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K+/Cl− co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature 397:251–255.

Robertson CE, Baron-Cohen S (2017) Sensory perception in autism. Nat Rev Neurosci 18:671–684.

Robertson CE, Ratai E-M, Kanwisher N (2016) Reduced GABAergic Action in the Autistic Brain. Current Biology 26:80–85.

Rogers SJ, Hepburn S, Wehner E (2003) Parent reports of sensory symptoms in toddlers with autism and those with other developmental disorders. J Autism Dev Disord 33:631–642.

Ronan JL, Wu W, Crabtree GR (2013) From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. Nat Rev Genet 14:347–359.

Rosenberg A, Patterson JS, Angelaki DE (2015) A computational perspective on autism. Proc Natl Acad Sci U S A 112:9158–9165.

Roth FC, Draguhn A (2012) GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. Neural Plasticity 2012:805830.

Roth FC, Hu H (2020) An axon-specific expression of HCN channels catalyzes fast action potential signaling in GABAergic interneurons. Nat Commun 11:2248.

Roudaut Y, Lonigro A, Coste B, Hao J, Delmas P, Crest M (2012) Touch sense: Functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. Channels 6:234–245.

Ruscheweyh R, Sandkühler J (2002) Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. J Physiol 541:231–244.

Russ DE, Cross RBP, Li L, Koch SC, Matson KJE, Yadav A, Alkaslasi MR, Lee DI, Le Pichon CE, Menon V, Levine AJ (2021) A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. Nat Commun 12:5722.

Rustioni A, Kaufman AB (1977) Identification of cells of origin of non-primary afferents to the dorsal column nuclei of the cat. Exp Brain Res 27 Available at: http://link.springer.com/10.1007/BF00234821 [Accessed October 10, 2025].

Rutherford M, McKenzie K, Johnson T, Catchpole C, O'Hare A, McClure I, Forsyth K, McCartney D, Murray A (2016) Gender ratio in a clinical population sample, age of diagnosis and duration of assessment in children and adults with autism spectrum disorder. Autism 20:628–634.

Rutlin M, Ho C-Y, Abraira VE, Cassidy C, Bai L, Woodbury CJ, Ginty DD (2014) The Cellular and Molecular Basis of Direction Selectivity of Aδ-LTMRs. Cell 159:1640–1651.

Rutter M, LeCouteur, Lord C (2003) Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R).

Sabanov V, Braat S, D'Andrea L, Willemsen R, Zeidler S, Rooms L, Bagni C, Kooy RF, Balschun D (2017) Impaired GABAergic inhibition in the hippocampus of Fmr1 knockout mice. Neuropharmacology 116:71–81.

Sabariego-Navarro M, Fernández-Blanco A, Sierra C, Dierssen M (2022) Neurodevelopmental disorders: 2022 update. Free Neuropathology:8 Seiten.

Sanders SJ et al. (2012) De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. Nature 485:237–241.

Sanders SJ (2019) Next-Generation Sequencing in Autism Spectrum Disorder. Cold Spring Harb Perspect Med 9:a026872.

Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A (2014) The familial risk of autism. JAMA 311:1770–1777.

Sapey-Triomphe L-A, Lamberton F, Sonié S, Mattout J, Schmitz C (2019) Tactile hypersensitivity and GABA concentration in the sensorimotor cortex of adults with autism. Autism Res 12:562–575.

Sardella TCP, Polgár E, Garzillo F, Furuta T, Kaneko T, Watanabe M, Todd AJ (2011a) Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn. Mol Pain 7:76.

Sardella TCP, Polgár E, Watanabe M, Todd AJ (2011b) A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I–III of the rat spinal dorsal horn. Neuroscience 192:708–720.

Saré RM, Figueroa C, Lemons A, Loutaev I, Beebe Smith C (2019) Comparative Behavioral Phenotypes of Fmr1 KO, Fxr2 Het, and Fmr1 KO/Fxr2 Het Mice. Brain Sciences 9:13.

Sathyamurthy A, Johnson KR, Matson KJE, Dobrott CI, Li L, Ryba AR, Bergman TB, Kelly MC, Kelley MW, Levine AJ (2018) Massively Parallel Single Nucleus Transcriptional Profiling Defines Spinal Cord Neurons and Their Activity during Behavior. Cell Reports 22:2216–2225.

Sauer AK, Stanton JE, Hans S, Grabrucker AM (2021) Autism Spectrum Disorders: Etiology and Pathology. In: Autism Spectrum Disorders (Grabrucker AM, ed). Brisbane (AU): Exon Publications. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573613/ [Accessed September 23, 2025].

Schepers RJ, Ringkamp M (2010) Thermoreceptors and thermosensitive afferents. Neurosci Biobehav Rev 34:177–184.

Schoentgen B, Chatin E, Sallé H, Leroy M, Bonnet N, Défontaines B (2025) [Socioeconomic impact of neurodevelopmental disorders in France]. Encephale 51:557–562.

Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. Nature 462:651–655.

Selby L, Zhang C, Sun Q-Q (2007) Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. Neuroscience Letters 412:227–232.

Semelidou O, Gauvrit T, Vandromme C, Cornier A, Saint-Jean A, Feuvre YL, Ginger M, Frick A (2024) Disrupted stimulus encoding shapes tactile perception in autism. :2024.08.08.607129 Available at: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.08.607129v1 [Accessed October 1, 2025].

Serafini R, Valeyev AY, Barker JL, Poulter MO (1995) Depolarizing GABA-activated Cl- channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. J Physiol 488:371–386.

Sestan N, State MW (2018) Lost in Translation: Traversing the Complex Path from Genomics to Therapeutics in Autism Spectrum Disorder. Neuron 100:406–423.

Shahat ARS, Greco G (2021) The Economic Costs of Childhood Disability: A Literature Review. International Journal of Environmental Research and Public Health 18:3531.

Siemann JK, Veenstra-VanderWeele J, Wallace MT (2020) Approaches to Understanding Multisensory Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. Autism Research 13:1430–1449.

Smith KM, Boyle KA, Madden JF, Dickinson SA, Jobling P, Callister RJ, Hughes DI, Graham BA (2015) Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. J Physiol 593:4319–4339.

Snider WD, McMahon SB (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. Neuron 20:629–632.

Spencer CM, Alekseyenko O, Hamilton SM, Thomas AM, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2011) Modifying behavioral phenotypes in Fmr1 KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. Autism Research 4:40–56.

Stachowski NJ, Dougherty KJ (2021) Spinal Inhibitory Interneurons: Gatekeepers of Sensorimotor Pathways. International Journal of Molecular Sciences 22:2667.

Stephenson KG, Norris M, Butter EM (2023) Sex-Based Differences in Autism Symptoms in a Large, Clinically-Referred Sample of Preschool-Aged Children with ASD. J Autism Dev Disord 53:624–632.

Stone WL, Basit H, Shah M, Los E (2025) Fragile X Syndrome. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459243/ [Accessed September 26, 2025].

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell 112:819–829.

Styles M, Alsharshani D, Samara M, Alsharshani M, Khattab A, Qoronfleh MW, Al-Dewik N (2020) Risk factors, diagnosis, prognosis and treatment of autism. FBL 25:1682–1717.

Tandrup T (1995) Are the neurons in the dorsal root ganglion pseudounipolar? A comparison of the number of neurons and number of myelinated and unmyelinated fibres in the dorsal root. J Comp Neurol 357:341–347.

Tashima R, Koga K, Yoshikawa Y, Sekine M, Watanabe M, Tozaki-Saitoh H, Furue H, Yasaka T, Tsuda M (2021) A subset of spinal dorsal horn interneurons crucial for gating touch-evoked pain-like behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences 118:e2021220118.

Tasnim A, Alkislar I, Hakim R, Turecek J, Abdelaziz A, Orefice LL, Ginty DD (2024) The developmental timing of spinal touch processing alterations predicts behavioral changes in genetic mouse models of autism spectrum disorders. Nat Neurosci 27:484–496.

Tassone F, Hagerman RJ, Iklé DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, Oostra BA, Taylor AK (1999) FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. American Journal of Medical Genetics 84:250–261.

Thapar A, Cooper M, Rutter M (2017) Neurodevelopmental disorders. The Lancet Psychiatry 4:339–346.

Thomas AM, Bui N, Perkins JR, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2012) Group I metabotropic glutamate receptor antagonists alter select behaviors in a mouse model for fragile X syndrome. Psychopharmacology 219:47–58.

Thye MD, Bednarz HM, Herringshaw AJ, Sartin EB, Kana RK (2018) The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. Developmental Cognitive Neuroscience 29:151–167.

Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijsdijk F (2016) Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. Child Psychology Psychiatry 57:585–595.

Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. Nat Rev Neurosci 11:823–836.

Todd AJ (2017) Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. Mol Pain 13:1744806917693003.

Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. J Comp Neurol 296:496–505.

Tomchek SD, Dunn W (2007) Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. Am J Occup Ther 61:190–200.

Treffert DA (1970) Epidemiology of infantile autism. Arch Gen Psychiatry 22:431–438.

Turner-Brown LM, Baranek GT, Reznick JS, Watson LR, Crais ER (2013) The First Year Inventory: a longitudinal follow-up of 12-month-old to 3-year-old children. Autism 17:527–540.

Vallbo AB, Johansson RS (1984) Properties of cutaneous mechanoreceptors in the human hand related to touch sensation. Hum Neurobiol 3:3–14.

Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH (1992) Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. Neurosci Lett 148:6–10.

Van Der Aa N, Kooy RF (2020) GABAergic abnormalities in the fragile X syndrome. European Journal of Paediatric Neurology 24:100–104.

Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR (2017) Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. Acta Neuropathol 134:537–566.

Vogt D, Cho KKA, Shelton SM, Paul A, Huang ZJ, Sohal VS, Rubenstein JLR (2018) Mouse Cntnap2 and Human CNTNAP2 ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV+ Cortical Interneurons. Cerebral Cortex 28:3868–3879.

Volkmar FR, McPartland JC (2014) From Kanner to DSM-5: Autism as an Evolving Diagnostic Concept. Annu Rev Clin Psychol 10:193–212.

Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. Neuron 70:482–494.

Waldstein G, Mierau G, Ahmad R, Thibodeau SN, Hagerman RJ, Caldwell S (1987) Fragile X syndrome: skin elastin abnormalities. Birth Defects Orig Artic Ser 23:103–114.

WALL PD (1978) THE GATE CONTROL THEORY OF PAIN MECHANISMS: A RE-EXAMINATION AND RE-STATEMENT. Brain 101:1–18.

Wall PD, Merrill EG, Yaksh TL (1979) Responses of single units in laminae 2 and 3 of cat spinal cord. Brain Res 160:245–260.

Wang L-H, Ding W-Q, Sun Y-G (2022) Spinal ascending pathways for somatosensory information processing. Trends in Neurosciences 45:594–607.

Ward J (2019) Individual differences in sensory sensitivity: A synthesizing framework and evidence from normal variation and developmental conditions. Cognitive Neuroscience 10:139–157.

Whitlock A, Fulton K, Lai M-C, Pellicano E, Mandy W (2020) Recognition of Girls on the Autism Spectrum by Primary School Educators: An Experimental Study. Autism Research 13:1358–1372.

Williams AL, Gerling GJ, Wellnitz SA, Bourdon SM, Lumpkin EA (2010) Skin relaxation predicts neural firing rate adaptation in SAI touch receptors. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc 2010:6678–6681.

Willsey HR, Exner CRT, Xu Y, Everitt A, Sun N, Wang B, Dea J, Schmunk G, Zaltsman Y, Teerikorpi N, Kim A, Anderson AS, Shin D, Seyler M, Nowakowski TJ, Harland RM, Willsey AJ, State MW (2021) Parallel in vivo analysis of large-effect autism genes implicates cortical neurogenesis and estrogen in risk and resilience. Neuron 109:788-804.e8.

Wolff JJ, Swanson MR, Elison JT, Gerig G, Pruett JR, Styner MA, Vachet C, Botteron KN, Dager SR, Estes AM, Hazlett HC, Schultz RT, Shen MD, Zwaigenbaum L, Piven J, IBIS Network (2017) Neural circuitry at age 6 months associated with later repetitive behavior and sensory responsiveness in autism. Mol Autism 8:8.

Woo S-H, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A (2014) Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. Nature 509:622–626.

Woodbury CJ, Koerber HR (2007) Central and peripheral anatomy of slowly adapting type I low-threshold mechanoreceptors innervating trunk skin of neonatal mice. J Comp Neurol 505:547–561.

Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM (2004) Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. J Neurosci 24:6410–6415.

Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. Neuron 55:353–364.

Wu C, Sun D (2015) GABA receptors in brain development, function, and injury. Metab Brain Dis 30:367–379.

Yan QJ, Asafo-Adjei PK, Arnold HM, Brown RE, Bauchwitz RP (2004) A phenotypic and molecular characterization of the fmr1-tm1Cgr fragile X mouse. Genes Brain Behav 3:337–359.

Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. PAIN 151:475.

Zeidan J, Fombonne E, Scorah J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, Yusuf A, Shih A, Elsabbagh M (2022) Global prevalence of autism: A systematic review update. Autism Research 15:778–790.

Zeng Q, Li Y, Wu Y, Wu J, Xu K, Chen Y, Rao Y, Li N, Luo Y, Jiang C, Wu C, Wang Z (2025) Neuropeptide Y neurons mediate opioid-induced itch by disinhibiting GRP-GRPR microcircuits in the spinal cord. Nat Commun 16:7074.

Zhai J, Li X, Zhou Y, Fan L, Xia W, Wang X, Li Y, Hou M, Wang J, Wu L (2023) Correlation and predictive ability of sensory characteristics and social interaction in children with autism spectrum disorder. Front Psychiatry 14:1056051.

Zhang X (2015) Molecular sensors and modulators of thermoreception. Channels 9:73–81.

Zhang Y, Bonnan A, Bony G, Ferezou I, Pietropaolo S, Ginger M, Sans N, Rossier J, Oostra B, LeMasson G, Frick A (2014) Dendritic channelopathies contribute to neocortical and sensory hyperexcitability in Fmr1−/y mice. Nat Neurosci 17:1701–1709.

Zhao M-G, Toyoda H, Ko SW, Ding H-K, Wu L-J, Zhuo M (2005) Deficits in Trace Fear Memory and Long-Term Potentiation in a Mouse Model for Fragile X Syndrome. J Neurosci 25:7385–7392.

Zimmerman A, Bai L, Ginty DD (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. Science 346:950–954.

Zotterman Y (1939) Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. J Physiol 95:1–28.