



**HAL**  
open science

# Physiopathologie des déficits moteurs dans les troubles du spectre autistique : approche neuroanatomique dans deux modèles environnementaux

Obélia Haida

► **To cite this version:**

Obélia Haida. Physiopathologie des déficits moteurs dans les troubles du spectre autistique : approche neuroanatomique dans deux modèles environnementaux. Neurobiologie. Université de Poitiers, 2018. Français. NNT : 2018POIT2305 . tel-02062240

**HAL Id: tel-02062240**

**<https://theses.hal.science/tel-02062240>**

Submitted on 8 Mar 2019

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

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

# THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : n°524 Bio Santé

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

**Obélia HAÏDA**

\*\*\*\*\*

## **PHYSIOPATHOLOGIE DES DEFICITS MOTEURS DANS LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE : APPROCHE NEUROANATOMIQUE DANS DEUX MODELES ENVIRONNEMENTAUX**

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse : Pr. Mohamed JABER  
Co-Directeur : Dr. Pierre-Olivier FERNAGUT

\*\*\*\*\*

Soutenue le 7 Décembre 2018

devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

### **JURY**

Rapporteur	Sophie LAYE	Directrice de Recherche	INRA, Université Bordeaux 2
Rapporteur	Isabelle DUSART	Directrice de Recherche	Sorbonne Université
Examineur	Patrick VOURC'H	Professeur	Université de Tours
Examineur	Mohamed JABER	Professeur	Université de Poitiers
Examineur	Pierre-Olivier FERNAGUT	Directeur de Recherche	Université de Poitiers



## Table des matières

<b>Remerciements.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des tables.....</b>	<b>4</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>5</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>9</b>
<b>Partie 1 : Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>I. Les troubles du spectre autistique .....</b>	<b>15</b>
1. Définition.....	16
2. Comorbidités .....	20
3. Troubles moteurs.....	21
4. Epidémiologie .....	23
4.1 Chiffres.....	23
4.2 Répartition inégale selon le sexe .....	24
4.3 Impact socio-économique.....	26
5. Physiopathologie .....	27
5.1 Facteurs de risque.....	27
5.1.1 Facteurs de risque génétiques.....	29
5.1.1.1 Hérité .....	29
5.1.1.2 Formes monogéniques.....	30
5.1.1.3 Formes polygéniques.....	34
5.1.2 Facteurs de risque environnementaux .....	35
5.1.2.1 Vulnérabilité durant la période prénatale .....	35
5.1.2.2 Vulnérabilité pendant la période périnatale.....	37
5.1.2.3 Vulnérabilité postnatale.....	38
5.2 Facteurs protecteurs.....	40
6. Approches thérapeutiques .....	41
6.1 Approches pharmacologiques .....	41
6.2 Approches non pharmacologiques .....	42
<b>II. Modèles des troubles du spectre autistique chez le rongeur.....</b>	<b>44</b>
1. Modèles génétiques .....	45
1.1 Mutations de gènes syndromiques.....	47
1.2 Mutations de gènes de haute confiance/ de forte évidence.....	49
1.3 Mutations de gènes candidats.....	50
1.4 Mutations de gènes supposés.....	52
2. Modèles basés sur des facteurs de risque prénataux.....	52

2.1	Modèle d'exposition <i>in utero</i> à une substance pharmacologique.....	53
2.1.1	Intérêt pharmacologique de l'acide valproïque .....	53
2.1.2	Mécanismes d'action de l'acide valproïque .....	54
2.1.3	Toxicité de l'acide valproïque.....	55
2.1.4	Pertinence comme modèle des troubles du spectre autistique.....	56
2.2	Modèles associés à l'activation du système immunitaire maternel .....	59
2.2.1	Mécanisme d'action du poly I:C .....	60
2.2.2	Pertinence du modèle poly I:C .....	63
<b>III.</b>	<b>Régions cérébrales impliquées dans le contrôle moteur et leur contribution à la</b>	
	<b>physiopathologie des TSA.....</b>	<b>64</b>
1.	Le cervelet.....	64
1.1	Organisation anatomo-fonctionnelle .....	64
1.1.1	Organisation lobulaire .....	65
1.1.2	Anatomie du cortex cérébelleux.....	69
1.1.2.1	Les types neuronaux .....	69
1.1.2.2	Les fibres .....	72
1.1.3	Les noyaux profonds .....	73
1.2	Développement du cervelet chez la souris .....	75
1.2.1	Embryonnaire .....	75
1.2.2	Post natal .....	77
1.2.2.1	Foliation.....	77
1.2.2.2	Différenciation des PC .....	79
1.2.2.3	Mort neuronale développementale chez la souris : 1ere semaine post natale .....	82
1.2.2.4	Elimination d'une innervation multiple (P7-P17) .....	83
1.3	Données physiopathologiques .....	86
2.	Le système nigro-strié .....	87
2.1	Substance noire <i>pars compacta</i> .....	88
2.2	Striatum .....	89
2.2.1	Organisation anatomo-fonctionnelle .....	89
2.2.2	Voie directe et indirecte.....	91
3.	Le cortex moteur .....	93
4.	Relations Cervelet/ Système nigro-strié/ Cortex moteur.....	94
4.1	Les pédoncules cérébelleux.....	94
4.2	Boucle cerebello-thalamo-corticale.....	96
4.3	Communication bidirectionnelle entre le cervelet et les ganglions de la base .....	96
	<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>98</b>
	<b>Partie 2 : Résultats et Travaux en cours .....</b>	<b>101</b>

<b>I. Les troubles moteurs corrént avec les déficits sociaux et une neuropathologie restreinte dans le modèle d'exposition prénatale au VPA .....</b>	<b>103</b>
Description .....	103
Tiré à part .....	106
<b>II. Les déficits comportementaux et la neuropathologie de l'autisme sont dépendants du sexe dans un modèle d'activation du système immunitaire maternel.....</b>	<b>119</b>
Description .....	119
Tiré à part .....	120
<b>III. Etude de l'expression de l'aromatase, facteur de risque hormonal .....</b>	<b>151</b>
Introduction .....	151
Matériels et méthodes.....	151
Résultats .....	153
Discussion / Conclusion .....	154
<b>IV. Construction virale dans le but d'induire la mort des cellules de Purkinje dans Crus I .....</b>	<b>157</b>
Introduction .....	157
Matériels et méthodes.....	157
1) Construction plasmidique.....	158
1.1 Isolement des fragments d'ADN linéaire .....	163
1.2 Encadrement par PCR .....	165
1.3 Réaction de recombinaison BP.....	168
1.4 Réaction de recombinaison LR .....	169
1.5 Séquençage (Eurofins Genomics) .....	169
2) Détermination des coordonnées stéréotaxiques chez l'adulte.....	170
Résultats .....	171
1) Réaction de recombinaison BP .....	171
1.1 <i>L7/Pcp2_P1-P5r</i> .....	171
1.2 <i>GFP_P5-P2</i> .....	173
1.3 <i>BAX_P5-P2</i> .....	175
2) Réaction de recombinaison LR .....	176
Discussion / conclusion .....	177
<b>Partie 3 : Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>179</b>
<b>I. Discussion générale .....</b>	<b>181</b>
Rôle de Crus I.....	181
Pertinence du modèle poly I:C comme modèle des troubles du spectre autistique .....	187
Implication de la microglie.....	193
Comparaison des deux modèles d'exposition prénatale.....	198
Contribution hormonale .....	200
<b>II. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>206</b>



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mohamed Jaber pour son accueil au Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques de Poitiers. Je le remercie aussi de m'avoir accordé sa confiance pour la réalisation de ce projet de thèse et pour sa communication lors de séminaires. Je remercie également Pierre-Olivier Fernagut qui a toujours été d'une aide précieuse. Un grand merci à tous les deux de m'avoir permis de développer et de mettre en application mes idées. J'ai beaucoup gagné en expérience au cours de ces trois années et me suis vraiment épanouie.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury pour l'intérêt que chacun a porté à mon travail.

Merci à tous les membres de l'équipe Neuro-DAD pour leur aide et leur bonne humeur. J'exprime ma reconnaissance à Maureen qui m'a formée aux techniques d'immuno, accompagnée dans les manips que ce soit en routine ou dans leur mise en place. Nous avons fini en beauté avec l'armure aromatisée ! Merci à Laurie pour son aiguillage indispensable lors de la construction plasmidique. Partant de zéro en génétique, la route aurait été beaucoup plus longue sans ses conseils. Merci à Anaïs pour la gestion des souris et les commandes pour Prebios. Merci à Marianne pour son accompagnement lors des chirurgies stéréotaxiques. Merci à Emmanuel pour son soutien, ses conseils et les moments de détente. Merci à Tareq pour le travail qu'il a fourni sur la partie comportementale.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du laboratoire. Merci à Marie-Laure pour ses explications techniques très utiles. Merci à Sébastien pour la formation à la microscopie, pour la qualité de son expertise et sa disponibilité. Merci à Laure pour sa contribution dans la quantification d'intensité de fluorescence.

Merci à tout le personnel de la plateforme Prebios.

Merci à Fekrije Selimi pour l'envoi de son plasmide L7/Pcp2-GFP.

Merci à Marie-Claude Gaillard et Alexis Bemelmans de la plateforme Mircen pour les vecteurs envoyés et leurs conseils techniques.

Je tiens à remercier particulièrement tous les Ibmigiers, Konstantin et POG : les blotters de tumeurs - Pauline et Adélie : les popeuses de neurones. Spéciale dédicace à Adélie pour tous ces moments d'O2 qu'ils soient « brassés », philosophiques, sportifs, culinaires, stockholm, hispaniques, musicaux (Vive les Why Note) et même éphémères... Des souvenirs exceptionnels qui m'ont portée comme un surfeur confirmé prend sa vague (pas comme nous à Lacanau...).

Je remercie aussi celles qui m'ont montré la voie : Sandie, Audrey L, Julie, Mathilde et Audrey V. Elles m'ont apporté d'importants repères et conseils pour cette fin de thèse.

Merci aux amis rencontrés pendant cette thèse, ces trois années n'auraient pas été aussi riches et exceptionnelles sans eux.

Merci à tous mes amis de fac: les Gcell, la « Dream Team » ; et du lycée : les « Gonz' de Poityeah », qui sont toujours là malgré les années qui passent et la distance qui nous sépare. Je voudrais tout particulièrement remercier ma petite Laura, qui a été un soutien, un modèle, une *Muse* (pour le jeu de mot !). Celle qui m'a motivée à faire une thèse, celle qui répondait toujours présente quand j'avais besoin, celle qui m'accueille à bras ouverts quand je veux changer d'air. Merci pour tout.

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à mes merveilleux parents qui auraient fait l'impossible. Je vous suis très reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi depuis toujours. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci.

Merci à Nory, Nolya et Loëne qui sont des modèles, des soutiens, toujours à l'écoute ; et particulièrement à Loëne d'être venue ensoleiller une partie de ma vie de thésarde lorsqu'elle a habité avec moi. Merci à Julien qui m'a aidée à réviser mon premier cours de neurobiologie quand j'étais au lycée. Voilà où ses explications m'ont menée !

Merci à mes neveux et nièces pour leurs sourires et leur émerveillement qui me réchauffent le cœur.

Merci à ma grand-mère pour son attention et ses bons petits plats.

## Liste des figures

Figure 1 : Comorbidités des troubles du spectre autistique.....	21
Figure 2 : Exemples de facteurs de risque génétiques et environnementaux des troubles du spectre autistique .....	28
Figure 3 : Périodes des différentes étapes de développement cérébral chez l’Homme .....	28
Figure 4 : Protéines synaptiques potentiellement impliquées dans la physiopathologie des troubles du spectre autistique .....	33
Figure 5 : Représentation schématique des potentiels mécanismes induits par le stress oxydatif et provoquant des dysfonctions neuronales et les symptômes des TSA.....	40
Figure 6 : Distribution des gènes potentiellement responsables des troubles du spectre autistique.....	47
Figure 7 : Structure moléculaire de l’acide valproïque .....	53
Figure 8 : Mécanismes d’action de l’acide valproïque sur le métabolisme du glutamate et du GABA	55
Figure 9 : Pertinence de l’acide valproïque pour un modèle animal des TSA .....	58
Figure 10 : Structure chimique de l’acide polyinosinique-polycytidylique .....	60
Figure 11 : Voies de signalisation induites par la reconnaissance d’agents pathogènes bactériens ou viraux.....	62
Figure 12 : Représentation schématique d’une coupe sagittale de cervelet humain. ....	65
Figure 13 : Structures anatomiques du cervelet humain.....	68
Figure 14 : Représentation schématique de la division lobulaire du cervelet chez l’Homme .....	69
Figure 15 : Composition cellulaire du cortex cérébelleux et circuits neuronaux. ....	71
Figure 16 : Divisions fonctionnelles du cervelet.....	74
Figure 17 : Développement des vésicules embryonnaires du système nerveux des vertébrés suite à la fermeture du tube neural.....	76
Figure 18 : Migration des cellules granulaires de la couche granulaire externe vers la couche granulaire interne lors de la période post-natale.....	77
Figure 19 : La foliation du cervelet chez la souris à lieu au cours des deux premières semaines post-natales.....	79
Figure 20 : Etapes de différenciation des cellules de Purkinje.....	81
Figure 21 : Implication de ROR $\alpha$ dans la conversion de la testostérone en oestradiol. ....	82
Figure 22 : Elagage des synapses fibres grimpances-cellules de Purkinje en période post-natale chez la souris. ....	85
Figure 23 : Mécanismes intervenant lors de la phase tardive d’élimination synaptique des fibres grimpances .....	86
Figure 24 : Organisation des structures composant les ganglions de la base .....	88
Figure 25 : Circuits des ganglions de la base .....	92
Figure 26 : Schéma des voies afférentes et efférentes passant par les pédoncules cérébelleux .....	95
Figure 27 : Boucles anatomiques impliquant le cervelet le cortex et les ganglions de la base .....	97
Figure 28 : Expression de l’aromatase dans Crus II chez les mâles exposés <i>in utero</i> au poly I:C.....	153
Figure 29 : Schéma explicatif de la technique de recombinaison de deux fragments d’ADN dans un plasmide .....	158
Figure 30 : Carte du plasmide contenant le promoteur L7/Pcp2.....	160
Figure 31 : Carte plasmidique contenant la séquence du gène <i>GFP</i> encadré des sites de recombinaison attB .....	161
Figure 32 : Plasmide 3534 pcDNA3 contenant le gène <i>BAX</i> .....	161
Figure 33 : Carte plasmidique des vecteurs donneurs P1-P5r et P5-P2 pour la réaction BP.....	162
Figure 34 : Carte plasmidique du vecteur de destination pour la réaction LR .....	163
Figure 35 : Digestion du plasmide <i>L7/pcp2-GFP</i> par BsrGI et résultat théorique de la migration sur gel .....	165

Figure 36 : Digestion du plasmide <i>L7/Pcp2-GFP</i> par ScaI et HindIII et résultat théorique de la migration sur gel.....	165
Figure 37 : Détermination des coordonnées stéréotaxiques sur coupe coronale de l'atlas de souris C57Bl6/j pour injection dans Crus I.....	170
Figure 38 : Résultat théorique de la digestion du vecteur <i>L7/Pcp2_P1-P5r</i> par XbaI et HindIII .....	171
Figure 39 : Photo du gel de migration du produit de la digestion du vecteur <i>L7/Pcp2_P1-P5r</i> .....	172
Figure 40 : résultat théorique de la digestion du vecteur <i>GFP_P5-P2</i> par BsrGI Extrait du logiciel Ape .....	173
Figure 41 : résultat théorique de la digestion du vecteur donneur P5-P2 par BsrGI .....	173
Figure 42 : photo du gel de migration du produit de la digestion du vecteur <i>GFP_P5-P2</i> .....	174
Figure 43 : résultat théorique de la digestion du vecteur <i>BAX_P5-P2</i> par AclI et BamHI.....	175
Figure 44 : résultat théorique de la digestion du vecteur donneur P5-P2 par AclI et BamHI .....	175
Figure 45 : photo du gel de migration du produit de la digestion du vecteur <i>BAX_P5-P2</i> .....	176
Figure 46 : Crus I et le cortex moteur primaire sont impliqués dans la même boucle cortico-cérébelleuse. ....	183
Figure 47 : Processus d'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque.....	185
Figure 48 : Rôle développemental de la microglie dans l'élitage synaptique.....	197
Figure 49 : Dimorphisme sexuel de la colonisation microgliale rendant les mâles plus vulnérables à une infection néonatale.....	203

## Liste des tables

Table 1 : Niveaux de sévérité des troubles du spectre autistique .....	19
Table 2 : Signes moteurs observables chez des personnes atteintes de troubles du spectre autistique .	22
Table 3 : Exemples de modèles animaux transgéniques pour un gène syndromique.....	48
Table 4 : Exemples de modèles animaux transgéniques pour un gène supposé.....	52
Table 5: Enzymes de restriction utilisées pour isoler les fragments d'ADN à partir des plasmides ...	164
Table 6 : Séquences des sites de recombinaison attB spécifiques des régions 5' et 3' des fragments d'ADN à encadrer .....	166
Table 7 : Enzymes utilisées pour la vérification de la réaction de BP .....	169
Table 8 : Résumé des résultats comportementaux et histologiques obtenus dans notre étude chez les modèles VPA et poly I:C, mâles et femelles.....	198

## Abréviations

ABA : Applied Behavior Analysis	DLG : discs large MAGUK scaffold protein
ADN : acide désoxyribonucléique	DLGAP/SAPAP : Discs large associated proteins
AMPA : $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	DLS : striatum dorsolatéral
AMs : aire motrice supplémentaire	DMS : striatum dorsomédian
AP-1 : activator protein 1	dNTP : désoxyribonucléotides
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor	DONR : vecteur donneur
ArKO : Aromatase Knock-out	DREADDS : Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs
ARN : acide ribonucléique	DRG : ganglion dorsal
ATP: adénosine triphosphate	DRIs : depression-related interferon-induced genes
BCL-2 : B-cell lymphoma 2	DSC : voie dorsale spino-cérébelleuse
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor	DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
BSA : bovin serum albumin	E : jour embryonnaire
C: cytosine	EC : cumérus externe
ccdB : coupled cell division B gene	E.coli : Escherichia coli
CCL: chemokine ligand	EGL : couche granulaire externe
CDC : Centers for Disease Control and Prevention	F : noyau fastigial du cervelet
CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives	FADD : Fas-associated protein with death domain
CFTMEA : classification française des troubles mentaux de l'enfant et de l'adolescent	FRM/P: Fragile X mental retardation/protein
CIM : classification internationale des maladies	G : guanine
CIRB : center for interdisciplinary research	GABA : gamma-aminobutyric acid
CL : noyau centrolatéral du thalamus	GABR : gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits
CM : noyau centro-médian du thalamus	GAD: Glutamic acid decarboxylase
CNTN4/CNTNAP2 : contactin 4/contactin-associated protein-like 2	GFP : green fluorescent protein
CNV : copy number variant	GI : gastro-intestinal
Col : colonie	GPe/i : Globus pallidus externe/interne
COX : cyclo-oxygénase	GRIK : Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2
Cyt c : cytochrome c	HDAC : histones déacétylases
D : noyau dentelé	I : pédoncules inférieurs du cervelet
DI : dysfonctionnement immunitaire	ICI : interventions comportementales intensives

IRF : interferon regulatory factor  
 IL : interleukine  
 IRAKs: interleukin-1 receptor-associated kinase 1 and 4  
 IRF3 : interferon regulatory factor 3  
 IRMf : imagerie à résonance magnétique fonctionnelle  
 LB : Luria-Bertani  
 LPS : lipopolysaccharide  
 M : pédoncule moyen du cervelet  
 M1 : cortex moteur primaire  
 MAGUK : membrane-associated guanylate kinase  
 MAL : MyD88 adaptor-like  
 MAPK : mitogen-activated protein kinase  
 MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1  
 MecP2 : methyl CpG binding protein 2  
 mGluR5/mGlu5 : Metabotropic glutamate receptor 5  
 MIA : maternal immune activation  
 mIPSC : mignature inhibitory postsynaptic current  
 MOA : mécanisme d'action  
 mTOR : mechanistic target of rapamycin  
 MyD88 : myeloid differentiation primary response gene 88  
 NEB : new England biolabs  
 NEM : neurone épineux moyen  
 NF1 : neurofibromatose 1  
 NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
 NLGN : neuroligine  
 NMDA: N-methyl-D-aspartate  
 NRXN : neurexine  
 NST/STN : noyau sous-thalamique  
 Nt : nucléotide  
 OI : olive inférieure  
 OMS : organisation mondiale de la santé  
 P : jour post-natal  
 PC : cellule de Purkinje  
 Pcp2 : Purkinje cell protein 2  
 PCR : polymerase chain reaction  
 PECs : Pictures Exchange Communication System  
 Pf : noyau parafasciculaire du thalamus  
 PKC $\epsilon$  : protein kinase C epsilon  
 PM : cortex prémoteur  
 POC : preuve de concept  
 Poly I:C : acide polyinosinique-polycytidylique  
 PROSAP : Proline-rich synapse-associated protein  
 PSD : post synaptic density  
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
 RELN : reeline  
 RIP1 : receptor interacting protein 1  
 RN : noyau rouge  
 ROR $\alpha$  : RAR-related orphan receptor alpha  
 S : pédoncules supérieurs du cervelet  
 SAP : synapse-associated protein  
 SARM1 : sterile alpha and TIR motif containing 1  
 SFARI : Simons Foundation Autism Research Initiative  
 SHANK : SH3 and multiple ankyrin repeat domains  
 SNc : substance noire pars compacta  
 SNr: substance noire pars reticulata  
 SSA-DH : succinate semialdehyde deshydrogenase  
 TAB : TAK binding protein  
 TAK1 : transforming growth factor beta activated kinase-1  
 TBR1 : T-box brain 1  
 TBS : Tris-buffered saline  
 TDAH : trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité  
 TEACCH : Treatment and Education of Autistic and related Communication Handicapped Children  
 TED : trouble envahissant du développement

TLR : Toll-like receptor  
Tm : Primer Melting Temperature  
TNF : receptor-associated factor  
TOC : trouble obsessionnel compulsif  
TRAF3 : TNF receptor-associated factor 3  
TRAM : TRIF-related adaptor molecule  
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing  
interferon- $\beta$   
Trk : Tyrosine kinase receptor  
TSA : troubles du spectre autistique  
TSC1/2 : tuberous sclerosis 1/2  
UBE3A/E6AP : ubiquitin-protein ligase (E3A)  
UV : ultraviolet  
V: noyau vestibulaire du cervelet  
VA/VL : noyau ventral antérieur/latéral du  
thalamus  
VDCC : canal calcique voltage dépendant  
VLe : vecteur lentiviral  
VPA : acide valproïque  
VSC : voie ventrale spino-cérébelleuse



## Avant-propos

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée aux troubles du spectre autistique (TSA), une pathologie psychiatrique neurodéveloppementale pour laquelle aucune approche thérapeutique curative n'existe à ce jour. Les symptômes apparaissent dès la petite enfance et persistent à l'âge adulte sans jamais pouvoir disparaître totalement malgré la meilleure des prises en charge. Bien que le nombre d'études ne cesse d'augmenter, l'étiologie des TSA reste aujourd'hui complexe et implique de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. La grande majorité des recherches s'intéresse à la compréhension des mécanismes sous-jacents aux symptômes cognitifs caractérisant les TSA (difficultés dans la communication sociale, intérêts restreints et répétés), ce qui a permis d'importantes avancées pour la compréhension de certains déficits. Cependant, des signes moteurs sont également retrouvés dans la grande majorité des TSA sans pour autant être pris en considération dans les critères de diagnostic ou les propositions de traitement, essentiellement à cause du manque de données établissant l'origine de ces troubles moteurs et leur contribution à l'ensemble de la pathologie.

Mon travail de thèse a consisté à identifier les réseaux neuronaux impliqués dans les désordres moteurs liés aux TSA. J'ai abordé cette problématique sur un aspect neuroanatomique fonctionnel, suite à des résultats de comportements obtenus au préalable au laboratoire sur deux modèles murins environnementaux des TSA. Il s'agit de deux stratégies d'exposition prénatale fréquemment utilisées pour modéliser les TSA, l'un est pharmacologique/toxicologique (acide valproïque ou VPA), l'autre active le système immunitaire (acide polyinosinique-polycytidylique ou poly I:C). J'ai effectué des analyses quantitatives des neurones dans les régions cérébrales impliquées dans la motricité volontaire c'est-à-dire la planification, l'initiation, le contrôle, la coordination, la synchronisation et l'arrêt du mouvement. Ces régions comprennent le cervelet, le cortex moteur, le striatum, la substance noire *pars compacta* qui,

au-delà de leur rôle moteur, régulent aussi plusieurs fonctions cognitives altérées dans les TSA, tels que le langage et les interactions sociales.

Ce travail présente un intérêt fondamental pour la compréhension de la physiopathologie des TSA grâce à une caractérisation des déficits moteurs, de leurs substrats neuroanatomiques et des relations entre déficits moteurs, déficits cognitifs et perte neuronale. Il présente également un intérêt appliqué, pouvant amener à proposer à la fois un élément quantitatif du diagnostic en évaluant précocement les troubles moteurs associés aux TSA mais également une nouvelle orientation vers des stratégies thérapeutiques ciblant les déficits moteurs et/ou les régions motrices étudiées.

En outre, les retards développementaux sur le plan de la motricité pourraient être observables précocement par rapport aux troubles cognitifs tels que les retards de langage et d'apprentissage, et seraient quantifiables de manière plus objective grâce à l'utilisation de paramètres biologiques précis. Leur caractérisation est alors essentielle. Mon travail de thèse vise donc à mettre en évidence les substrats neuroanatomiques des troubles moteurs et leur contribution à la physiopathologie des TSA dans le but de déterminer si la motricité peut constituer un biomarqueur et une cible thérapeutique.

Les premiers résultats obtenus suite à la quantification des neurones dans les régions impliquées dans la motricité m'ont amenée à proposer de nouveaux objectifs :

- Déterminer la relation entre la perte neuronale et les symptômes autistiques observés
- Evaluer l'effet de l'activation du système immunitaire par le poly I:C sur la microglie
- Identifier des facteurs hormonaux potentiellement responsables des différences constatées entre les mâles et les femelles.

Suite à une analyse corrélative, effectuée entre le nombre de neurones dans les différentes régions étudiées et les résultats des tests de comportement préalablement réalisés au laboratoire,

j'ai pu identifier un lien potentiel entre la perte des cellules de Purkinje (PC) dans le cervelet, restreinte à une région particulière (Crus I), et deux symptômes caractéristiques des TSA : les déficits d'interactions sociales ainsi que des troubles de la marche (cf. partie 2. I). Ainsi, j'en ai émis l'hypothèse que cette perte des PC dans Crus I pourrait être responsable à la fois des troubles sociaux et moteurs dans les TSA. Les PC dans Crus I pourraient alors être une cible thérapeutique très intéressante à exploiter. Afin de vérifier cette hypothèse d'un lien causal entre la perte des PC dans Crus I et les troubles cognitifs et moteurs, plusieurs objectifs ont été définis :

- Induire une perte spécifique des PC d'environ 20-30% chez des souris adultes et chez des nouveau-nés, correspondant à la fois à la perte observée dans cette étude mais également à celle retrouvée chez l'Homme atteint de TSA.
- Induire une perte restreinte à la région de Crus I
- Amplifier les processus naturels de mort développementale des PC (cf. partie 1 III. 1.2.2.3).

Pour cela, j'ai œuvré à développer un virus non répliquatif permettant d'explorer ces différents points (cf. partie 2. IV).

En parallèle, j'ai analysé l'effet de l'infection engendrée par le poly I:C sur l'activation de la microglie, en ciblant dans un premier temps une des aires atteintes par une perte neuronale. Pour cela, j'ai effectué une étude cytologique de la morphologie des cellules microgliales afin de mettre en évidence un changement de conformation (cf. partie 2. II).

Les résultats des tests comportementaux et de la quantification neuronale ont révélé de nombreuses différences selon le sexe des souris chez les deux modèles. Afin de pouvoir expliquer ces différences, reflétant le ratio 3:1 du nombre de garçons diagnostiqués par rapport aux filles, et à la suite d'une étude bibliographique, je me suis intéressée aux facteurs

hormonaux comme potentiels facteurs de vulnérabilité sinon de protection dans les TSA (cf. partie 2. III).

Mon travail de thèse a pu donner lieu à des résultats nouveaux dans le domaine des TSA dont ceux concernant le modèle VPA qui ont été publiés dans *International Journal of Neuropsychopharmacology* en 2018 (voir partie 2. I). Un deuxième article est actuellement soumis suite aux résultats obtenus sur le modèle poly I:C (partie 2. II). Ces travaux ont aussi été communiqués dans des congrès nationaux (NeuroFrance 2017) ou internationaux (FENS, Fédération Européenne de Neurosciences 2018) sous forme de poster et seront présentés en symposium lors du prochain congrès de la Société Française de Neurosciences en 2019. Mes travaux ont aussi été exposés au grand public lors de l'édition 2018 de Pint of Science et j'ai eu souvent l'opportunité d'échanger sur mes activités de thèse lors des enseignements de Neurosciences que je donnais aux étudiants de Licence et de Master.

# **Partie 1 : Introduction**



# I. Les troubles du spectre autistique

Les TSA sont une pathologie psychiatrique neurodéveloppementale dont les premiers signes apparaissent dès l'enfance, avant l'âge de trois ans, et qui persistent tout au long de la vie. Cependant, la pose du diagnostic peut prendre de nombreuses années. Les TSA affectent le comportement social et les facultés cognitives des individus atteints. Plusieurs symptômes sont apparentés à ces troubles. Les plus répandus concernent les interactions sociales, la communication verbale ou non-verbale, des mouvements répétés et stéréotypés, des intérêts restreints et des difficultés d'apprentissage. Décrits pour la première fois par Kanner et par Asperger dans les années 1940, l'étiologie de ces troubles reste encore méconnue en raison de la complexité de leur physiopathologie (Asperger H, 1944; Kanner, 1943). La recherche clinique et fondamentale a considérablement évolué depuis les années 1970-1980 et la prolifération des études sur les TSA ont permis des avancées majeures. Malheureusement aucun traitement curatif n'a été découvert à ce jour. Des méthodes pharmacologiques et comportementales permettent cependant une atténuation de certains symptômes et une amélioration de la qualité de vie, voire même, dans certains cas, une certaine restauration des déficits surtout lorsque la prise en charge est suffisamment précoce.

Dans ce chapitre, j'aborderai de façon générale les TSA en les définissant, puis en donnant quelques données épidémiologiques et neuropathologiques. Je traiterai ensuite la question de la physiopathologie en énumérant les facteurs de risques associés aux TSA ainsi que certaines caractéristiques biologiques associées.

## 1. DEFINITION

La terminologie “troubles du spectre autistique” a récemment remplacé celle des « troubles envahissants du développement (TED) » utilisée notamment dans la Classification internationale des maladies - dixième version (CIM-10), éditée par l’Organisation mondiale de la santé (OMS). Une onzième version devrait être éditée prochainement avec la nouvelle nomenclature.

La CIM-10 définit alors les TED comme : « Un groupe de troubles caractérisés par des altérations qualitatives des interactions sociales réciproques et des modalités de communication, ainsi que par un répertoire d’intérêts et d’activités restreints, stéréotypés et répétitifs. Ces anomalies qualitatives constituent une caractéristique envahissante du fonctionnement du sujet, en toutes situations ». Ainsi, un large spectre de symptômes caractérise ces TED qui peuvent également être retrouvés selon différents degrés de sévérité. Du fait de cette grande variabilité clinique, la CIM-10 distingue huit catégories de TED :

- 1- L’autisme infantile : apparaissant avant l’âge de trois ans, il se manifeste par des troubles de la communication, des déficits d’interactions sociales, des intérêts restreints, des comportements répétés et stéréotypés.
- 2- L’autisme atypique : diffère de l’autisme infantile car survenant plus tardivement chez l’individu et/ou ne reflétant pas tous les symptômes.
- 3- Le syndrome de Rett : neuropathologie génétique rare qui altère le développement cérébral exclusivement chez les filles.
- 4- Trouble désintégratif de l’enfance : correspond à un développement normal jusqu’à 2 ans puis à une détérioration menant à une perte des acquisitions ; à l’apparition de troubles de la communication et des interactions sociales ainsi que de comportements répétés et restreints avant 10 ans.

- 5- L'hyperactivité associée à un retard mental et à des mouvements stéréotypés : dans ce cas, il n'y a pas de déficits d'interactions sociales.
  - 6- Le syndrome d'Asperger : caractérisé par une absence de retard du développement cognitif mais avec en revanche la présence des autres symptômes de type autistique.
  - 7- Les autres troubles envahissants du développement.
  - 8- Un trouble envahissant du développement, sans précision : dite « catégorie diagnostique résiduelle » pour des troubles se rapprochant cliniquement d'un TED.
- ➔ Ces différentes catégories se distinguent par l'âge d'apparition des symptômes, par la manifestation de ces derniers (avec ou sans retard mental ou de langage), par l'identification ou non d'une mutation génétique connue comme étant à l'origine du TED. L'autisme représenterait alors un tiers de tous les TED et le syndrome d'Asperger moins de 10% (Fombonne, 2009).

La CIM-10 est considérée comme la référence pour la pose du diagnostic. Cependant, il existe des limites sur la différenciation clinique des différentes catégories. Des discussions sont en cours au sein de la communauté scientifique concernant notamment les points suivants :

- La distinction entre le syndrome d'Asperger et l'autisme sans retard mental, dit « Autisme de haut niveau »
- Les limites imprécises entre les catégories « autisme atypique », « autres TED » et « TED sans précision » dont les deux dernières font l'objet de propositions de description.

En plus de cette classification, le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth (DSM-5), une autre classification internationale de l'Association Américaine de Psychiatrie (American Psychiatric Association, 2013), peut venir compléter l'évaluation. Le DSM-5 définit les TSA comme suit :

- A. Persistance des déficits dans la communication et les interactions sociales dans différents contextes, se présentant selon les symptômes suivants :
1. Troubles de la réciprocité émotionnelle et sociale.
  2. Difficultés dans la communication non-verbale utilisée pour les interactions sociales : pas de contact visuel, difficultés et incompréhension du langage du corps ou de l'usage de gestes expressifs, absence d'expressions faciales.
  3. Problèmes à développer, entretenir et comprendre les relations : adapter un comportement en fonction du contexte social, participer aux jeux imaginatifs, manquer d'intérêt pour ses pairs.
- B. Répertoire de comportements, d'intérêts ou d'activités restreints et répétitifs :
1. Mouvements, allocution ou utilisation d'objets répétés ou stéréotypés.
  2. Nécessité de rituels et d'une routine, inflexibilité aux changements.
  3. Intérêts restreints et anormalement focalisés de forte intensité.
  4. Hyper- ou hypo sensibilité à des stimuli sensoriels et intérêt inhabituel pour des aspects sensoriels de l'environnement.
- C. Les symptômes doivent apparaître dès la période précoce de développement (pouvant se manifester uniquement lorsque les capacités atteignent leur limite sans pouvoir répondre aux exigences sociales, ou être ultérieurement masquées suite à l'apprentissage de stratégies).
- D. Les symptômes limitent les capacités socio-professionnelles au quotidien.
- E. Une déficience intellectuelle ou un retard développemental ne justifiant pas ces troubles.

Le DSM-5 introduit également la notion de degrés de sévérité pour décrire l'intensité des désordres. Ainsi, trois niveaux de TSA sont définis selon l'impact des symptômes sur les capacités de l'individu (table 1)

Niveau de sévérité	Communication sociale	Comportements répétés, restreints
<b>Niveau 3 : nécessite une assistance très importante</b>	Troubles sévères de la communication sociale verbale et non verbale entraînant d'importantes difficultés à comprendre le fonctionnement social, à initier des interactions et à répondre aux ouvertures sociales.	Pas de flexibilité comportementale, importantes difficultés à composer avec le changement, ou d'autres comportements répétés et restreints limitant l'intégration sociale. Le changement d'intérêt ou d'action est source d'une profonde angoisse.
<b>Niveau 2 : nécessite une assistance importante</b>	Troubles de la communication verbale et non verbale. Difficultés sociales même en présence d'un auxiliaire. Initiation aux interactions sociales limitée et réponses inadaptées ou réduites.	Pas de flexibilité comportementale, difficultés à composer avec le changement. Autres comportements répétés/restreints notables entraînant des problèmes d'adaptation dans de nombreux contextes sociaux. Le changement d'intérêt ou d'action est difficile et angoissant.
<b>Niveau 1 : nécessite une assistance</b>	En cas de non présence d'une aide sur place, la communication sociale peut devenir un réel problème. Difficultés à initier des interactions ou à répondre de façon adaptée. Paraît comme un manque d'intérêt pour autrui	Le manque de flexibilité comportementale cause des interférences dans le fonctionnement social dans un ou plusieurs contextes. Difficultés dans le changement d'activités. Problèmes d'organisation et de planification entravant l'indépendance.

**Table 1 : Niveaux de sévérité des troubles du spectre autistique**

(American Psychiatric Association, 2013)

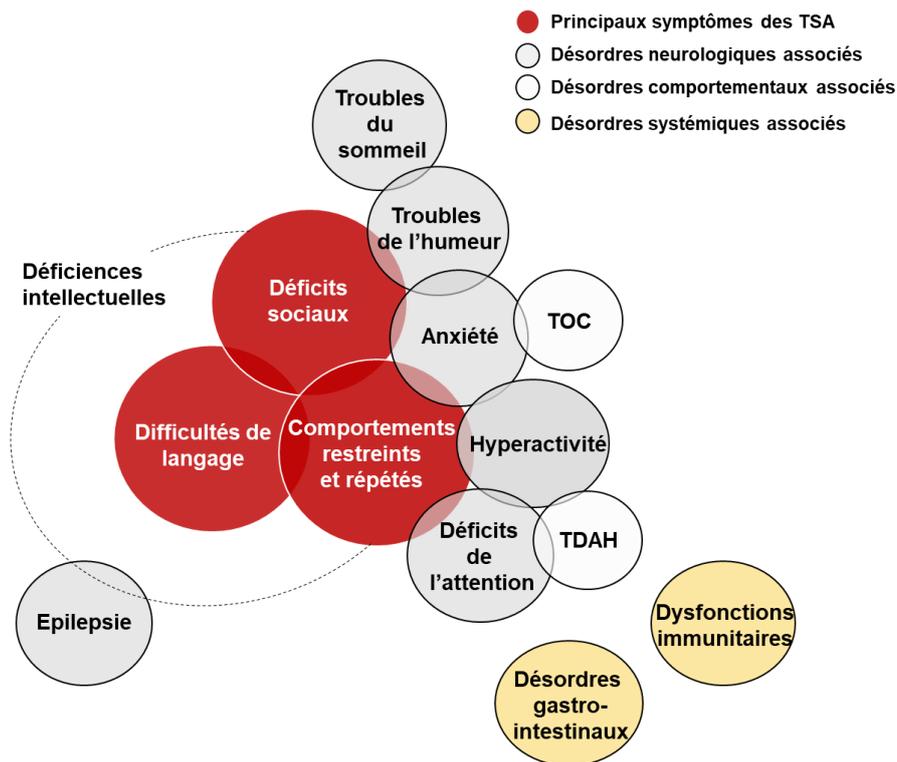
Il existe également une classification française des troubles mentaux de l'enfant et de l'adolescent (CFTMEA) en complément de ces deux classifications internationales. Cependant, elle ne correspond pas en tout point au CIM-10 puisqu'elle fait appel aux termes « psychose infantile » ou « psychose précoce », qui sont aujourd'hui remis en cause en raison de l'état des connaissances actuelles.

## 2. COMORBIDITES

Les symptômes énumérés précédemment et servant au diagnostic (troubles de la communication sociale, comportements répétés et restreints) sont souvent accompagnés de comorbidités (figure 1). Elles incluent l'anxiété (White et al., 2009) et les déficits de l'attention avec ou sans hyperactivité (Ghanizadeh, 2012) qui sont retrouvés chez ~28% des sujets atteints de TSA (Simonoff et al., 2008). On retrouve également des périodes de dépression (Magnuson and Constantino, 2011) et une déficience intellectuelle dans 70% des cas (La Malfa et al., 2004). Quel que soit leur âge, les sujets atteints de TSA font souvent l'expérience de conditions médicales particulières comme :

- l'épilepsie (Tuchman et al., 2010)
- des troubles du sommeil (Goldman et al., 2009)
- des désordres gastro-intestinaux (McElhanon et al., 2014)
- des dysfonctions mitochondriales (Rossignol and Frye, 2012)
- des allergies et des dérégulations du système immunitaire (Ashwood et al., 2006; Zerbo et al., 2015).

L'étude de Simonoff et al. estime que 70% des individus atteints de TSA manifestent un désordre comorbide et que 40% en présentent au moins deux (Simonoff et al., 2008).



**Figure 1 : Comorbidités des troubles du spectre autistique**

TOC : troubles obsessionnels compulsifs ; TDAH : Trouble des déficits de l'attention avec hyperactivité

### 3. TROUBLES MOTEURS

Les TSA sont davantage considérés comme une pathologie psychiatrique neurodéveloppementale affectant les capacités intellectuelles, la sociabilité et les émotions. Ce sont ces caractéristiques phénotypiques qui sont considérées dans le diagnostic. Une grande majorité des sujets atteints présentent en parallèle d'autres symptômes et notamment des troubles moteurs (Provost et al., 2007). En effet, Hilton et al. (2007) indique que 89% des enfants atteints du syndrome d'Asperger dans leur cohorte présentaient au moins un désordre moteur (Hilton et al., 2007). Ming et ses collaborateurs ont démontré une apraxie, une hypotonie, une marche sur la pointe des pieds, une mobilité réduite de la cheville ainsi qu'une motricité globale perturbée chez des enfants de 2 à 6 ans atteints d'autisme, de troubles envahissants et du syndrome d'Asperger (Ming et al., 2007). Ceci montre l'étendue de la

prévalence de ces désordres au sein des TSA. Cependant, il semblerait que les enfants atteints du syndrome d'Asperger aient des déficits de la motricité fine et globale moins importants que les enfants atteints d'autisme ou de troubles envahissants non spécifiques (Ghaziuddin and Butler, 1998). Pourtant identifiés par Kanner (1943) et Asperger (1944) qui décrivaient une maladresse motrice, notamment à la marche, ces désordres sont toujours totalement absents des critères de diagnostic. Depuis, de nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation de ces déficits, aussi variés que le nombre de syndromes autistiques. Ces troubles moteurs peuvent se manifester dès les premiers mois avec une asymétrie de l'allongement ventral chez le nourrisson, et plus tard avec un retard dans l'évolution de la motricité (redressement, assise, marche...) (Teitelbaum et al., 1998). En examinant des enfants de 3 à 10 ans atteints d'autisme, Vilensky et al. caractérisent leur marche et décrivent : un écartement des pas diminué, une phase d'appui plus longue et des angles articulaires de type parkinsonien (Vilensky et al., 1981). Ces déficits concernent aussi bien des compétences basiques du contrôle de la motricité que des fonctions plus spécifiques (table 2).

Motricité basique	Motricité spécifique (dyspraxie)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- contrôle postural anormal</li> <li>- marche irrégulière</li> <li>- problème de coordination bilatérale</li> <li>- difficultés au contrôle de la motricité fine : dextérité manuelle, écriture, contrôle d'objet, activité oculomotrice</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- difficultés à réaliser correctement une séquence de mouvements demandée et à imiter des gestes</li> <li>- problèmes dans la commande verbale</li> <li>- difficultés à l'utilisation d'objets</li> <li>- déficits dans l'organisation spatiale : positionnement du corps, utilisation des parties du corps requises</li> <li>- déficits dans l'organisation temporelle : vitesse et synchronisation des mouvements, retard à l'initiation du mouvement</li> </ul>

**Table 2 : Signes moteurs observables chez des personnes atteintes de troubles du spectre autistique**

(d'après Kaur, M Srinivasan, and N Bhat 2018)

## 4. EPIDEMIOLOGIE

### 4.1 Chiffres

Selon l’OMS, 1 enfant sur 160 présente un trouble du spectre autistique. Il faut considérer ce chiffre comme étant une moyenne mondiale des données enregistrées car la prévalence varie notablement d’une étude à l’autre. Ces différences peuvent être expliquées selon la rigueur des méthodes employées lors de l’étude, l’origine ethnique des patients qui semble être un facteur (Christensen, 2016) et leur niveau socio-économique (Durkin et al., 2010).

Par exemple, Kim et al. ont montré dans leur étude réalisée sur une large population de Corée du Sud une prévalence des TSA bien supérieure, de 2.64%, soit 1 enfant sur 38 (Kim et al., 2011). Il faut aussi prendre en compte l’absence de chiffres provenant de nombreux pays à faible indicateur économique.

En France, le rapport du plan autisme 2018 ne propose qu’une estimation de la prévalence des TSA, égale à 1 enfant sur 100 et représentant 700 000 personnes atteintes (chiffres de l’Institut Pasteur). Aux Etats-Unis, cette prévalence est considérablement plus élevée avec 1 enfant sur 68 (1.47%) (CDC, 2008).

Le nombre de cas n’a cessé d’accroître depuis les années 1970 (Fombonne, 2003, 2009). On peut expliquer cette augmentation par plusieurs aspects : 1) la prise de conscience de ces troubles comme altérations biologiques et non plus comme pathologie psychologique ; 2) l’amélioration des méthodes de diagnostic qui ont été optimisées, avec un nombre de critères plus important et qui comprennent dorénavant les formes les plus légères de TSA, augmentant ainsi le nombre de personnes diagnostiquées ; 3) l’exposition quotidienne à de plus en plus de facteurs de risque tels que des substances tératogènes (pesticides, médicaments, perturbateurs endocriniens...). Pourtant, selon Maenner et al., cette prévalence aurait tendance à diminuer depuis le DSM-V, qui introduit les formes légères de TSA et propose que seulement 81.2% des

enfants diagnostiqués sous le DSM-IV répondraient aux critères de diagnostic de la nouvelle version (Maenner et al., 2014). De nouvelles études épidémiologiques sont nécessaires pour répondre à ces nombreuses questions.

## 4.2 Répartition inégale selon le sexe

La prévalence des TSA est inégale entre les hommes et les femmes. D'après Loomes et al. qui ont effectué une méta-analyse de nombreuses études épidémiologiques réalisées depuis l'entrée du DSM-IV, le ratio hommes-femmes des individus affectés par les TSA serait de 3:1 (Loomes et al., 2017). De nombreux scientifiques cherchent à expliquer ce ratio en déterminant s'il s'agit d'une vulnérabilité plus importante chez les hommes ou si les femmes disposent de facteurs protecteurs. A l'heure actuelle, aucune affirmation n'a pu être donnée, mais des hypothèses ont été proposées concernant des facteurs pouvant influencer ce ratio (McCarthy, 2016; Werling and Geschwind, 2013). Asperger décrivait déjà l'autisme comme étant « l'esprit masculin à son extrême » où « le profil masculin est accentué » justifiant ainsi le fait qu'il n'y ait pas, à cette époque, de filles diagnostiquées. Baron-Cohen, le Directeur du Centre de Recherche sur l'Autisme à Cambridge, en Grande Bretagne, appuie cette idée en 2003 (Baron-Cohen et al., 2003, 2005) en proposant la théorie controversée de l'« hypersystémisation » de l'autisme expliquant que le profil comportemental des garçons aurait davantage tendance à se traduire par un intérêt particulier aux mécanismes des systèmes par leur analyse et leur construction et que l'autisme serait l'amplification de ce trait caractéristique masculin. Il suggère, de plus, qu'il y aurait un lien entre l'autisme et une surproduction de testostérone. Des études ont montré des corrélations entre le niveau de testostérone fœtal et les scores obtenus lors de tests diagnostiques (Auyeung et al., 2006, 2009). Des analyses *post-mortem* de cerveau de patients atteints de TSA ont montré des taux de RAR-related orphan receptor alpha (RORa) inférieurs à la norme. RORa est un récepteur hormonal nucléaire qui fonctionne comme un facteur de transcription et qui

active l'aromatase, une enzyme qui convertit les androgènes en oestrogènes. Ceci pourrait alors expliquer ces niveaux plus élevés de testostérone (Sarachana et al., 2011). Cette élévation en testostérone a également été retrouvée chez des femmes atteintes du syndrome d'Asperger (Schwarz et al., 2011). Des contributeurs hormonaux seraient alors susceptibles de rentrer en jeu dans l'explication de ce ratio.

D'autre part, la génétique semble elle aussi jouer un rôle dans ce biais de genre contextuel des TSA. Une étude menée sur une mutation (délétion) du gène *SHANK1* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains*), codant pour une protéine synaptique et considéré comme un gène supposé des TSA, a montré que le nombre d'hommes diagnostiqués porteurs de cette mutation est supérieur à celui des femmes (Sato et al., 2012). En effet, au sein d'une famille de quatre générations, tous les hommes porteurs de cette mutation (n=4) ont été diagnostiqués avec des TSA ou des troubles du comportement s'en rapprochant tandis que les deux femmes porteuses de la mutation n'ont pas été diagnostiquées. Néanmoins, ces femmes présenteraient un comportement anxieux.

Même si plusieurs gènes candidats aux TSA sont situés sur le chromosome X : *FMRP* (*fragile X mental retardation protein*), *MECP2* (*methyl CpG binding protein 2*), *NLGN3* (*neuroligin 3*), *NLGN4X* (*neuroligin 4X-linked*), il est important de mentionner que la transmission des TSA au sein des familles ne respecte pas le profil de transmission gonosomique liée au chromosome X (Sato et al., 2012). Cependant, des analyses réalisées chez des sujets atteints d'aneuploïdies montrent que le taux de cas de TSA est augmenté dans certains syndromes et configurations méiotiques particulières suggérant un effet protecteur du chromosome X paternel : syndrome de Turner XO ~3% (Creswell and Skuse, 1999; Skuse et al., 1997), syndrome de Klinefelter XXY~10% (Bishop et al., 2011; Bruining et al., 2009; Tartaglia et al., 2010), syndrome 47 XYY ~20% (Bishop et al., 2011).

Il est également important de prendre en compte que les filles disposent d'une capacité plus grande à s'adapter et à gérer leurs relations sociales. En effet, une étude de Tierney met en évidence chez des adolescentes, une volonté à développer et maintenir des amitiés (Tierney et al., 2016). Elles développent ainsi des stratégies dans ce sens comme par exemple en portant un masque social ou en imitant autrui. Ceci implique une augmentation de la difficulté à déceler des TSA chez les filles. La possibilité pour certaines jeunes filles d'être sous-diagnostiquées pourrait également expliquer ce ratio entre les deux sexes.

### 4.3 Impact socio-économique

Les TSA ont été reconnus comme source de handicap en 1995 (Circulaire AS/EN n ° 95-12 du 27 avril 1995 Veil). « *Constitue un handicap, au sens de la présente loi, toute limitation d'activité ou restriction de participation à la vie en société subie dans son environnement par une personne en raison d'une altération substantielle, durable ou définitive d'une ou plusieurs fonctions physiques, sensorielles, mentales, cognitives ou psychiques, d'un poly handicap ou d'un trouble de santé invalidant* » (Loi n°2005-102 du 11 février 2005 – Art. L.114). Selon le rapport de la Cour des comptes de 2018, ~6.7 milliards d'€ des dépenses publiques seraient liés aux TSA. Ceci concerne le coût des prises en charge médico-sociales, psychiatriques, les affections de longue durée, ainsi que les allocations, les engagements de l'éducation nationale et l'impact de l'incapacité professionnelle (seul 0.5% des cas de TSA travaille en milieu ordinaire). Il faut également prendre en compte le coût pour les familles : financier (3000€ en moyenne par an) mais aussi moral. Les conséquences familiales peuvent être aussi très lourdes (arrêt des activités professionnelles d'un des parents, divorces...). Les coûts induits par une mauvaise prise en charge sont aussi à prendre en compte. Difficilement estimables, ils ne sont donc pas calculés en France. Cependant, ils ne sont pas négligeables. Ils concernent les défauts

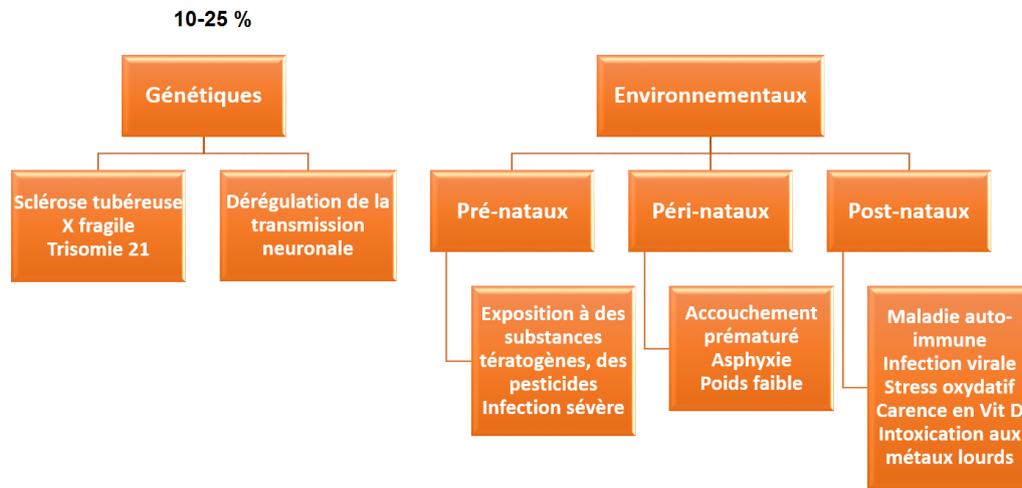
d'accompagnement (inadaptés, incomplets) qui ralentissent ou freinent l'évolution vers l'autonomie. Seulement un quart des enfants serait scolarisé en école « traditionnelle » sans aide spécialisée (Prado, 2012). Le rapport d'évaluation sur la politique de l'autisme de la Cour des comptes annonce que la moitié des personnes atteintes de TSA ont connu des ruptures de parcours (déscolarisation, rupture de prise en charge...). Selon l'étude de Hofvander et al. (Hofvander et al., 2009) sur des cas de TSA (autisme, syndrome d'asperger et TED) sans déficience intellectuelle, seulement 43% des adultes auraient une activité professionnelle ou seraient étudiants. Ainsi, trois types de coûts se distinguent: les dépenses provenant des autorités publiques, le coût pour les familles et enfin les coûts indirects engendrés par une mauvaise prise en charge et par le manque d'insertion professionnelle des sujets souffrants de TSA. Tous ces facteurs socio-économiques témoignent d'un réel problème de santé publique en France et au niveau mondial. Des efforts doivent être apportés dans la recherche de l'étiologie de ces troubles afin de proposer des nouvelles approches thérapeutiques, tant dans l'accompagnement des sujets atteints et des familles que dans la formation spécialisée de personnels de santé.

## **5. PHYSIOPATHOLOGIE**

### **5.1 Facteurs de risque**

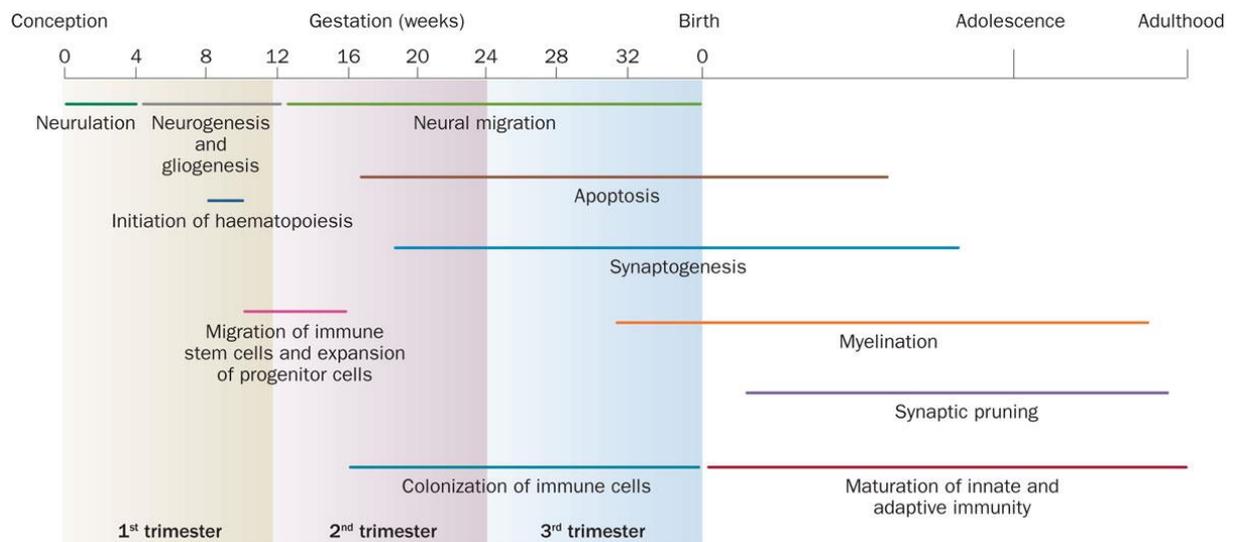
Les TSA sont une pathologie multifactorielle (voir figure 2). De nombreuses études suggèrent l'implication d'un nombre considérable de facteurs génétiques, tels que des mutations, dans l'étiologie de la maladie. Cependant, la grande majorité des facteurs de risque sont environnementaux, pouvant survenir à différents stades de développement cérébral (figure 3). De plus, il semblerait que l'interaction entre des gènes et des facteurs environnementaux jouerait un rôle crucial dans la physiopathologie des TSA. Je tiens à préciser que les facteurs

de risque énumérés dans cette partie ne constituent pas une liste exhaustive, seuls les plus avérés ou fortement soupçonnés seront présentés.



**Figure 2 : Exemples de facteurs de risque génétiques et environnementaux des troubles du spectre autistique**

Vit D : vitamine D



**Figure 3 : Périodes des différentes étapes de développement cérébral chez l'Homme**

Les différentes étapes de développement du cerveau et du système immunitaire humain sont hautement orchestrés depuis le début de la grossesse jusqu'à l'âge adulte (environ 25 ans). (Knuesel et al., 2014)

### 5.1.1 Facteurs de risque génétiques

L'influence génétique, épigénétique et environnementale dans le développement des TSA reste encore à ce jour le sujet de nombreuses investigations. Des études épidémiologiques ont largement révélé une contribution génétique importante comme facteur de risque. Faisant miroir à l'hétérogénéité phénotypique retrouvée chez les patients, les variations sur le plan génétique sont également très larges. En effet, l'architecture génétique des TSA est aussi bien diverse en fréquence (rare ou commune), qu'en type de variation (mutation d'un nucléotide, variation du nombre de copie d'un gène) ou en mode d'action (dominante, récessive ou additive).

#### 5.1.1.1 Hérité

Les TSA sont aussi une maladie à caractère familial et héréditaire (Bourgeron, 2015). La prévalence des TSA chez les frères et sœurs d'un enfant atteint est plus élevée que celle de la population générale, oscillant entre 2 et 8% (Muhle et al., 2004). Une large étude, entre 1982 et 2006, sur des enfants suédois a permis de calculer un risque relatif de récurrence des TSA de 10.3 au sein des familles dont un enfant était diagnostiqué (Sandin et al., 2014). Des études réalisées chez des jumeaux indiquent une concordance de 60-90% entre des jumeaux monozygotes contre seulement 10% entre des jumeaux dizygotes (Bailey et al., 1995; Bohm and Stewart, 2009) avec un risque relatif de 153 et de 8.2 respectivement (Sandin et al., 2014). Ces chiffres mettent en évidence l'existence d'une cause génétique plus qu'environnementale au sein de ces familles avec comme facteurs de risque le partage de certains gènes plutôt que le partage du même environnement.

### 5.1.1.2 Formes monogéniques

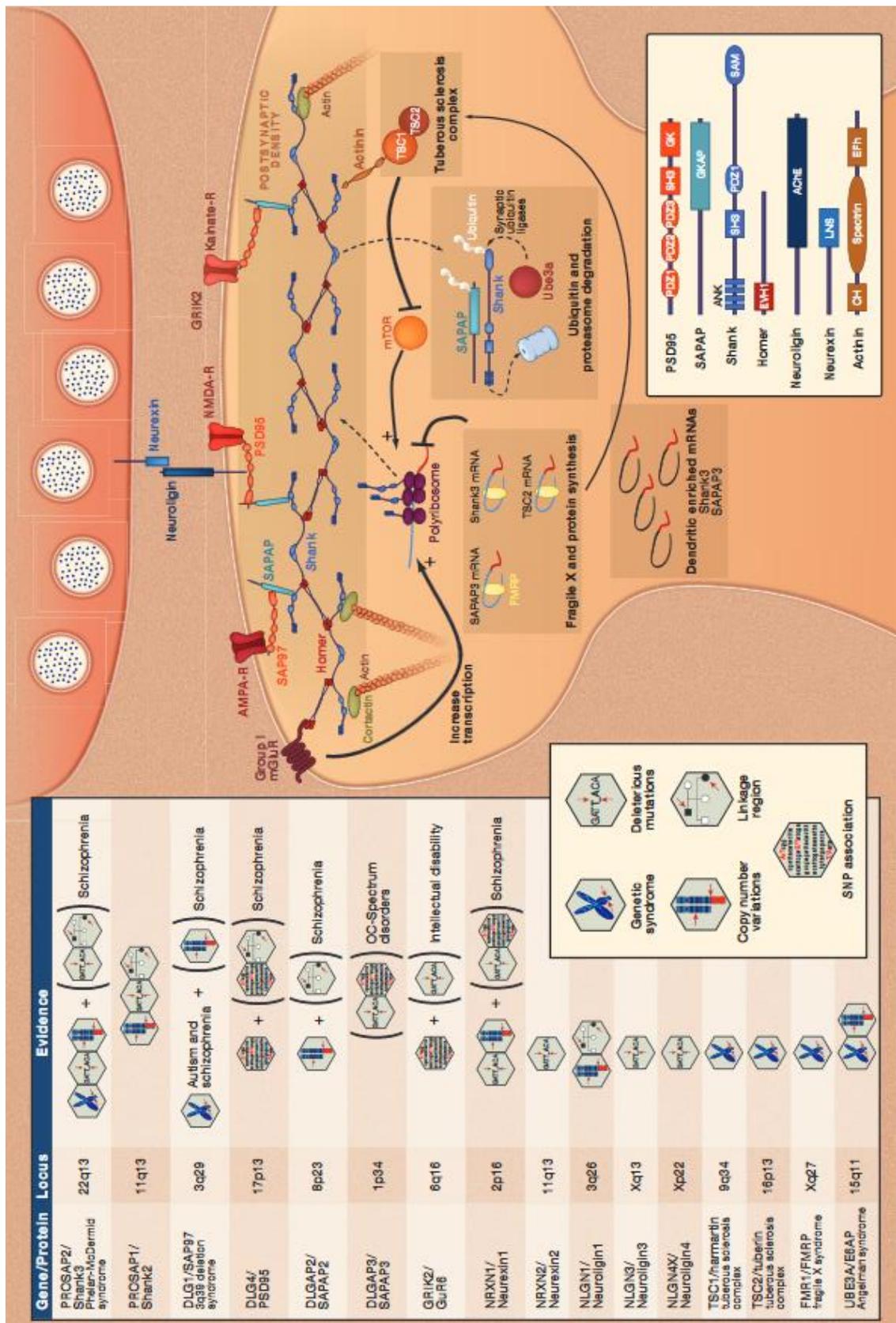
Les formes monogéniques concernent un nombre considérable de gènes (> 800), identifiés comme potentiels candidats responsables de TSA (pour revue Yin and Schaaf, 2017). Il faut savoir également qu'en général la prévalence d'une forme monogénique chez les cas de TSA ne représente pas plus de 1%. Ceci peut déjà témoigner de la variabilité importante des causes des TSA et de leur complexité. Cependant, grâce à des études réalisées chez des animaux mutants pour ces gènes, leur implication dans les TSA et certains mécanismes physiopathologiques, ont pu être déterminés. Il s'agit notamment de gènes codants pour des protéines synaptiques telles que les neuroligines (*NLGN*), les shanks (*SHANK*), les neurexines (*NRXN*), la contactin-associated protein-like 2 (*CNTNAP2*). Les mutations de ces gènes ne sont pas spécifiques des TSA car elles peuvent être retrouvées également au sein d'autres neuropathologies telles que la schizophrénie et la maladie Alzheimer (figure 4). Cependant, ces différentes conditions neuropsychiatriques partagent des symptômes communs : déficits cognitifs, expression des émotions limitée, manque de réciprocité sociale. Ainsi, des dysfonctionnements synaptiques sont considérés comme base commune à ces pathologies (Shankar et al., 2008; Stephan et al., 2009). Les neuroligines post-synaptiques participent avec les neurexines pré-synaptiques à la formation de synapses fonctionnelles (Dean and Dresbach, 2006). Elles interagissent entre elles pour former un complexe trans-synaptique requis pour une transmission neuronale efficace. Des mutations sur les gènes *NLGN3*, *NLGN4* ou *NRXN1* ont été identifiées chez des patients ayant des TSA. Ces données suggèrent donc l'implication d'une dérégulation synaptique dans l'étiologie (Feng et al., 2006; Jamain et al., 2003; Zhang et al., 2009). *CNTNAP2*, un autre gène de la superfamille des neurexines et codant pour une protéine de structure transmembranaire intervenant au niveau de l'interaction neurone-glie et jouant sur le regroupement des canaux potassiques sur les axones myélinisés. Elle est susceptible d'être mutée dans les TSA et de provoquer des troubles du langage (Alarcón et al., 2008; Arking et

al., 2008). Une autre famille de protéines synaptiques, les gènes *SHANK*, sont associés aux TSA. Ils codent pour des protéines d'échafaudage de la synapse glutamatergique participant à la densité post-synaptique, structure ayant pour rôle l'alignement des protéines membranaires à la surface post-synaptique. Les mutations sur le gène *SHANK3* responsables des TSA sont les plus étudiées (Durand et al., 2007; Moessner et al., 2007). Une étude au sein d'une famille porteuse de cette mutation a mis en évidence chez trois frères une absence de langage, de l'épilepsie, une déficience intellectuelle, ainsi que d'autres symptômes du spectre autistique (Nemirovsky et al., 2015). Ainsi, malgré la faible fréquence de ces mutations parmi tous les cas de TSA, l'hétérogénéité phénotypique et la variabilité des résultats des analyses génétiques, ces gènes associés à l'architecture synaptique sont des candidats importants à prendre en considération dans l'étude du développement des TSA. Ils font également l'objet d'approches pharmacologiques capables de moduler la synaptogénèse ou la plasticité synaptique pour atténuer les symptômes autistiques (Vorstman et al., 2014).

Certains symptômes des TSA sont notamment retrouvés dans des syndromes génétiques tels que le syndrome de l'X fragile, le syndrome de Rett, la sclérose tubéreuse, la neurofibromatose. Le syndrome de l'X fragile est la deuxième cause de retard mental génétique après le syndrome de Down (trisomie 21). Ce syndrome se manifeste chez les garçons par une hyperactivité, des déficits de l'attention, des troubles du langage et de la communication et par une anxiété sociale (Reiss and Hall, 2007). Il est causé par une expansion trinuécléotidique du codon CGC (guanine-cytosine-guanine : plus de 200 répétitions) sur le gène *FMR1* (*Fragile X mental retardation 1*) entraînant une méthylation anormale du gène localisé sur le chromosome X. Cette mutation provoque un déficit de la protéine FRMP qui est essentielle au fonctionnement des épines dendritiques. Le développement cognitif s'en retrouve altéré.

Environ 70% des filles atteintes par le syndrome de Rett sont porteuses d'une mutation sur le gène *MeCP2* situé sur le bras long du chromosome X, sur la région Xq28. Ce syndrome est

caractérisé par un arrêt du développement du cerveau entre 6 et 18 mois induisant une microcéphalie, une perte des acquisitions verbales et sociales, un retard mental, et d'autres symptômes tels que des crises épileptiques, une dyspraxie, des mouvements stéréotypés des mains. La sclérose tubéreuse et la neurofibromatose sont deux syndromes causés respectivement par des mutations des gènes *TSC1/TSC2* (*tuberous sclerosis 1/2*) et *NF1* (*neurofibromatose1*), pouvant induire des symptômes de type autistique. Ces gènes sont des suppresseurs de tumeur. Ils interviennent en inhibant la voie de signalisation mTOR (mechanistic target of rapamycin) qui favorise la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Des mutations dominantes de *TSC1* ou de *TSC2* provoquent un syndrome de sclérose tubéreuse caractérisé par une croissance neuronale anormale engendrant le développement de petites tumeurs bénignes dans le cerveau notamment. Ces tumeurs sont alors associées à des déficits cognitifs et des troubles autistiques. La mutation de *NF1* quant à elle entraîne un dysfonctionnement de la neurofibromine qui ne peut donc plus moduler la voie Ras. Ras est alors anormalement activée ce qui diminue l'activité inhibitrice du complexe TSC1/TSC2 sur mTOR et provoque alors l'apparition de tumeurs et des troubles cognitifs de types autistiques.



**Figure 4 : Protéines synaptiques potentiellement impliquées dans la physiopathologie des troubles du spectre autistique**

Abréviations : DLG : discs large MAGUK scaffold protein 4 ; DLGAP/SAPAP : Discs large associated proteins ; GRIK2 : Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2 ; MAGUK : membrane-

associated guanylate kinase ; PROSAP : Proline-rich synapse-associated protein ; PSD : post synaptic density ; SAP : synapse-associated protein ; UBE3A/E6AP : ubiquitin-protein ligase (E3A). (Peça et al., 2011)

### *5.1.1.3 Formes polygéniques*

Plus récemment, des formes polygéniques ont été identifiées comme étant associées aux TSA. Elles correspondent à la variabilité en nombre de copies d'un gène (CNV) qui consistent à une perturbation de l'architecture chromosomique soit par délétion soit par duplication, et qui concerne une région impliquant un ou plusieurs gènes. La probabilité de développer un TSA suite à un CNV particulier peut atteindre plus de 30% (ex : duplication 1q21.1 (Bernier et al., 2016)). Des études indiquent une fréquence augmentée de CNV chez des individus atteints de TSA en comparaison à des sujets contrôles avec de nombreux cas de CNV de novo suggérant une importante instabilité génomique (Glessner et al., 2009; Marshall et al., 2008; Sebat et al., 2007). La fréquence de ces CNV de novo dans les TSA représenterait entre 3 et 10% parmi les familles dont l'un des membres est diagnostiqués, contre seulement 1% chez les contrôles (Sebat et al., 2007).

Pourtant, la prévalence des CNV n'est estimée qu'à environ 1% de tous les cas de TSA (Pinto et al., 2010). Les CNV les plus retrouvés chez les patients concernent des délétions ou des duplications sur le chromosome 16, dans sa région 16p11.2 (Sanders et al., 2011; Weiss et al., 2008). D'autres CNV ont également été associés aux TSA : 1p.34.2 (Kumar et al., 2010), 2p.15-16.1 (Liang et al., 2009; Liu et al., 2011; Rajcan-Separovic et al., 2007), 15q13.2q13.3 (Miller et al., 2009), 15q13.3 (Pagnamenta et al., 2009). Ces CNV sont associés à une grande hétérogénéité de phénotypes incluant : des dysmorphies, une déficience intellectuelle, des troubles du langage, des déficits de l'attention, de l'hyperactivité, un comportement agressif, des troubles de l'humeur ainsi que d'autres troubles comportementaux, qui peuvent être la cause d'une incapacité sociale dans les TSA (Persico and Napolioni, 2013).

Les altérations génétiques telles que les CNV ou la mutation d'un nucléotide affectant des gènes potentiellement responsables des TSA sont retrouvés chez environ 10-25% des patients seulement (Huguet et al., 2013; Bourgeron, 2015). Ainsi, les causes de cette pathologie seraient majoritairement environnementales.

### **5.1.2 Facteurs de risque environnementaux**

Au regard des dernières décennies, force est de constater que la prévalence des TSA ne cesse de croître. Bien que les méthodes de diagnostic aient connu une nette amélioration, les chiffres liés aux TSA sont également associés à la multiplication des facteurs de risque environnementaux. La vulnérabilité face à des potentiels perturbateurs développementaux n'est alors qu'exponentielle. Des études suggèrent que des interactions entre certains gènes et les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans le développement de cette pathologie (Deth et al., 2008; Herbert, 2010). En effet, les facteurs environnementaux peuvent affecter l'expression des gènes sans provoquer de changement dans la séquence de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mais en agissant via des mécanismes épigénétiques : méthylation de l'ADN, acétylation des histones, expression d'acides ribonucléiques (ARN) non codants. Ainsi, une exposition à des facteurs environnementaux peut provoquer des changements dans l'expression de gènes clés, à une période critique pour le développement embryonnaire et fœtal résultant d'une augmentation du risque d'induire des TSA (Perera and Herbstman, 2011).

Ces facteurs de risque environnementaux sont répartis dans trois catégories selon la période pour laquelle ils sont susceptibles de perturber le développement d'un individu. On distingue ainsi la période prénatale, périnatale et postnatale.

#### **5.1.2.1 Vulnérabilité durant la période prénatale**

Potentiellement dangereux pour le développement de l'embryon ou du fœtus, les facteurs de risque peuvent survenir tout au long de la grossesse par le biais de la mère si elle est exposée à des agents tératogènes (polluants dans l'air, perturbateurs endocriniens, pesticides, médicaments, drogues, substances chimiques, métaux lourds...) (Carter and Blizard, 2016), si elle est victime d'une infection virale ou bactérienne ou encore si elle subit un stress important. Ces molécules ou celles produites en réponse à ces phénomènes (molécules pro-inflammatoires, agents pathogènes, cortisol) ont un fort pouvoir de traverser la barrière placentaire et sont donc susceptibles d'atteindre l'embryon ou le fœtus et de provoquer des troubles développementaux. En fonction de l'âge gestationnel, les conséquences embryo-fœtales sont différentes. Pendant la période embryonnaire (10 premières semaines) correspondant à l'organogénèse, le risque est alors malformatif. Pendant la période fœtale les agents pathogènes ont principalement un impact sur les phénomènes de maturation : retard de croissance et/ou altération fonctionnelle. Les TSA seraient liés à des effets de type fœtotoxiques donc causés par des perturbateurs externes agissant davantage sur la neurogénèse et la communication neuronale.

Une étude épidémiologique danoise réalisée en 2010 a montré un taux d'incidence des TSA multiplié par 2.98 parmi les enfants nés de mères exposées à un virus, par 1.42 chez les enfants dont la mère a été exposée à une bactérie, pendant la grossesse (Atladóttir et al., 2010). L'activation du système immunitaire maternel (MIA) induit une élévation des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine 6 (IL-6), prépondérante dans le système nerveux central, capable d'altérer le développement cérébral du fœtus et de provoquer des troubles comportementaux de type autistique (Smith et al. 2007). Vargas et al. ont démontré des taux de d'IL-6, d'IL-8, de monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) et d'interférons gamma (INF $\gamma$ ) augmentés dans le cerveau ou le liquide céphalo-rachidien d'individus atteints de TSA par rapport à des sujets sains (Vargas et al., 2005). Ces taux anormalement élevés engendrent une

dérégulation des réponses inflammatoires dans le système nerveux central, conduisant à des troubles développementaux.

Une méta-analyse indique que la médication pendant la grossesse augmente de 46% le risque que l'enfant développe des TSA et ce risque serait encore plus important suite à un traitement antiépileptique ou psychotrope (68%) (Gardener et al., 2009). Autre exemple avec le paracétamol, utilisé comme analgésique, une exposition prénatale du fœtus à cette molécule est corrélée aux TSA ( $r^2=0.80$ ) (Bauer and Kriebel, 2013).

Les conditions de la parentalité sont aussi clés dans l'explication des TSA. Même si les mécanismes intervenant n'ont pas encore été clairement déterminés, un âge avancé (> 34ans) (Durkin et al., 2008), un diabète (Gardener et al., 2009), ont été identifiés comme étant eux aussi des facteurs de risque.

#### *5.1.2.2 Vulnérabilité pendant la période périnatale*

Des études ont montré que la durée de la grossesse et le poids gestationnel ou natal pouvait être liés à un risque de développer des TSA chez l'enfant. Lampi et ses collaborateurs ont démontré un lien étroit entre la naissance prématurée (< 32 semaines), ou un faible poids (< 2500 g) avec un syndrome autistique ou des troubles envahissants du développement, suite à une étude menée en Finlande (Lampi et al., 2012). Cette même étude a également mis en évidence la relation entre une période de grossesse allongée (> 42 semaines) ainsi qu'un faible poids gestationnel avec un syndrome d'Asperger. Des complications obstétriques, comme par exemple une hypoxie provoquée par l'enroulement du cordon ombilical autour du cou du fœtus ou un accouchement par césarienne, sont également connues pour augmenter le risque d'affecter les capacités cognitives supérieures de l'enfant (Zhang et al., 2010a; Yip et al., 2017).

### *5.1.2.3 Vulnérabilité postnatale*

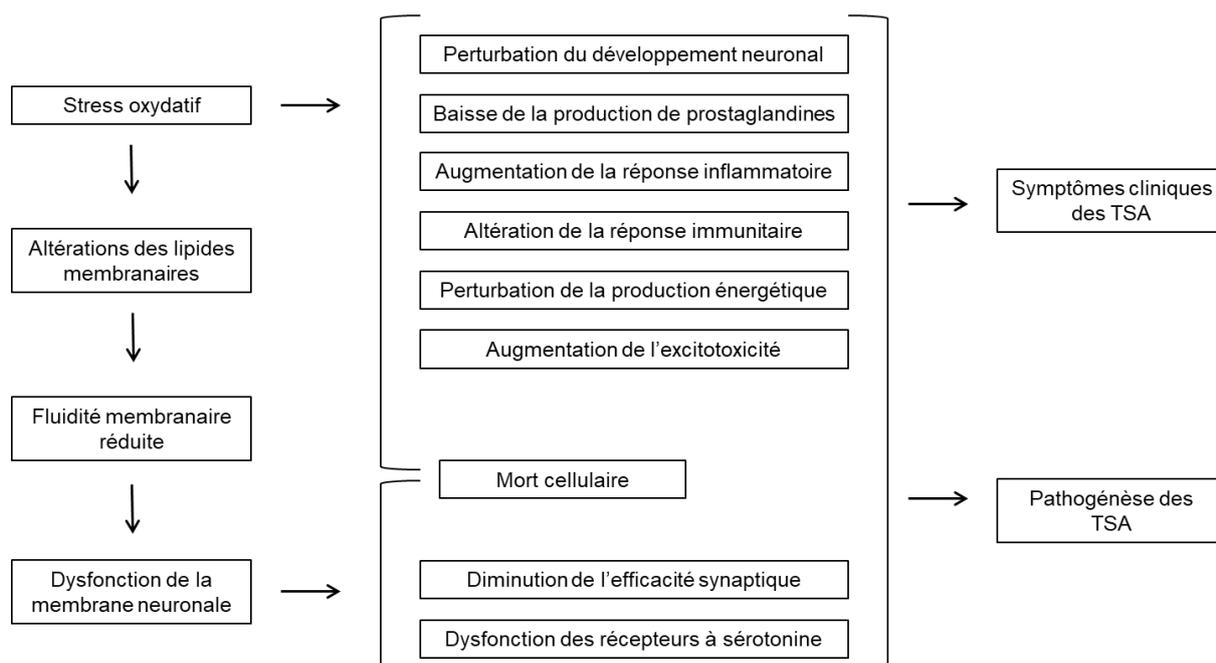
La synaptogénèse, qui se poursuit pendant la période post-natale (figure 3), est cruciale au développement normal du nourrisson. Elle correspond, suite à la surproduction de connexions nerveuses, à une période de sélection par dégénérescence des synapses à la naissance. Ce phénomène fait appel à certaines molécules essentielles dont la vitamine D, un neurostéroïde nécessaire aux processus de différenciation, de prolifération cellulaire, de signalisation calcique. Elle a également des activités neurotrophiques et neuroprotectrices (pour revue Groves et al., 2014). Elle semble donc jouer un rôle primordial dans la neurotransmission et la plasticité synaptique. Des études appuient l'hypothèse qu'une déficience en vitamine D durant la période fœtale ou néonatale pourrait être responsable de cas de TSA (pour revue Cannell, 2017).

L'apparition d'une infection est un des facteurs de risque les plus importants chez le nourrisson. Plusieurs études ont démontré que le développement d'une maladie virale infantile (varicelle, oreillons) ou bien d'une infection lors du premier mois (méningite, otite), était corrélé avec un très haut risque de provoquer un syndrome autistique (Bittker and Bell, 2018; Rosen et al., 2007). La surveillance doit donc être accrue lors de cette période afin d'éviter une trop forte fièvre qui pourrait induire d'importants processus inflammatoires dans le cerveau et engendrer de la mort neuronale. En effet, le système immunitaire périphérique et du système nerveux central interagissent par signalisation biochimique (pour revue Carabotti et al., 2015).

De plus en plus d'études s'intéressent au microbiote intestinal dont les perturbations peuvent être responsables de réponses immunitaires anormales dans le cerveau et de troubles du comportement, notamment de type autistique (Hsiao et al., 2013; Cryan and Dinan, 2015; Erny et al., 2015). Ces désordres gastro-intestinaux chez la descendance sont reconnus comme comorbidité des TSA (McElhanon et al., 2014). Ils peuvent survenir suite à une MIA ou suite

à des mécanismes auto-immuns. Des déséquilibres dans les niveaux des bactéries ont été identifiés : augmentation du nombre de bactéroïdètes et diminution de firmicutes (pour revue De Angelis et al., 2015). Ces modifications vont provoquer des perturbations de la perméabilité de la barrière intestinale, ce qui va engendrer une réponse inflammatoire avec une libération de cytokines pro-inflammatoires. Les intestins et le cerveau communiquent entre eux par trois voies bidirectionnelles : neuronale, hormonale et immune. Ainsi, les mécanismes induits par ces perturbations au niveau intestinal vont induire des réponses inflammatoires également au niveau cérébral. Des études ont montré que la perméabilité intestinale était significativement augmentée chez 36 à 43% des personnes atteintes de TSA (D'Eufemia et al., 1996; de Magistris et al., 2010).

L'exposition du nourrisson à certaines substances toxiques peut être responsable de complications développementales. Le plomb et le mercure peuvent causer une forte réponse inflammatoire et des dommages oxydatifs dans le cerveau (Valko et al., 2005; Goines and Ashwood, 2013; Yassa, 2014). En effet, le stress oxydatif apparaît être impliqué dans le développement des TSA en modifiant la constitution des membranes et la réponse inflammatoire, en perturbant l'énergie métabolique et en provoquant de l'excitotoxicité (figure 5) (pour revue Chauhan and Chauhan, 2006). Une exposition à des composés chimiques bromés ou au bisphénol A peut provoquer une toxicité mitochondriale par le biais notamment d'un stress oxydatif, ce qui va par la suite perturber la régulation énergétique dans le cerveau et induire divers dysfonctionnements (Napoli et al., 2013; Kaur et al., 2014). Les altérations mitochondriales sont souvent retrouvées chez les patients atteints de TSA (Rossignol and Frye, 2012).



**Figure 5 : Représentation schématique des potentiels mécanismes induits par le stress oxydatif et provoquant des dysfonctions neuronales et les symptômes des TSA**

(Traduit de Chauhan and Chauhan, 2006)

## 5.2 Facteurs protecteurs

Contrairement aux nombreux facteurs environnementaux susceptibles d'être liés aux TSA, d'autres facteurs ont été rapportés comme ayant un rôle protecteur. Il s'agit de molécules retrouvées dans l'alimentation qui, consommées précocement par la mère, réduiraient le risque que l'enfant soit atteint de TSA. Les acides gras polyinsaturés en font partie. Par exemple, les omega-3 et omega-6 sont notamment reconnus pour leurs rôles dans le développement rétinien et cérébral *in utero* (Haggarty, 2004), mais ils interviennent également à tout âge dans la transduction du signal, l'expression des gènes et la composition des membranes cellulaires (Deckelbaum et al., 2006; Cutuli, 2017). Les omega-3 sont également importants dans la plasticité synaptique et sont de puissants immunomodulateurs grâce à leur propriétés anti-inflammatoires en cas d'activation du système immunitaire (Layé, 2010; Labrousse et al.,

2012). Des études ont montré qu'un régime supplémenté en acides gras polyinsaturés pendant la grossesse pouvait réduire le risque de TSA de 34%. A l'inverse une carence en omega-3 augmenterait significativement ce risque (Lyall et al., 2013). Une étude chez l'animal a révélé que les omega-3 seraient capables par exemple de protéger le fœtus d'une activation du système immunitaire maternel et assurerait le développement normal du cerveau (Weiser et al., 2016). En outre, il a également été démontré qu'un régime riche en omega-3, chez des enfants et adolescents atteints de TSA, pouvait améliorer leur sociabilité et leur attention (Ooi et al., 2015). En revanche, d'autres études n'ont indiqué aucun changement dans le comportement d'enfants de 2 à 5 ans ou d'adultes de 18 à 40 ans (Politi et al., 2008; Mankad et al., 2015). Des études complémentaires sont donc nécessaires, afin d'évaluer le bénéfice des acides gras polyinsaturés dans le contexte des TSA.

## **6. APPROCHES THERAPEUTIQUES**

### **6.1 Approches pharmacologiques**

Les traitements médicamenteux ne procèdent pas à la guérison des TSA mais contribuent à la prise en charge globale afin d'atténuer voire même de pallier à certains symptômes qu'ils soient liés à la douleur, à des épilepsies ou à des comorbidités somatiques. Les méthylphénidates sont utilisés pour pallier aux déficits de l'attention avec ou sans hyperactivité (Ritaline, Concerta, Biphentin). Les antipsychotiques atypiques sont souvent prescrits contre divers troubles du comportement comme l'irritabilité et les stéréotypies (rispéridone, clozapine, halopéridol). La mélatonine peut être consommée pour réguler le sommeil. En cas de dépression et d'anxiété, les antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont préconisés. Cependant, ils ne sont pas toujours d'une efficacité significative chez les patients (King et al., 2009). Selon les cas, ces méthodes pharmacologiques ne sont employées qu'en seconde intention. Il n'y a pas de stratégies médicamenteuses particulièrement adaptées pour les personnes atteintes de TSA.

Une grande majorité des prescriptions concerne des médicaments qui n'ont d'ailleurs pas reçu d'autorisation de mise sur le marché pour cette indication dans ce genre de pathologie après des analyses spécifiques de leur efficacité chez des cas de TED. Il en revient alors au prescripteur d'évaluer le rapport bénéfice-risque car les effets indésirables des molécules comme les antipsychotiques sont fréquents.

## **6.2 Approches non pharmacologiques**

Les interventions comportementales thérapeutiques participent à la prévention d'un état anxieux ou dépressif des sujets ou encore d'autres troubles comportementaux associés au TSA, en accentuant sur les facteurs impliqués dans leur apparition. La prise en charge personnalisée des enfants mais aussi des adultes est nécessaire pour leur intégration sociale et scolaire. Des stratégies ont été mises en place dans le but de stimuler le développement des facultés cognitives et psychomotrices et l'acquisition de l'autonomie. Plusieurs programmes comportementaux (Treatment and Education of Autistic and related Communication Handicapped Children : TEACCH, Applied Behavior Analysis : ABA, Pictures Exchange Communication System : PECS, Denver...) ont été élaborés avec l'objectif de s'adapter à chaque cas, en examinant les capacités propres de chaque individu. La prise en charge est alors basée sur une méthode d'apprentissage qui favorise le renforcement des comportements adaptés et l'élimination progressive de ceux qui sont inadaptés. Il s'agit le plus souvent d'entretiens individuels ou d'interventions comportementales intensives (ICI) animés par un thérapeute afin d'améliorer les compétences communicatives, psychomotrices et sociales des patients. La synthèse de Reichow (Reichow, 2012), effectuée sur plusieurs méta-analyses indépendantes de l'efficacité des ICI, indique que la plupart de ces études ont démontré leur efficacité sur les

performances cognitives des enfants atteints de TSA lorsque la prise en charge débute suffisamment tôt.

## II. Modèles des troubles du spectre autistique chez le rongeur

Les TSA étant une maladie neurodéveloppementale, afin de pouvoir déterminer les causes et les mécanismes impliqués dans ces troubles cérébraux chez l'enfant, il est nécessaire de pouvoir réaliser des études à des stades très précoces. En contrepartie des techniques d'imagerie qui ont apporté des données fondamentales sur l'anatomie et l'activité cérébrales de patients diagnostiqués, les analyses à plus petites échelles requièrent du tissu cérébral qui ne peut être récupéré qu'en *post-mortem* (Courchesne, 1997a; D'Mello and Stoodley, 2015). Bien que l'espérance de vie moyenne des patients atteints de TSA soit plus faible que celle de la population générale, cette pathologie n'entraîne pas directement le décès des patients (Hirvikoski et al., 2016). Le nombre de cerveaux de cas de TSA dont peut disposer la communauté scientifique est insuffisant pour des analyses à différentes échelles, en fonction de l'âge, du sexe et du syndrome. Les modèles animaux sont donc des outils essentiels à la compréhension de l'étiologie des TSA car ils permettent : (i) une exploration multiple sur un même animal : comportementale, anatomique, cellulaire, moléculaire et électrophysiologique ; (ii) des analyses dès le stade embryonnaire, lors des étapes de différenciation cellulaire, dans le but de déterminer les perturbations développementales à l'origine des troubles ; (iii) la mise en évidence des réseaux neuronaux qui sous-tendent les symptômes au travers de l'identification de marqueurs physiopathologiques ; (iv) le développement d'approches thérapeutiques.

Les modèles les plus courants sont des rongeurs, pour des raisons :

- de facilité d'hébergement et de reproduction avec un coût raisonnable,
- d'aisance à la manipulation génétique et environnementale,
- de reproductibilité des résultats,
- d'homologies des structures cérébrales avec l'être humain.

Concernant les homologies, il est vrai que le meilleur modèle reste le primate non humain.

Cependant, cet animal est très contraignant en terme :

- d'hébergement car il nécessite des coûts plus élevés et des espaces plus adéquats,
- de facilité d'expérimentation du fait de sa taille et de sa force physique,
- de durée des études en raison de la durée de gestation et de son espérance de vie relativement longues.

Certaines études utilisent le poisson zèbre pour définir rapidement et facilement le rôle de certains gènes communs sur le comportement social par exemple, ou pour tester des moyens pharmacologiques de corriger ces troubles. Enfin, les modèles cellulaires, dont les cellules souches, peuvent être employés pour étudier directement l'effet d'une mutation sur une voie de signalisation ou sur la différenciation cellulaire.

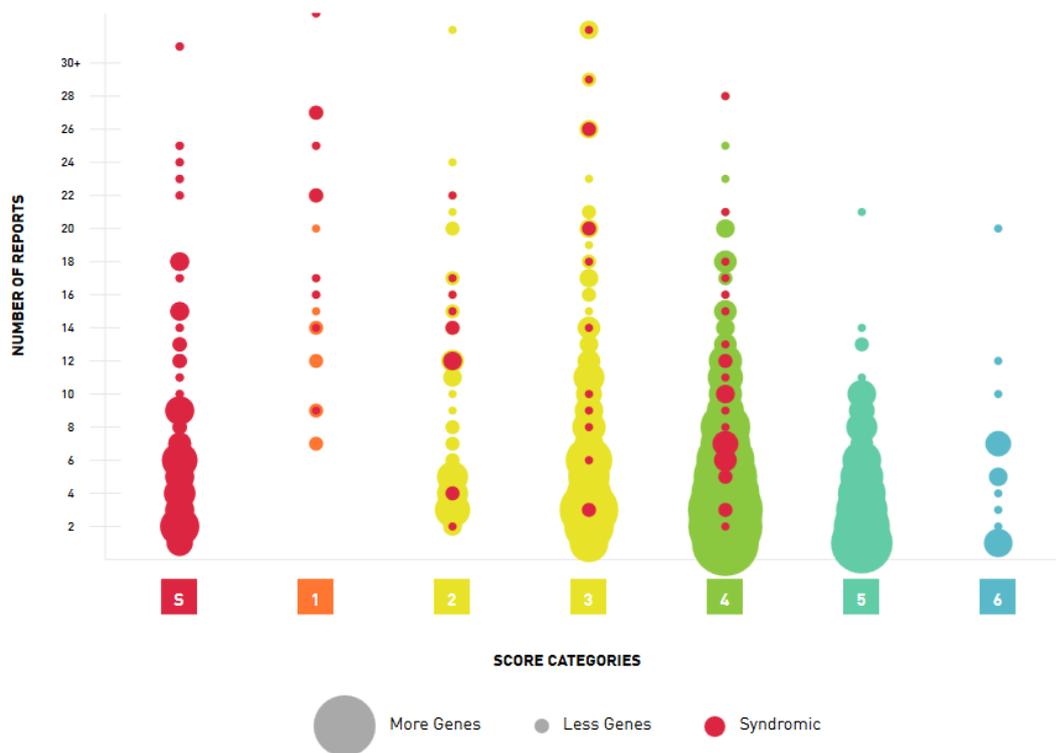
Il est important de rappeler que les principaux facteurs de risque des TSA sont liés à des mutations génétiques et à une exposition in utero à des molécules tératogènes. Dans ce chapitre, je présenterai les modèles les plus couramment utilisés chez le rongeur pour des études sur les TSA en distinguant deux catégories : les modèles génétiques et les modèles environnementaux.

## **1. MODELES GENETIQUES**

Toute une panoplie de modèles génétiques associés aux TSA ont été développés sur la base des gènes identifiés comme mutés chez des patients et des familles dont l'un des membres est atteint de TSA. Il s'agit principalement de gènes codants des protéines impliquées dans la formation des synapses, la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique et la plasticité. Ainsi, les modèles génétiques sont très importants dans la détermination du rôle de certains gènes dans cette pathologie. Cependant, les TSA sont des désordres multifactoriels influencés

par des combinaisons de gènes. Ainsi, les modèles mutants pour un gène associé aux TSA ne sont pas reconnus comme des modèles capables de générer toutes les caractéristiques de cette pathologie, qu'elles soient phénotypiques ou histologiques. Cependant, les modèles d'inactivation d'un gène (knock-out ou KO) ont l'avantage de pouvoir déterminer directement la relation de cause à effet entre l'absence de codage pour une protéine donnée et le comportement observé ou les conséquences physiologiques. De plus, les modèles génétiques permettent d'étudier les effets de molécules pharmacologiques sur la restauration des déficits observés. D'autres modèles de type CNV ou mutations de novo viennent compléter le tableau en se référant aux données épidémiologiques.

Selon la Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI) différentes catégories de gènes associés aux TSA sont distingués en fonction de l'implication : les gènes syndromiques, les gènes de haute confiance, les gènes candidats, les gènes supposés, les gènes hypothétiques, les gènes réfutés (figure 6). Dans cette partie, seuls quelques exemples de modèles sont présentés.



**Figure 6 : Distribution des gènes potentiellement responsables des troubles du spectre autistique**

Selon le classement défini par la Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI). Un gène est représenté par un point. S : gènes syndromiques ; 1 : gènes de haute confiance ; 2 : gènes candidats ; 3 et 4 : gènes supposés ; 5 : gènes hypothétiques ; 6 : gènes réfutés

### 1.1 Mutations de gènes syndromiques

Les gènes syndromiques des TSA sont définis comme des gènes de prédisposition dans un contexte de désordre syndromique de type TSA (ex : syndrome du X fragile). Ces gènes ont été pour la plupart préalablement présentés dans le chapitre 1 : *CNTNAP2*, *FMR1*, *MECP2*, *NF1*, *SHANK3*, *TSC1/2*, *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*). Les conséquences symptomatiques et physiologiques d'une mutation de ces gènes sont présentées dans la table 3, ainsi que les résultats obtenus suite à des approches thérapeutiques.

Mutation	Symptômes des TSA présentés	Caractéristiques physiologiques	Approche thérapeutique et Restauration des déficits
<i>Cntnap2</i>	Comportement répété et stéréotypé Déficits des interactions sociales Troubles de la communication vocale Crises épileptiques Hyperactivité	Migration anormale des neurones corticaux Neurones ectopiques dans le corps calleux Pertes en interneurons GABA dans le cortex, le striatum et l'hippocampe. Activité électrophysiologique perturbée des neurones corticaux.	La rispéridone améliore l'hyperactivité et les comportements répétés
<i>Fmr1</i>	Déficits de l'attention Anxiété sociale et déficits de la cognition sociale Vocalisations diminuées Crises épileptiques	Suractivation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques mGluR5 Internalisation des récepteurs AMPA Diminution de l'expression de la sous-unité GABAa Déficits des interneurons GABA exprimant la parvalbumine Malformations structurelles des protrusions dendritiques (de Esch et al., 2015; de Vrij et al., 2008).	Restauration du phénotype dendritique suite au croisement de souris <i>Fmr1</i> <sup>-/-</sup> avec des mutantes pour mGluR5 (Dölen et al., 2007). Des antagonistes de mGluR5 permettraient aux dendrites des neurones pyramidaux hippocampiques de retrouver une taille normale (Pop et al., 2014). Amélioration de l'apprentissage et de la réponse aux stimuli auditifs suite à réduction de l'expression du BDNF.
<i>Mecp2</i>	Comportement répété et stéréotypé EEG perturbée et épilepsie	Diminution de l'expression de GAD65/67 dans le cortex Réduction des mIPSCs corticaux	La préservation de MecP2 dans les neurones cholinergiques améliorerait certains symptômes tels que l'hypolocomotion et l'anxiété (Zhou et al., 2017)
<i>Nf1</i>	Trouble de l'apprentissage spatial Suractivation de la voie Ras dans les interneurons pendant l'apprentissage Libération anormale de GABA	Suractivation de la voie de signalisation de Ras dans les interneurons entraînant une libération anormale de GABA	L'inactivation de la voie de Ras ou la diminution de l'inhibition induite par le GABA améliorerait l'apprentissage. Les statines reverseraient les difficultés d'apprentissage et les troubles de la mémoire
<i>Shank3</i>	Toilettage répété Baisse de la sociabilité, comportement répété, apprentissage et mémoire altérés	Epines dendritiques anormales Réduction de la réponse des récepteurs NMDA et faible acétylation des histones dans le cortex frontal	Les déficits sociaux et l'hypoactivité des NMDA sont restaurés par des inhibiteurs de l'histone déacétylase MS-275 (Ma et al., 2018) ou par des inhibiteurs de cofilin (Duffney et al., 2015)
<i>Tsc1</i> <i>Tsc2</i>	Difficultés d'apprentissage et de mémorisation, anxiété, Réduction de l'exploration sociale et des vocalisations Epilepsie	Diminution de l'activation de mGluR5 Atteinte de la morphologie et de la densité des épines dendritiques Augmentation de l'excitabilité corticale	L'inhibiteur de mTOR Rapamycine restaurerait la sociabilité et l'apprentissage spatial ainsi que le nombre de PC (Weisenfeld et al., 2013, 2013) Un agoniste des récepteurs mGluR5 restaurerait les symptômes autistiques.
<i>PTEN</i>	Baisse de la sociabilité Hyperactivité Réponse inappropriée aux stimuli sensoriels Epilepsie	Hypertrophie neuronale, Macrocéphalie Prolifération cellulaire excessive Croissance dendritique et axonale anormale	Un traitement à la rapamycine réduirait l'hypertrophie des neurones et diminuerait les crises épileptiques (Ljungberg et al., 2009)

**Table 3 : Exemples de modèles animaux transgéniques pour un gène syndromique** (Légende ci-contre)

GABA: acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; mGluR5 : Metabotropic glutamate receptor 5 ; NMDA: N-methyl-D-aspartate ; GAD: Glutamic acid decarboxylase ; AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid ; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor. (D'après Provenzano et al., 2012; Yoo, 2015)

## 1.2 Mutations de gènes de haute confiance/ de forte évidence

Ces gènes ont été classés ainsi suite à des études statistiques ayant mis en évidence une forte probabilité d'association entre la mutation de ces gènes et des cas de TSA. Ceci inclut les gènes *RELN* (*reelin*), *TBR1* (*T-box, brain*).

- *RELN*

Le gène *RELN* code pour la reeline, une sérine protéase de la matrice extracellulaire qui intervient dans le développement en régulant la migration cellulaire et la dendritogénèse. Elle est également essentielle à l'âge adulte puisqu'elle joue un rôle dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Une diminution de son expression a été démontrée chez des patients TSA (Fatemi et al., 2005). Une délétion de 150 kb sur un des allèles de ce gène chez la souris génère le modèle *Reeler*. Ces souris manifestent de nombreux symptômes autistiques tels que des déficits sociaux (Macrì et al., 2010), des difficultés d'apprentissage spatial, de l'anxiété et des stéréotypies (Salinger et al., 2003). Leur volume cérébral est réduit et la taille des ventricules est augmentée (Mariani et al., 1977). Au niveau du cervelet, la foliation est altérée et le nombre des cellules de Purkinje est réduit. Une migration neuronale anormale est également constatée de même que dans d'autres régions du cerveau : l'hippocampe et l'amygdale (Boyle et al., 2011). Des altérations du système GABAergique auraient été constatées chez ces souris avec une diminution du nombre de neurones corticaux exprimant GAD67 (Liu et al., 2001) et du nombre d'interneurones exprimant la parvalbumine (Macrì et al., 2010).

- *TBR1*

Ce gène fait partie d'une famille de gènes qui partage un domaine commun de fixation à l'ADN : le domaine T-box. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de nombreux phénomènes développementaux (migration neuronale, projection axonale) (Papaioannou, 2014).

Une déficience de protéine Tbr1, chez des souris dont un allèle du gène est muté, provoque des projections axonales défectueuses des neurones de l'amygdale, des déficits d'interactions sociales, des vocalisations, une flexibilité cognitive altérée (Huang et al., 2014).

### 1.3 Mutations de gènes candidats

Des études ont démontré également un lien potentiel entre ces gènes candidats et le développement de TSA.

- *GABRβ3*

Les gènes *GABR* (Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits) situés sur le chromosome 15q11-13 codent pour les sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> : GABRβ3, GABRα5 et GABRγ3. Une délétion ou une duplication de ces gènes peut conduire à de multiples troubles neurodéveloppementaux chez l'Homme, notamment des TSA (Hogart et al., 2007). Des souris mutantes pour le gène codant pour la sous-unité GABRβ3 (*Gabrβ3*<sup>-/-</sup>) manifestent une sociabilité et une exploration diminuées, des difficultés d'apprentissage et des troubles de la mémoire, des performances motrices réduites, des crises épileptiques potentielles, de l'hyperactivité (DeLorey et al., 2008; Homanics et al., 1997). Sur le plan neuroanatomique, une hypoplasie du cervelet a été observée.

- *CNTN4*

La protéine contactine 4 est une molécule d'adhésion axonale appartenant à la famille des contactines. CNTN4 joue un rôle fondamental dans la formation des connections axonales au cours du développement (Fernandez et al., 2004). Il existe différentes mutations du gène *CNTN4* potentiellement à l'origine de troubles neurodéveloppementaux tels que les TSA (Roohi et al., 2009). Cependant, aucun symptôme des TSA n'a été retrouvé chez des souris mutantes pour ce gène. Les souris *Cntn4*<sup>-/-</sup> présentent des projections anormales des neurones sensoriels olfactifs vers les glomérules ce qui suggère le rôle de guidage axonal de la protéine dans l'établissement des circuits neuronaux olfactif. De façon intéressante, des études ont montré une perturbation des fonctions olfactives chez divers cas de psychiatrie et de troubles neurodéveloppementaux incluant les TSA (Bennetto et al., 2007; Suzuki et al., 2003).

- *NRXN1*

Comme mentionné précédemment, ce gène est retrouvé muté chez un grand nombre d'individus atteints de TSA et serait susceptible d'être impliqué dans l'étiologie de cette pathologie. La mutation du gène codant pour la neurexine 1 $\alpha$  chez des souris provoquerait un dysfonctionnement dans la transmission glutamatergique au niveau de l'hippocampe (Etherton et al., 2009). Au niveau comportemental, des mouvements répétés de toilette et un désintérêt pour la construction du nid ont pu être observés. En revanche, le comportement social et l'apprentissage spatial était équivalent au groupe contrôle et une amélioration de l'apprentissage moteur a même été constatée chez le modèle.

## 1.4 Mutations de gènes supposés

Dans la littérature, des données révèlent de possibles relations entre la mutation de certains gènes et des troubles neurodéveloppementaux en fonction du rôle de ces gènes. Quelques exemples de ces gènes et des conséquences symptomatiques et physiologiques de leur mutation sont présentés dans la table 4.

Gènes	Symptômes	Caractéristiques physiologiques
<b>NLGN1</b>	Comportement répété, trouble de l'apprentissage spatial et de la mémoire Baisse de la sociabilité	Activité GABAergique/glycinergique et glutamatergique diminuées Réduction de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe Réduction du ratio des récepteurs glutamatergiques NMDA/AMPA au niveau de la synapse cortico-striatale Réduction des niveaux de neurexines.
<b>NLGN4X</b>	Trouble des interactions sociales Réduction des vocalisations	Diminution du volume cérébral Altération de la transmission synaptique GABAergique Trouble de l'activité dans l'hippocampe Perte de l'activité glutamatergique dans la voie thalamo-corticale (Unichenko et al., 2018)
<b>NRXN2</b>	Déficits sociaux Anxiété Comportements répétés chez les femelles (Dachtler et al., 2014)	Altération de la fonction synaptique excitatrice (Born et al., 2015; Dachtler et al., 2014)
<b>EN2</b>	Déficits sociaux Problèmes de coordination Difficultés d'apprentissage et de mémorisation (Cheh et al., 2006)	Foliation du cervelet perturbée Réduction du nombre de PC Niveau élevé de sérotonine dans le cervelet (Cheh et al., 2006)

**Table 4 : Exemples de modèles animaux transgéniques pour un gène supposé**

(Provenzano et al., 2012)

## 2. MODELES BASES SUR DES FACTEURS DE RISQUE PRENATAUX

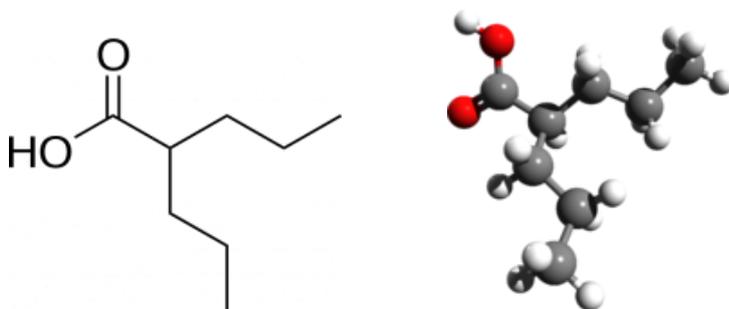
Nous avons vu dans le chapitre 1 qu'il existe un nombre important de causes environnementales (toxiques, infectieuses, métaboliques, hormonales...) susceptibles d'induire des troubles neurodéveloppementaux. La majorité survient pendant la grossesse. En effet, le fœtus se retrouve via le placenta exposé à de nombreux facteurs de risque. Certains facteurs de risque

sont alors devenus des outils dans l'élaboration de modèles animaux plus pertinents afin de permettre de mieux comprendre l'étiologie des TSA.

Dans cette partie, je présenterai deux modèles d'exposition prénatale reconnus comme modèles des TSA et qui ont fait l'objet dans cette thèse d'une caractérisation neuroanatomique des régions régulant la motricité. L'un est pharmacologique, associé à un traitement médicamenteux et l'autre est infectieux, causé par l'activation du système immunitaire maternel.

## 2.1 Modèle d'exposition *in utero* à une substance pharmacologique

L'acide valproïque, ou valproate (VPA) (figure 7) est une molécule couramment utilisée dans l'obtention d'un modèle environnemental des TSA, par traitement *in utero*. Ce modèle résulte des données cliniques reçues suite à la mise sur le marché du médicament Dépakine® comme principal traitement antiépileptique, en phase de pharmacovigilance.



**Figure 7 : Structure moléculaire de l'acide valproïque**

### 2.1.1 Intérêt pharmacologique de l'acide valproïque

Le VPA est une molécule dont le pouvoir anticonvulsif a été découvert en 1962 par Meunier sur des modèles animaux de crises convulsives (Löscher, 1999). En 1967, la molécule est mise sur le marché en France comme traitement contre les épilepsies. Les épilepsies sont parmi les

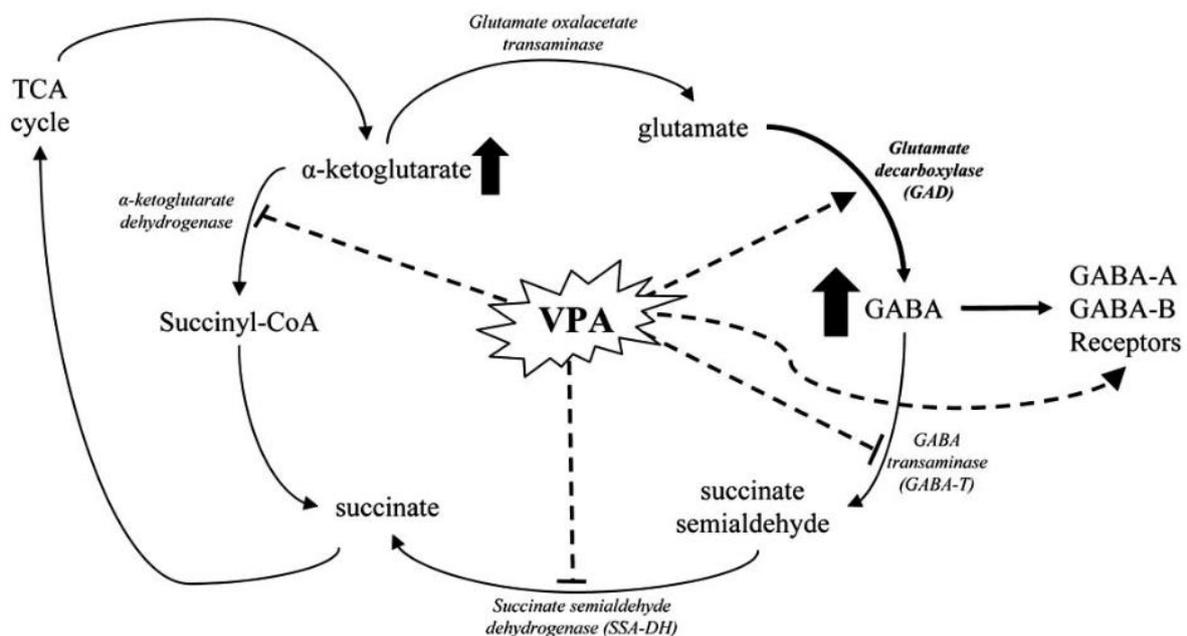
troubles neurologiques les plus fréquents. En effet, plus de 50 millions de personnes à travers le monde en sont atteintes (Scheuer and Pedley, 1990). Il s'agit d'une pathologie chronique, généralement progressive. Les crises, causées par une activité électrique anormale du cerveau, peuvent se déclencher périodiquement mais de manière imprévisible. L'intérêt particulier du VPA réside dans son efficacité contre différents types de crises épileptiques. Son utilisation se répand alors successivement dans plus de 100 pays (en 1978 aux Etats-Unis) et le VPA devient la molécule de référence pour la thérapie pharmacologique des épilepsies. Suite à d'autres études cliniques, cette molécule s'est révélée également intéressante pour traiter d'autres pathologies comme les troubles bipolaires, les migraines ou les troubles de l'humeur.

### **2.1.2 Mécanismes d'action de l'acide valproïque**

Dans le système nerveux, le GABA tient un rôle primordial dans l'inhibition de l'activité neuronale. C'est la perturbation de la neurotransmission GABAergique inhibitrice qui est souvent responsable des crises convulsives (Löscher, 1989). Comme la plupart des anticonvulsifs, le traitement au VPA potentialise le système GABAergique en augmentant de manière conditionnelle son activité inhibitrice. Son action est multiple (figure 8). Suite à sa métabolisation dans le tractus gastro-intestinal, sa forme ionique (4-ene-VPA) se lie aux enzymes de dégradation du GABA (uniquement lorsque les niveaux sont trop élevés) : la GABA transaminase et la succinate semialdehyde deshydrogenase (SSA-DH), afin d'inhiber leur action. Il participe à l'augmentation de l'activité de la glutamic acid decarboxylase, une enzyme de synthèse du GABA (Löscher et al., 1981). Le VPA empêche également la recapture du GABA en modulant l'action des transporteurs au niveau des cellules gliales et des terminaisons neuronales. Ainsi, une plus grande concentration de GABA est retrouvée dans la synapse, ce qui augmente alors l'activité inhibitrice exercée sur les neurones. Le VPA peut

aussi réduire directement l'activité électrique des neurones glutamatergiques en inhibant les canaux sodium voltage-dépendants à leur surface, empêchant alors la dépolarisation et la libération du glutamate dans la fente synaptique (Farber et al., 2002).

De plus, il a été démontré que le VPA inhibe les histones déacétylases (HDAC) de classe I et II (Gurvich et al., 2004), une enzyme régulant la conformation de la chromatine pour réguler la transcription des gènes, ce qui lui confère un atout majeur dans le traitement des cancers (Göttlicher et al., 2001).



**Figure 8 : Mécanismes d'action de l'acide valproïque sur le métabolisme du glutamate et du GABA**

Les lignes en pointillé indiquent l'effet inhibiteur du VPA sur les enzymes ciblées ( $\perp$  : inhibition ;  $\rightarrow$  : induction). Les flèches pleines pointant vers le haut indiquent que le VPA induit l'augmentation de  $\alpha$ -cétoglutarate et du GABA ; TCA : tricarboxylic acid cycle ou cycle de Krebs. (Monti et al., 2009)

### 2.1.3 Toxicité de l'acide valproïque

De nombreux effets secondaires du VPA ont été mis en évidence comme des risques hépatiques ou pancréatiques. Ici, nous nous intéresserons davantage aux risques tératogènes de cette molécule. Le VPA est rapidement absorbé par la paroi gastro-intestinale et retrouvé en grande

quantité dans le plasma. Sabers et Tomson ont démontré que malgré une baisse de la concentration de VPA totale de 25 à 50%, la concentration de VPA non liée aux protéines du plasma, soit la part de molécules actives, ne variait pas (Sabers and Tomson, 2009). Ainsi, les échanges de la mère à l'enfant favorisent la présence de VPA chez le fœtus. Jeong *et al.* ont réalisé différents dosages, après administrations répétées de VPA chez des femelles singe gestantes, dans le placenta, le liquide amniotique et chez le fœtus afin d'analyser ces échanges (Jeong et al., 2010). Ils ont démontré que selon la dose administrée, la concentration de VPA métabolisé retrouvée dans le liquide amniotique pouvait atteindre jusqu'à 14% de la concentration plasmatique maternelle. Dans le placenta, ce ratio pouvait osciller entre 32.6 et 42.5%. Chez le fœtus, des concentrations de plus de 20% ont pu être mesurées. Ainsi, le VPA présent chez le fœtus, serait susceptible d'y trouver des cibles et donc de provoquer des perturbations du développement. En effet, 10 à 20 fois plus de cas de retard mental, d'anomalies faciales ou de malformations du tube neural (spina bifida, anencéphalie, méningomyélocèle) ont été déclarés suite à la prise de VPA comme traitement antiépileptique lors de la grossesse et plus particulièrement pendant le premier trimestre (Ornoy, 2009). Plusieurs études ont mis en évidence le haut risque pour l'enfant de développer des TSA suite à cette prise du VPA par la mère (Christensen et al., 2013). En effet, de nombreux symptômes ont été observés chez des enfants exposés : retard mental et psychomoteur, déficits cognitifs, difficultés de langage, dimorphisme, troubles de la motricité globale (retard de l'assise, de la marche et plus tard de l'apprentissage du vélo) (Christianson et al., 1994; Moore et al., 2000).

#### **2.1.4 Pertinence comme modèle des troubles du spectre autistique**

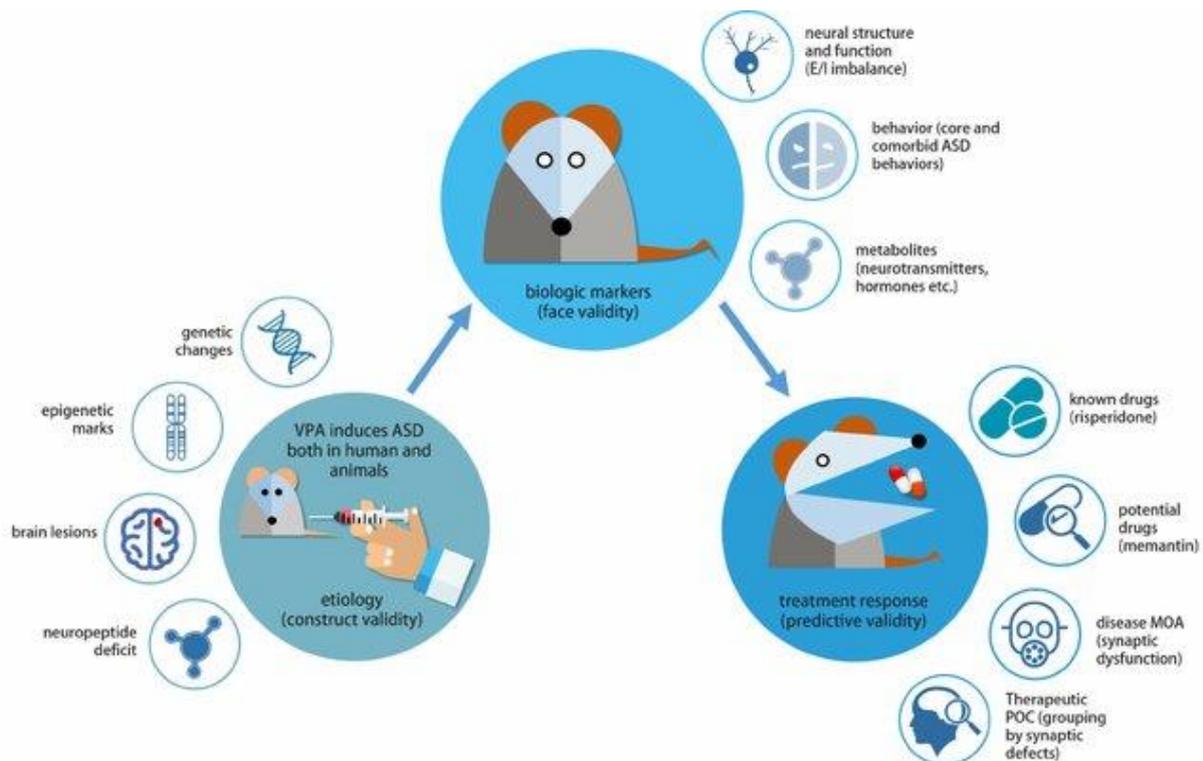
Les mécanismes impliqués dans ces effets tératogènes induits par le VPA n'ont pas encore été clairement élucidés. Néanmoins, quelques pistes ont récemment émergé suite à des études chez l'animal. En effet, l'hyperacétylation des histones H3 et H4 induite par l'activité inhibitrice du

VPA sur la HDAC a été démontrée comme tératogène par Phiel et al. sur des embryons de xénope (Phiel et al., 2001). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Moldrich et al. sur des souris (Moldrich et al., 2013). Leurs travaux ont également permis de mettre en évidence le lien direct entre ce mécanisme et le développement de TSA. Afin de pouvoir clairement définir la physiopathologie des TSA induite par le VPA, les chercheurs ont mis en place un modèle d'exposition prénatale à l'acide valproïque chez le rongeur. Ce modèle reproduit directement les observations cliniques observées de l'augmentation par 10 du risque de développer des TSA suite à une exposition prénatale à cette molécule (Moore et al., 2000; Rasalam et al., 2005). L'injection de VPA chez des souris ou des rattes gestantes induit systématiquement un syndrome de type autistique dans la descendance (Rodier et al. 1996) tels que des déficits d'interaction sociale (Kim et al., 2014a, 2014b; Schneider and Przewlocki, 2005), des comportements répétés et stéréotypés (Gandal et al., 2010; Kim et al., 2014a) et un développement retardé des capacités motrices (Main and Kulesza, 2017; Schneider and Przewlocki, 2005) même si cet aspect des performances motrices n'a que très peu été étudié jusqu'à aujourd'hui. D'un point de vue cellulaire et moléculaire, on retrouve chez ce modèle une perte des cellules de Purkinje (Main and Kulesza, 2017) comme constaté chez l'Homme (Bailey et al., 1998; Skefos et al., 2014; Wegiel et al., 2014). Ces modèles animaux ont démontré qu'une seule exposition au VPA durant les stades précoces de l'embryogénèse, plus précisément à E12.5 lorsque le tube neural est fermé et que les 5 vésicules se développent, est suffisante pour induire des troubles neurodéveloppementaux de type TSA (Gandal et al., 2010; Moldrich et al., 2013).

Sur le plan pharmacologique, des études ont montré l'effet bénéfique de certains traitements prescrits à des patients atteints de TSA (le donepezil : inhibiteur de cholinestérase ; le ciproxifan : antagoniste des histamines H3) sur le comportement social et répété de souris prénatalement exposées au VPA (Kim et al., 2014a; Baronio et al., 2015).

Une autre étude a montré que les performances d'apprentissage et de sociabilité de rats VPA pouvait être récupérées suite à un hébergement en milieu enrichi (Schneider et al., 2006).

Ces données appuie l'hypothèse que des animaux exposés *in utero* au VPA peuvent constituer un modèle pertinent des TSA.



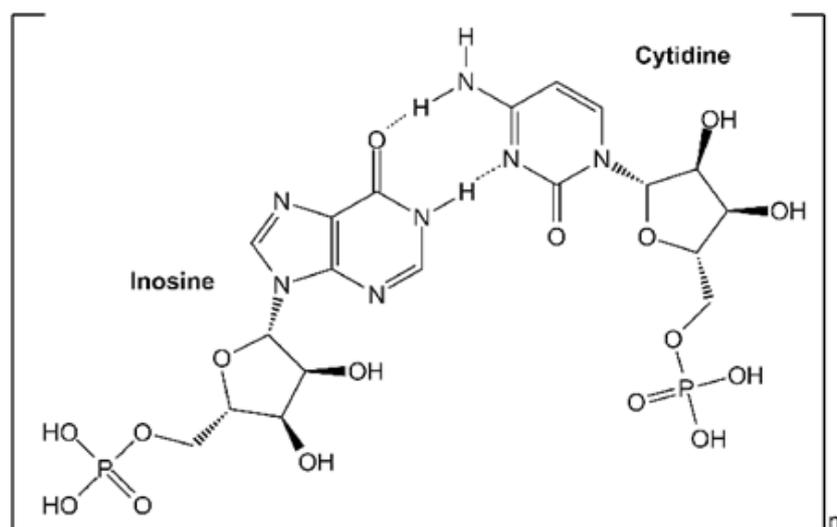
### Figure 9 : Pertinence de l'acide valproïque pour un modèle animal des TSA

La validité de construction (« construct validity ») constitue la capacité du modèle animal à reproduire les mécanismes dysfonctionnels comportementaux et/ou physiologiques du désordre psychiatrique. Le VPA induit des TSA chez l'Homme et chez l'animal. Sont retrouvés également chez l'animal des modifications génétiques, épigénétiques et des altérations neuronales. Les marqueurs biologiques de la pathologie sont alors vérifiés chez l'animal pour évaluer le degré de similarité phénoménologique, critère de validité apparente (« face validity »). Enfin la validité prédictive (« prédictive validity ») définit la capacité du modèle à identifier le pouvoir thérapeutique de drogues pour traiter un désordre psychiatrique humain. MOA : mécanismes d'action ; POC : preuve de concept. (Mabunga et al., 2015)

## 2.2 Modèles associés à l'activation du système immunitaire maternel

De nombreuses études ont mis en évidence que la MIA, suite à une infection virale ou bactérienne pendant la grossesse, est un facteur de risque pouvant provoquer chez les enfants des troubles psychiatriques neurodéveloppementaux tels que les TSA (Mazina et al., 2015). Ce point a plus largement été décrit précédemment (I. 5.1.2.1). La MIA est une méthode couramment utilisée pour développer des modèles animaux des TSA. En effet, des études indiquent que la MIA entraîne une perturbation du système immunitaire chez la descendance avec notamment une augmentation du taux d'interleukines-6 (IL-6), responsable d'un phénotype autistique chez l'Homme (Wei et al., 2013), mais également chez l'animal (Smith et al., 2007; Patterson, 2011). Différentes méthodes sont employées pour provoquer une réponse inflammatoire (Meyer et al., 2009). Elle peut être directe suite à l'application nasale du virus influenza chez des femelles rongeurs gestantes pour une activation de type viral (Fatemi et al., 2008) ou par l'injection de bactéries pour induire une infection bactérienne (Offenbacher et al., 2005). Mais plus généralement ce sont des agents mimant une infection qui sont employés car l'induction est davantage quantifiable et reproductible d'un animal à l'autre. Ainsi, une infection bactérienne peut être provoquée à l'aide d'une injection de lipopolysaccharide (LPS), endotoxine pyrogène et composant de la paroi des bactéries à Gram négatif (Kirsten et al., 2013). Une infection virale peut être induite par injection d'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C), un ARN double brin synthétique (figure 10) dont la structure est analogue à l'ARN de certains virus (Meyer, 2014) et dont l'intérêt et les mécanismes d'action seront détaillés ci-après. Il faut savoir que selon le type d'infection, les voies de signalisation activées ne sont pas les mêmes. Suite à une infection bactérienne, les récepteurs Toll-like 4 (TLR4) sont activés. En revanche, la réponse anti-virale va mettre en jeu les récepteurs Toll-like 3 (TLR3). Cependant, ces deux voies de signalisation différentes vont mener toutes deux à

la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ...) (Lu et al., 2008; Shi et al., 2009) (figure 11). Il est important de rappeler que ces molécules sont essentielles dans le développement normal du système nerveux central (SNC). Ainsi, une dérégulation de leur production au stade fœtal est fortement susceptible de provoquer des altérations du cerveau (Bilbo and Schwarz, 2009; Deverman and Patterson, 2009; Bilbo and Schwarz, 2012).



**Figure 10 : Structure chimique de l'acide polyinosinique-polycytidylique**

OH : groupe hydroxyle ; P : phosphate ; O : oxygène ; N : azote ; H : hydrogène [www.adipogen.com](http://www.adipogen.com)

### 2.2.1 Mécanisme d'action du poly I:C

Le poly I:C interagit avec le récepteur de type toll TLR-3 exprimé chez les mammifères sur la membrane des cellules dendritiques (neurones, astrocytes et cellules microgliales) et des lymphocytes NK (Muzio et al., 2000). Le récepteur reconnaît spécifiquement l'agent pathogène de type viral par sa structure en ARN double brin. Une cascade de réactions intervenant dans les processus d'immunité innée est alors déclenchée. La voie de signalisation de TLR3 induit l'activation de TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) qui va ensuite

réagir avec différentes protéines pour activer : 1) interferon regulatory factor 3 (IRF3), qui module la réponse antivirale grâce à son rôle dans la production d'interférons ; 2) nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) et activator protein 1 (AP-1) qui contrôlent l'expression des gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires ; 3) Fas-associated protein with death domain (FADD), qui intervient dans les processus apoptotiques (Reisinger et al., 2015; Yu and Levine, 2011).

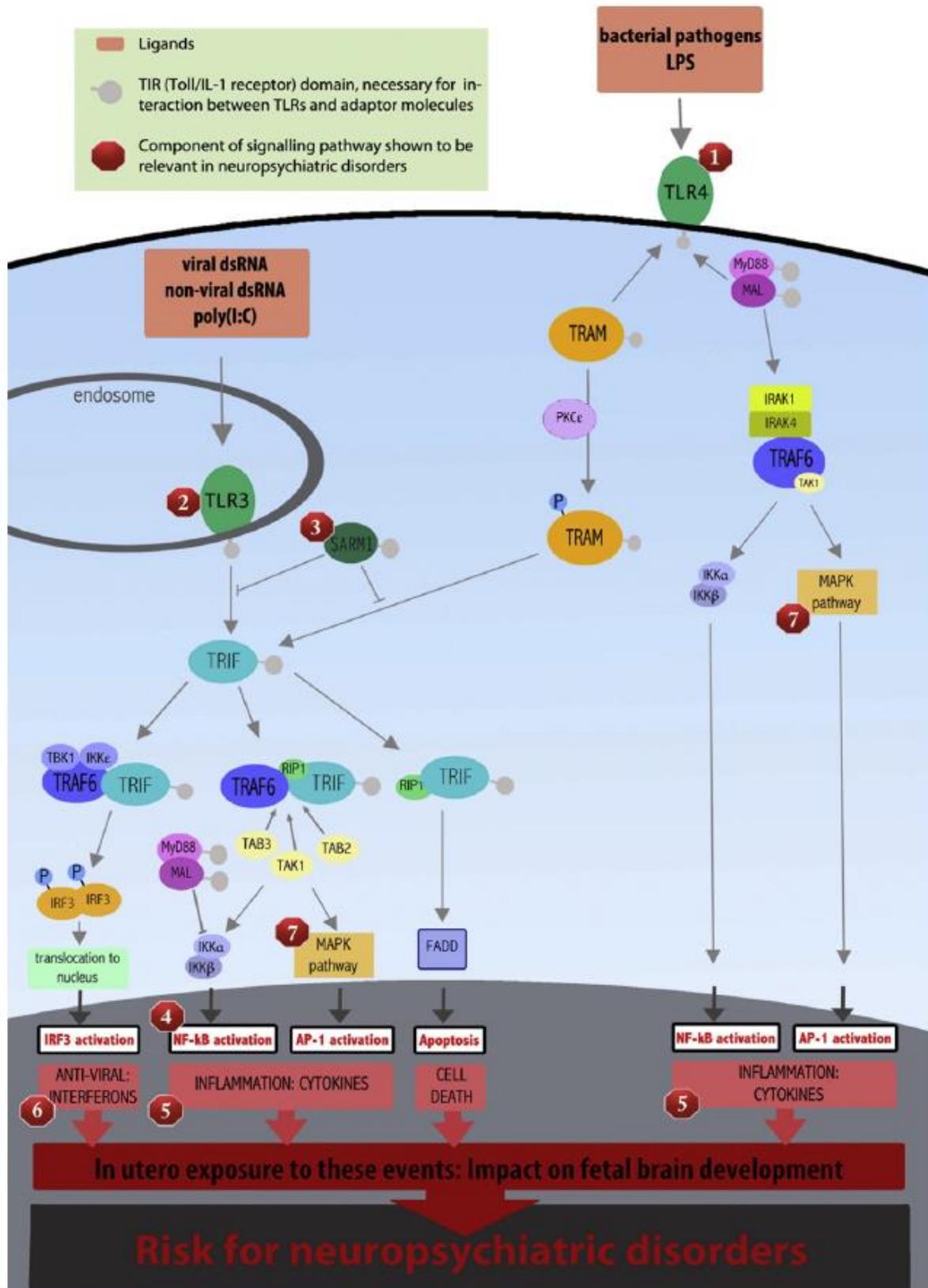


Figure 11 : Voies de signalisation induites par la reconnaissance d'agents pathogènes bactériens ou viraux (Légende ci-contre)

Abréviations: AP-1 : activator protein 1 ; DRIIs : depression-related interferon-induced genes; FADD : Fas-associated protein with death domain ; IKKs : inhibitors of NF- $\kappa$ B kinase ; IRAKs: interleukin-1 receptor-associated kinase 1 and 4 ; IRF3 : interferon regulatory factor 3 ; MAL : MyD88 adaptor-like ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; MyD88 : myeloid differentiation primary response gene 88 ; NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; PKC $\epsilon$  : protein kinase C epsilon ; SARM1 : sterile alpha and TIR motif containing 1 ; TAK1 : transforming growth factor beta activated kinase-1 ; TAB : TAK binding protein 1 and 3 ; TLR : Toll-like receptor 3 and 4 ; TRAF3 : TNF receptor-associated factor 3; TRAF6/RIP1 : TNF receptor-associated factor 6/receptor interacting protein 1 ; TRAM : TRIF-related adaptor molecule ; TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ . (Reisinger et al., 2015)

### 2.2.2 Pertinence du modèle poly I:C

Le comportement de rongeurs exposés *in utero* à une réaction inflammatoire maternelle induite par le poly I:C a largement été analysé à travers différents tests afin de confirmer la présence des symptômes caractéristiques des TSA chez ces animaux. De nombreuses études ont démontré, chez ce modèle, des déficits d'interaction sociale, des mouvements répétés et stéréotypés, de l'anxiété, des troubles de la coordination sensorimotrice et de la communication (Meyer et al., 2011; Naviaux et al., 2013; Patterson, 2009, 2011; Schwartz et al., 2013; Xuan and Hampson, 2014). Outre le comportement de type autistique, ce modèle présente des caractéristiques histologiques communes à celles observées suite à des analyses post-mortem de cerveaux d'individus diagnostiqués pour la pathologie. En effet, Naviaux et al. (2013) ainsi que Shi et al. (2009) ont mis en évidence une diminution du nombre de cellules de Purkinje dans le cervelet des souris exposées *in utero* au poly I:C (Naviaux et al., 2013; Shi et al., 2009).

Le modèle poly I:C a de plus fait l'objet de plusieurs études pharmacologiques qui ont montré une restauration des performances cognitives et de l'activité neuronale de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian (Ozawa et al., 2006; Meyer et al., 2010; Dickerson and Bilkey, 2013). Ces homologues avec l'Homme supportent l'hypothèse que ces rongeurs exposés *in utero* à l'activation du système immunitaire maternel, suite au traitement de femelles gestantes au poly I:C, constituent un modèle pertinent des TSA.

### **III. Régions cérébrales impliquées dans le contrôle moteur et leur contribution à la physiopathologie des TSA**

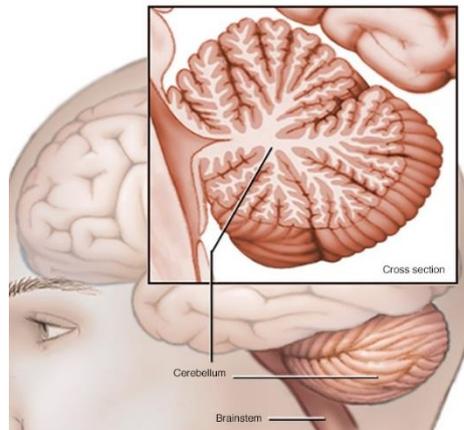
#### **1. LE CERVELET**

Le cervelet est une région anatomique distincte du reste de l'encéphale et localisée dans la fosse crâniale postérieure. Son nom d'origine latine « *cerebellum* » qui signifie « petit cerveau », atteste de l'importance de cette région cérébrale. Effectivement, le cervelet joue un rôle de « tour de contrôle » en corrigeant les informations motrices reçues par le reste de l'encéphale ; il participe également à l'apprentissage moteur. N'étant pas responsable de l'initiation des mouvements, son altération n'est pas associée à des paralysies. En revanche, le cervelet est responsable de l'exécution de mouvements volontaires fluides, précis et coordonnés. En outre, de récentes études ont démontré son implication également dans des tâches cognitives et dans les émotions (Schmahmann, 1997). Un nombre important d'études indique son implication dans la physiopathologie des TSA (D'Mello and Stoodley, 2015). Je détaillerai ce dernier point dans la section 1.3 en donnant quelques exemples de données récoltées chez l'Homme et chez les modèles animaux.

##### **1.1 Organisation anatomo-fonctionnelle**

Bien que représentant seulement 10% du volume et du poids cérébral chez l'Homme, le cervelet contient pourtant plus de la moitié des neurones du cerveau. Ceci est possible grâce à une configuration en lobules permettant une augmentation substantielle de sa surface, repérables par des sillons et des circonvolutions formés par des repliements de cortex cérébelleux (figure 12). C'est dans le cortex cérébelleux que sont retrouvés la plupart des corps cellulaires. Ces lobules renferment également, dans leur partie centrale, la substance blanche composée des

axones myélinisés se connectant aux noyaux profonds du cervelet dans la partie interne et médiane du cervelet (figure 16).



**Figure 12 : Représentation schématique d'une coupe sagittale de cervelet humain.**

Le cortex cérébelleux se distingue sur le schéma par une teinte plus foncée. La substance blanche est représentée par la couleur la plus pâle (Mayo foundation for medical education and research).

### 1.1.1 Organisation lobulaire

Anatomiquement, le cervelet est divisé en 3 lobes séparés par deux fissures transverses. La fissure primaire sépare le lobe antérieur du postérieur, ce dernier est ensuite séparé du lobe flocculonodulaire (plus ventral), par la fissure postéro-latérale (figures 13 et 14). On distingue également une partie médiane appelée vermis, encadrée par deux hémisphères bien développés dans le lobe postérieur. Le cervelet se compose de 10 lobules transverses (I-X) morphologiquement distinguables et s'étendant d'un hémisphère à l'autre en traversant le vermis (figure 14). Les lobules I-V constituent le lobe antérieur, les lobules VI-IX forment le lobe postérieur et le lobule X correspond au lobe flocculonodulaire. Au sein des hémisphères, le lobule VII se divise en différents sous-lobules nommés dans l'ordre antéro-postérieur Crus I, Crus II et VIIB. Chez l'Homme, le lobule VIII également se divise en VIIIA et VIIIB. Le cervelet s'organise de façon topographique. De nombreuses expériences d'imagerie à

résonnance fonctionnelle (IRMf) ont permis de définir des rôles pour les différents lobules du cervelet (Stoodley et al., 2012). Ainsi, ces analyses ont pu déterminer que les fonctions sensorimotrices sont majoritairement gérées par les lobules I-V et VIII, que les lobules VI et VII, connectés au cortex préfrontal et pariétal, sont responsables de fonctions cognitives telles que la mémoire de travail (VI et Crus I), le langage (VI et Crus I droits), l'organisation spatiale (VI gauche), les fonctions sociales (Crus I), le traitement des émotions (VII médian) (Frings et al., 2006; Stoodley and Schmahmann, 2009; Jack and Morris, 2014). Le lobule IX quant à lui aurait son importance dans la poursuite oculaire mais son rôle précis n'a pas pu être identifié par IRMf, idem pour le lobule X.

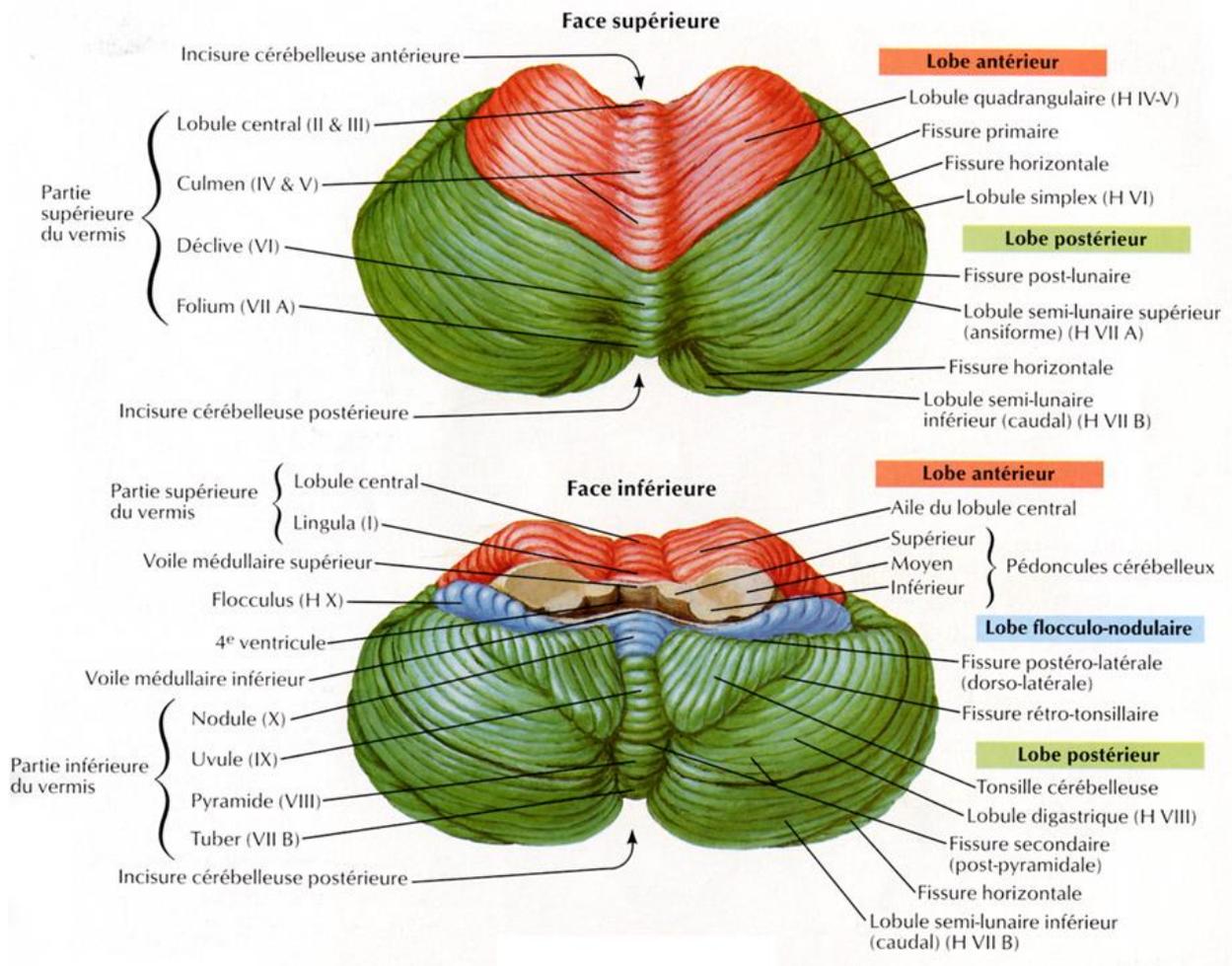
Le cervelet se divise également de manière longitudinale. A l'exception du lobe flocculonodulaire, on va distinguer une partie médiale (vermis), intermédiaire (paravermis) et latérale (hémisphères).

Le lobe flocculonodulaire ou archéocervelet (lobule X) constitue la partie la plus ancienne du cervelet d'un point de vue évolutif. Il est également appelé vestibulocervelet car il participe principalement à l'équilibre et à l'orientation spatiale. En effet, il reçoit les informations des aires visuelles (cortex visuel et aire préteectale) ainsi que les informations du nerf et des noyaux vestibulaires (ipsilatéraux) et projette vers ces derniers par l'intermédiaire des noyaux profonds. Ce lobe est formé d'un nodule médian (nodulus) accompagné de deux parties latérales appelées flocculus. Le nodulus, tient un rôle dans le contrôle musculaire axial tandis que les flocculi, sont impliqués dans le contrôle de la poursuite oculaire et la coordination des mouvements des yeux avec la tête.

Le vermis et le paravermis constituent le spinocerelet qui reçoit les informations somatosensorielles du tronc et des membres par ses connections avec la moelle épinière, de la tête par ses connections au noyaux trijumeaux et aux systèmes auditif et visuel. La partie

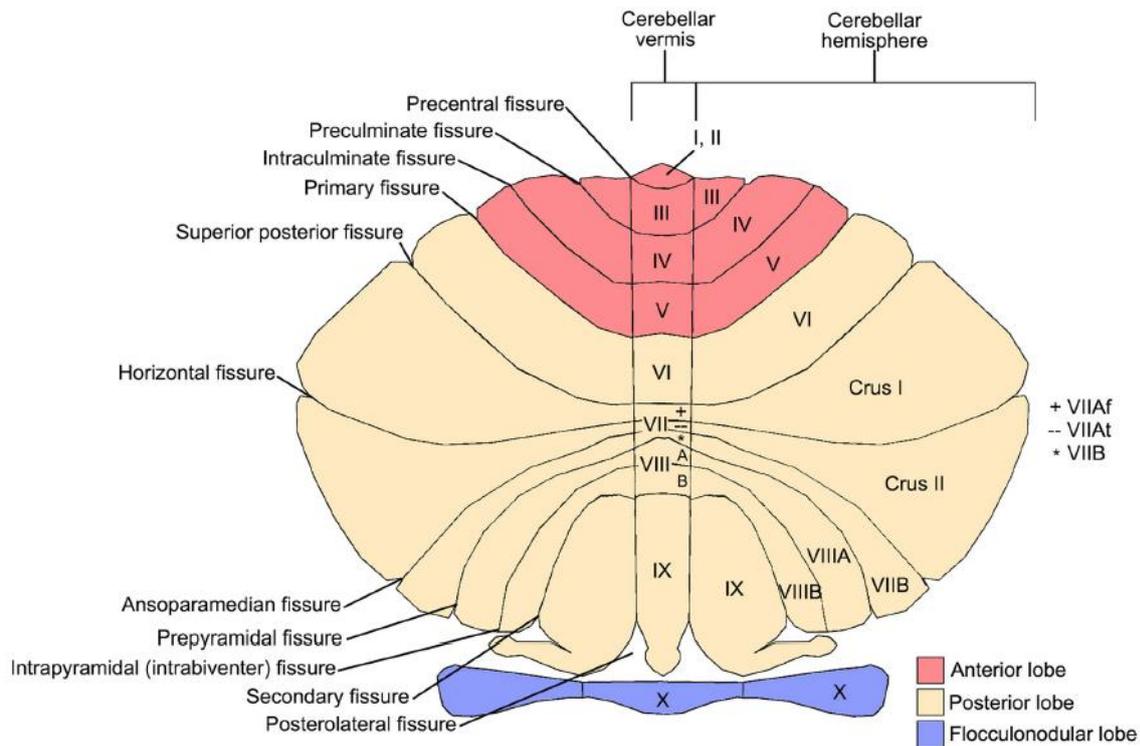
vermale reçoit plus précisément les informations provenant du tronc ou de la partie proximale des membres tandis que le paravermis est concerné par la partie distale des membres.

Les hémisphères, représentant la partie la plus étendue du cervelet, constituent le cérébrocervelet qui est réciproquement connecté au cortex cérébral, principalement aux aires motrices et au cortex préfrontal (D'Mello and Stoodley, 2015; Kelly and Strick, 2003). Il est aussi appelé néocerevet du fait de son évolution « tardive » qui lui confère alors des fonctions dites « supérieures » telles que le langage, la mémoire, la pensée et le jugement, la conscience du soi et de l'environnement. En effet, le volume des hémisphères cérébelleux est croissant depuis l'apparition des petits vertébrés jusqu'à celle des grands mammifères. Sa lésion pourrait entraîner des troubles dans la planification des mouvements, des retards dans l'exécution et des problèmes de synchronisation. Récemment, son implication a également été démontrée dans des fonctions cognitives de communication, de langage et dans les émotions (De Smet et al., 2013; Moulton et al., 2011).



**Figure 13 : Structures anatomiques du cervelet humain**

(Felten D, Shetty A, 2009)



**Figure 14 : Représentation schématique de la division lobulaire du cervelet chez l'Homme**

(Schmahmann, 2018)

### 1.1.2 Anatomie du cortex cérébelleux

Tous les corps cellulaires sont retrouvés dans le cortex cérébelleux ou dans les noyaux profonds.

La principale caractéristique du cortex cérébelleux est son organisation en trois couches, de la plus profonde à la plus superficielle : la couche granulaire, la couche des cellules de Purkinje et la couche moléculaire (figure 15).

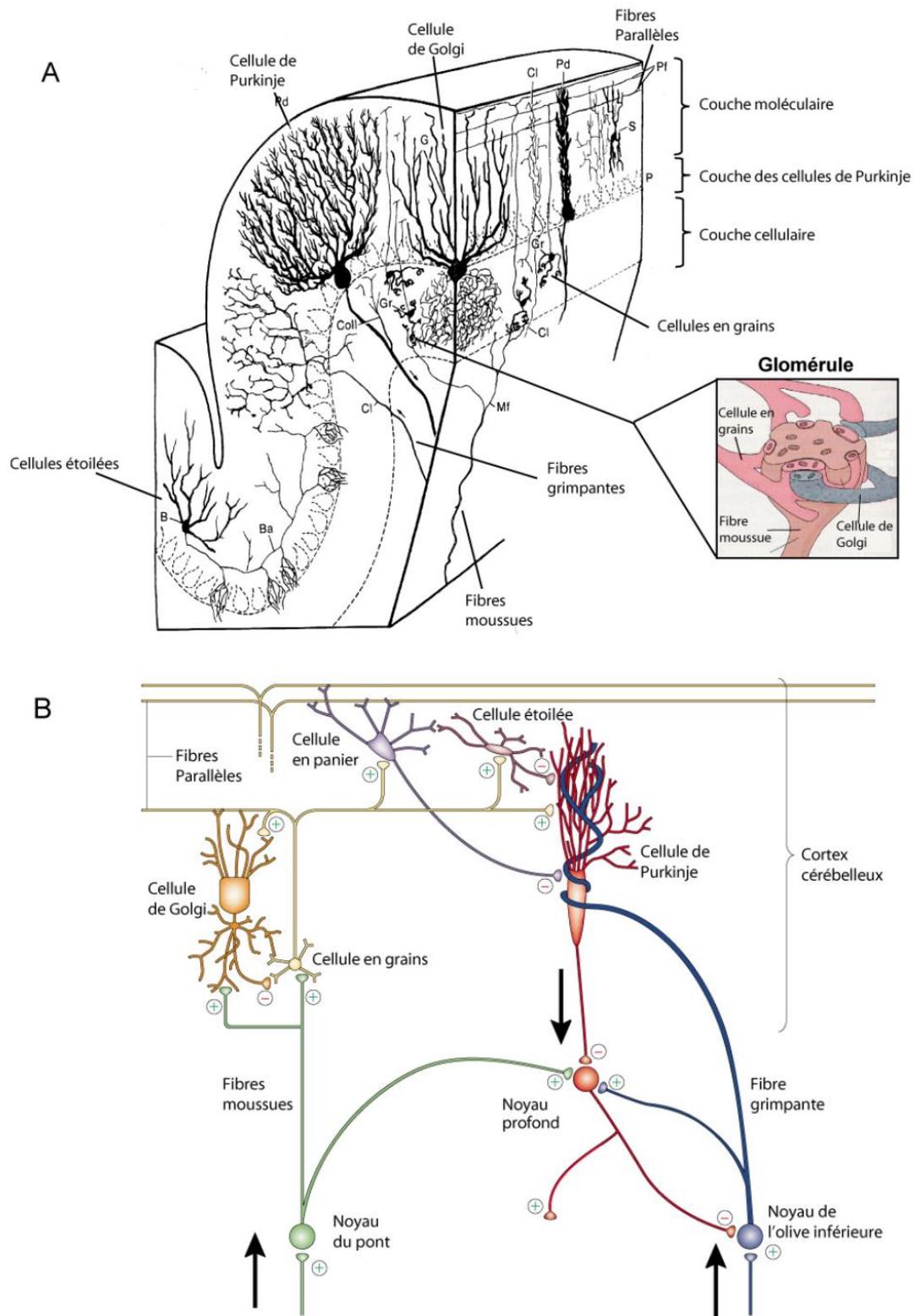
#### 1.1.2.1 Les types neuronaux

Il contient cinq types cellulaires principaux (figure 15) :

- les cellules granulaires (ou cellules en grains) composent la couche granulaire. Ce sont des neurones de très petite taille (5µm) et retrouvés en grande quantité (25-30 millions

chez la souris) conférant ainsi une densité élevée à la couche qu'elle constitue. Les cellules granulaires sont excitatrices glutamatergiques.

- les PC sont constituées d'un corps cellulaire très large (jusqu'à 40µm) et de dendrites multiples à leur partie apicale, formant une arborisation bien développée. Cette arborisation dendritique des PC s'étend de façon plane sur toute la largeur de la couche moléculaire du cortex cérébelleux. La couche des PC est comprise entre la moléculaire et la granulaire et correspond aux corps cellulaires des PC organisés en mono-couche. Les PC sont des neurones GABAergiques. Leur axone émerge de leur partie basale et traverse la couche granulaire pour atteindre leur cible dans la substance blanche.
- les interneurons inhibiteurs GABAergiques : les cellules de Golgi, les cellules étoilées et en panier. Les cellules de Golgi sont présentes dans la couche granulaire et modulent l'activité des cellules à grains en faisant synapse sur leurs terminaisons dendritiques et plus précisément au niveau des synapses des fibres moussues excitatrices. Cette organisation forme le glomérule cérébelleux (figure 15A). Les cellules étoilées et les cellules en panier sont localisées dans la couche moléculaire et font synapse avec les PC au niveau de leurs dendrites et leur soma, respectivement (Ango et al., 2008).



**Figure 15 : Composition cellulaire du cortex cérébelleux et circuits neuronaux.**

A : types de neuronaux présents dans les différentes couches (d'après Palay and Chan-Palay, 1974) et détail de la structure d'un glomérule (encart). B : Schématisation des principales afférences (flèche vers le haut) et efférence (flèche vers le bas) du cortex cérébelleux. (+) synapse excitatrice ; (-) synapse inhibitrice. (Medina et al., 2002)

### 1.1.2.2 Les fibres

Les fibres moussues et les fibres grimpantes constituent les deux voies d'entrée principales du cortex cérébelleux (figure 15).

Les fibres moussues glutamatergiques ont diverses origines : la moelle épinière, les noyaux réticulés, le noyau du pont, les systèmes vestibulaire ou trigéminé. Elles projettent vers les cellules granulaires. Leurs collatérales axonales peuvent cependant former des synapses au niveau de la substance blanche et des noyaux profonds du cervelet.

Les fibres grimpantes sont elles aussi excitatrices et proviennent de l'olive inférieure située dans le myélocéphale (bulbe rachidien). Elles traversent la substance blanche, la couche granulaire et se terminent au niveau des dendrites proximales des PC. Chaque fibre peut faire synapse avec plusieurs PC, en revanche, une seule PC n'est innervée que par une seule fibre grimpante. Cette mono-innervation résulte d'un processus développemental d'élimination synaptique. Je détaillerai ce phénomène dans un point suivant (cf. III. 1.2.2.4). Grâce à leurs collatérales, ces fibres sont aussi capables de faire synapse avec les cellules étoilées et en panier. Elles participent alors à la régulation des PC.

En plus de ces fibres moussues et grimpantes, il existe également d'autres voies d'entrée en provenance de neurones noradrénergiques du locus coeruleus et de neurones sérotoninergiques du noyau du raphé. Leur axone vient faire synapse directement avec les PC.

Les PC représentent la seule voie efférente du cortex cérébelleux (figure 16). Elles tiennent donc un rôle primordial dans le traitement des informations. Une altération de ces cellules ou de leurs mécanismes de régulation est alors susceptible d'induire différents troubles du fait des fonctions multiples du cervelet. En effet, des analyses *post-mortem* de cervelet d'individus diagnostiqués avec des TSA ont démontré notamment une diminution du nombre de ces cellules

(Courchesne, 1997a; Skefos et al., 2014). L'axone des PC traverse la couche granulaire pour se terminer dans les noyaux profonds ou projeter au-delà du cervelet dans les noyaux vestibulaires. De cet axone peut émerger des collatérales qui bifurquent et vont contacter de nouveau des cellules de Purkinje, d'où leur nom de collatérales récurrentes (Mugnaini, 1970).

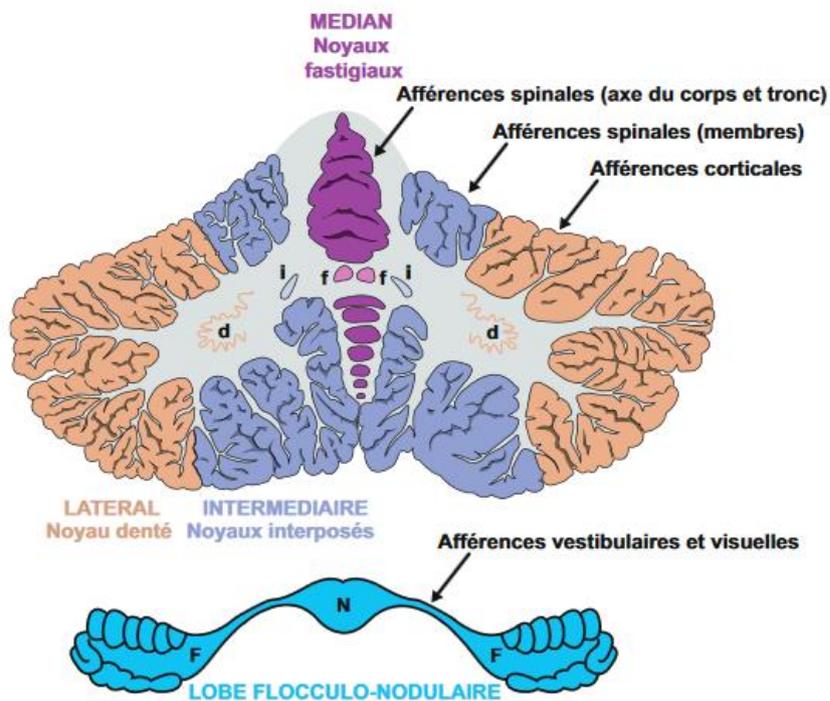
Un autre type de fibres participe à la modulation des PC : les fibres parallèles, correspondant à l'axone des cellules granulaires excitatrices. Une seule fibre parallèle peut former jusqu'à 150,000 synapses pour une seule PC, grâce aux épines recouvrant leurs dendrites terminales dans la couche moléculaire. Une fibre est également capable d'innover plus de 10 millions de PC. Ceci témoigne d'un fort pouvoir de régulation.

### **1.1.3 Les noyaux profonds**

A l'exception du paravermis qui peut projeter directement vers le noyau vestibulaire situé dans le bulbe, le cortex cérébelleux projette vers les noyaux profonds du cervelet. Leur structure ne leur confère pas de délimitations structurelles mais il est cependant possible de dénombrer quatre noyaux : le noyau médian (fastigial), le noyau antérieur (emboliforme), le noyau postérieur (globuleux) et le noyau latéral (dentelé ou denté) (figure 16). Les noyaux emboliforme et globuleux constituent les noyaux interposés. Chacun reçoit des projections d'une région particulière du cortex et gère alors des fonctions particulières. En effet, le noyau médian, qui reçoit les projections du vermis, joue principalement un rôle de traitement des informations somatosensorielles concernant la partie axiale du corps et proximale des membres. Les noyaux antérieur et postérieur, connectés au paravermis, sont impliqués dans des fonctions de coordination et d'équilibre en traitant les informations sur la partie distale des membres. Enfin, le noyau dentelé, le plus large chez l'Homme, reçoit les axones provenant des hémisphères et gère ainsi les fonctions cognitives supérieures. Ce sont précisément les axones

des PC qui font le lien entre le cortex cérébelleux et les noyaux profonds. L'axone GABAergique d'une PC peut se connecter à plusieurs neurones. Cependant, il existe également une convergence des projections vers ces derniers puisqu'un seul neurone dans un noyau profond peut être innervé par 26 PC.

D'autres afférences, formées par les collatérales des fibres excitatrices moussues et grimpantes, viennent innerver ces noyaux. Ainsi, cette configuration permet d'instaurer une boucle de régulation des noyaux profonds du cervelet et d'assurer la réponse globale du cervelet au cortex cérébral. Ces mécanismes de régulation sont en outre soutenus par les projections inhibitrices des noyaux profonds vers l'olive inférieure, source des fibres excitatrices grimpantes ciblant les PC. Les neurones glutamatergiques des noyaux profonds, quant à eux, projettent vers d'autres régions du cerveau, principalement vers le thalamus (cf. III. 4).



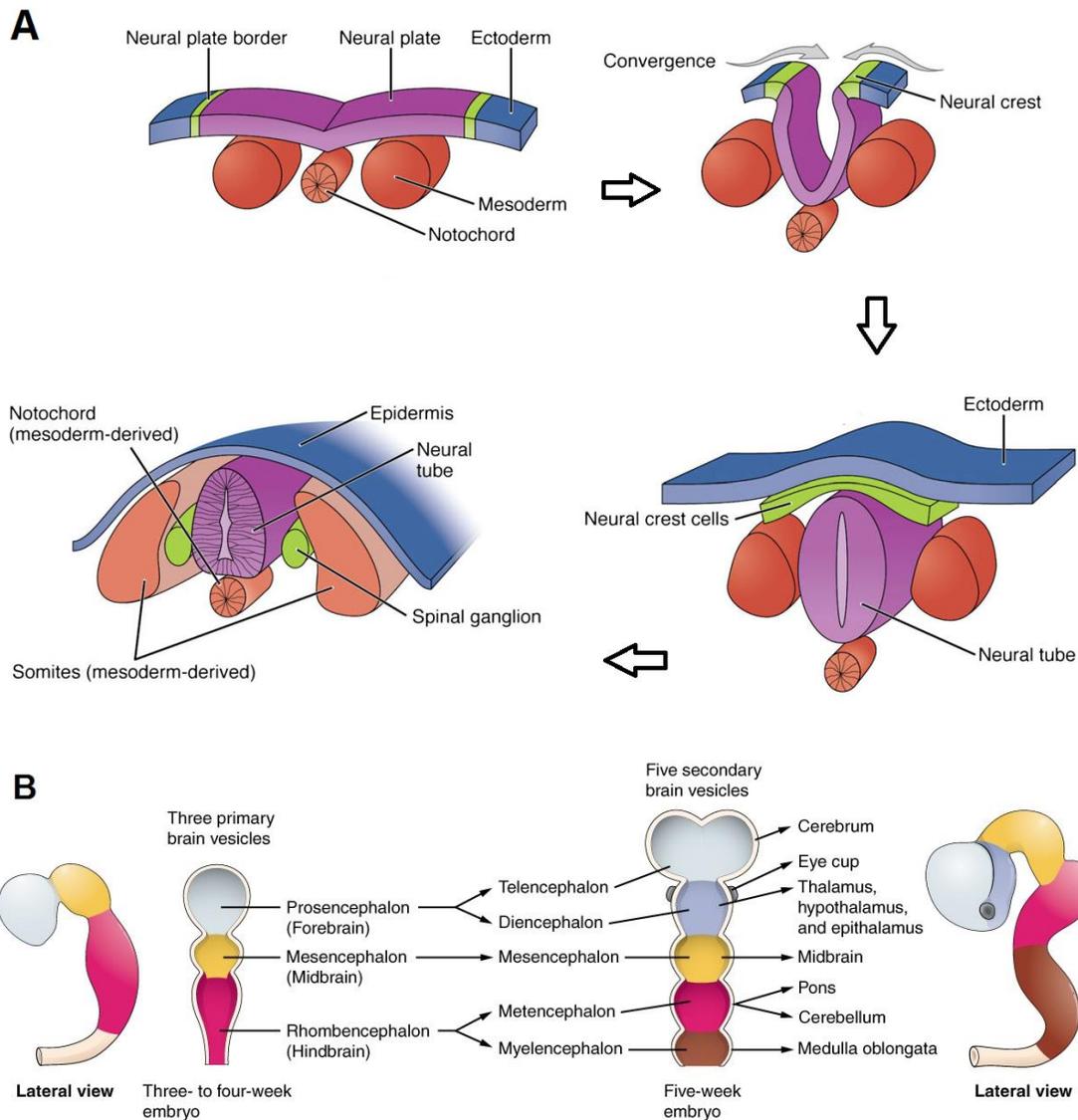
**Figure 16 : Divisions fonctionnelles du cervelet**

d : noyau denté ; f : noyau fastigial ; i : noyaux interposés (Vuillier et al., 2011)

## 1.2 Développement du cervelet chez la souris

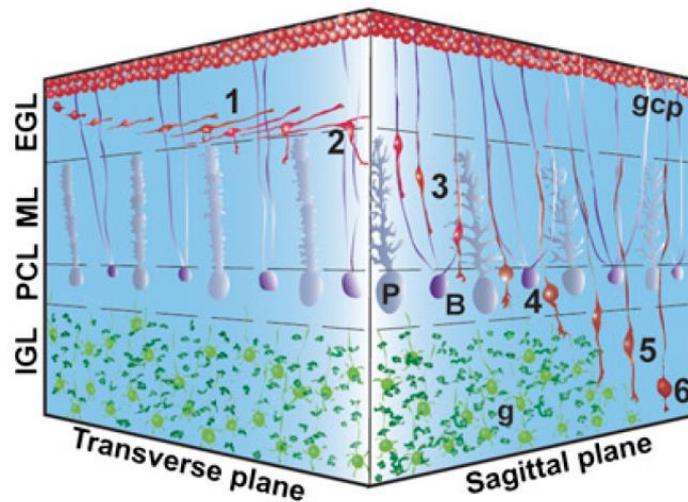
### 1.2.1 Embryonnaire

Une fois le tube neuronal fermé, au 9<sup>e</sup> jour embryonnaire (E9), la partie antérieure du tube neural se différencie dans un premier temps en 3 vésicules : le prosencéphale (antérieur), le mésencéphale (moyen) et le rhombencéphale (postérieur), puis en 5 vésicules, comme chez l'Homme (figure 17). Le prosencéphale se divise en télencéphale et diencephale, et le rhombencéphale en métencéphale et myélocéphale. La partie postérieure du tube neural qui n'a pas formé de vésicules donnera ensuite la moelle épinière. Le cervelet est une structure formée à partir du métencéphale. Celui-ci forme deux plaques ou deux lames alaires, dont la partie dorso-latérale se replie pour former les lèvres rhombiques qui donneront les neurones glutamatergiques des noyaux profonds (E10.5-E12.5) et de la couche granulaire (E15) (Carletti and Rossi, 2008). Le primordium cérébelleux s'étend en une plaque ventriculaire épaisse qui constitue le « toit » du 4<sup>e</sup> ventricule. Les progéniteurs neuronaux commencent alors à migrer de la zone ventriculaire pour donner les neurones GABAergiques : les PC (E10.5-E13.5), et les interneurons des noyaux profonds (E10.5-E11.5), les cellules de Golgi (E13.5-postnatal). Les cellules étoilées et en panier sont générées plus tardivement (E13-P5) car elles dérivent de précurseurs secondaires de la substance blanche en formation. Chaque type cellulaire dépend alors de l'origine de son précurseur neuronal et du moment de différenciation. La phase embryonnaire se termine à E14 chez la souris (Zhang et al., 2010b). Elle est marquée par la formation de la couche granulaire externe (EGL) (figure 18). Ce n'est que lors du développement post-natal qu'elle disparaît au profit des trois couches du cortex cérébelleux par migration des cellules granulaires matures de l'EGL vers la couche granulaire interne (P6-P17) (Espinosa and Luo, 2008).



**Figure 17 : Développement des vésicules embryonnaires du système nerveux des vertébrés suite à la fermeture du tube neural.**

A. Schématisation des différentes étapes de neurulation à partir de l'ectoderme (bleu) et sous le contrôle du mésoderme (marron). C'est l'apparition de la plaque neurale (violet), suite à celle de la notochorde (marron), qui constitue le premier événement de la formation du système nerveux. Les extrémités de la plaque neurale (vert) se soulèvent et se rejoignent pour former des crêtes neurales délimitant la gouttière neurale. Cette dernière va ensuite donner le tube neural une fois la fermeture accomplie. Les cellules des crêtes neurales se détachent et formeront les ganglions rachidiens et le système nerveux périphérique. (D'après Sewell et al., 2015) B. Ces figures représentent la division en 3 puis 5 vésicules du futur système nerveux central. Le prosencéphal, ou cerveau antérieur, se divise en télencéphal et diencephal au stade 5 vésicules et le rhombencéphal, ou cerveau postérieur, se divise en métencéphal et myélinephal. Le mésencéphal, ou cerveau moyen, ne se divise pas à ce stade de développement. Ensuite, le télencéphal se développera pour donner les hémisphères cérébraux, le diencephale donnera le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus. Le mésencéphal donnera la partie la plus rostrale du pont. Enfin le métencéphale se développera pour donner le pont et le cervelet ; et le myélinephal formera la moelle épinière.



**Figure 18 : Migration des cellules granulaires de la couche granulaire externe vers la couche granulaire interne lors de la période post-natale.**

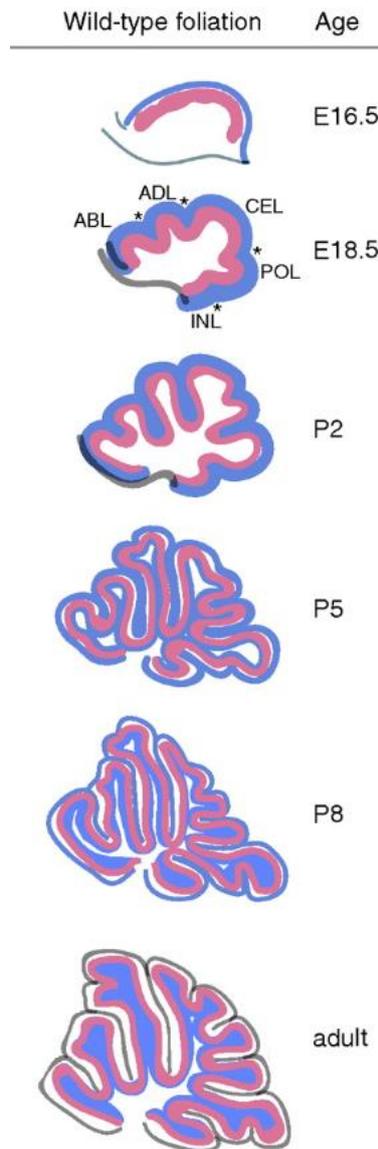
Représentation en 3D. 1 : migration tangentielle dans la couche granulaire externe (EGL) ; 2 : inversement morphologique de la polarité des cellules au contact de la couche moléculaire (ML) ; 3 : association avec les cellules de Bergmann pour migration radiale ; 4 : phase stationnaire dans la couche des cellules de Purkinje (PCL) ; 5 : migration dans la couche granulaire interne (IGL) indépendante de la glie ; 6 : fin de la migration dans la IGL. B : cellule de Bergmann ; g : cellule granulaire après migration ; gcp : précurseur de cellule granulaire ; P : cellule de Purkinje. (Fahrion et al., 2012)

## 1.2.2 Post natal

### 1.2.2.1 Foliation

Une étude chez le requin a montré une relation entre le degré de foliation (taille, nombre, profondeur) et la complexité des comportements, en comparant différentes espèces (Yopak et al., 2007). La formation des différents lobules a lieu majoritairement durant les deux premières semaines post-natales (figure 19). Parmi les mammifères, toutes les espèces sont pourvues d'un cervelet composé d'un vermis compartimenté en 10 lobules, ce qui suggère que la foliation est régulée par des facteurs génétiques dont l'un d'entre eux a pu être identifié, le gène *Foxc1*. En effet, des études ont démontré qu'une mutation de ce gène peut entraîner une malformation dite Dandy-Walker chez l'Homme correspondant à une hypoplasie du vermis voire même une agénésie totale, associée à une hydrocéphalie et à un kyste dans la fosse postérieure en communication avec le 4<sup>e</sup> ventricule (Aldinger et al., 2009; Haldipur et al., 2017). Ces mêmes

études ont également montré que des souris mutantes pour ce gène présentaient également ces caractéristiques anatomiques. Les travaux de Haldipur et ses collaborateurs ont montré que *Foxc1* serait impliqué dans la prolifération des neuroblastes et des cellulaires gliales radiaires, de la différenciation neuronale et de la migration dans le cervelet embryonnaire de souris (Haldipur et al., 2014). La prolifération et la migration des cellules granulaires jouent un rôle important dans la foliation du fait de la densité et de l'épaisseur de la couche qu'elles doivent former et qui va induire des forces mécaniques participatives. Les PC vont jouer un rôle plutôt moléculaire avec notamment l'expression, à partir de E17.5, de Sonic hedgehog (*Shh*) qui régule le nombre de feuillettes en influençant la prolifération des précurseurs des cellules granulaires par son effet mitotique (Corrales et al., 2004, 2006). Les mutants pour le gène *Shh* ne sont pas viables. Son expression est régulée par de nombreux facteurs de transcription de la famille de Gli (Gli 1-2-3) exprimés par tous les types cellulaires mais principalement par les cellules granulaires en prolifération et les cellules de Bergman, astrocytes radiaires. Ce serait tout particulièrement Gli2 qui provoquerait une foliation anormale en cas de mutation de son gène (Corrales et al., 2004). D'autres gènes ont pu être identifiés à l'aide de souris transgéniques. Durant le développement, le gène *EN2* est exprimé dans différents types cellulaires du cervelet embryonnaire, puis au stade postnatal, son expression se restreint aux cellules granulaires. Des souris mutantes homozygotes pour ce gène sont viables et présentent un cervelet de taille réduite avec une atteinte morphologique de certains lobules de la région postérieure ainsi qu'une réduction du nombre de PC (Cheh et al., 2006; Millen et al., 1994). Ces souris sont utilisées comme modèles pour des études sur les TSA (table 4). En effet, des mutations du gène *EN2* ont été identifiées chez des patients atteints de TSA (Gharani et al., 2004; Wang et al., 2008).



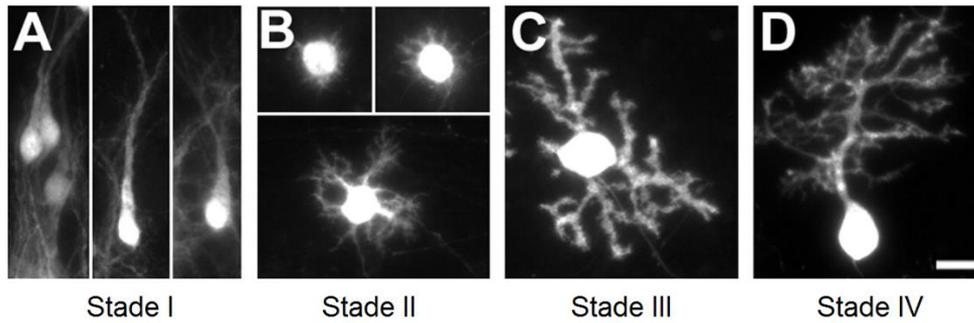
**Figure 19 : La foliation du cervelet chez la souris à lieu au cours des deux premières semaines post-natales**

Représentation schématique de coupes sagittales montrant la morphologie du cervelet à différents stades de développement chez la souris. Les principales fissures à E18.5 sont marquées par un astérisque. La couche des PC est représentée en rose et le bleu caractérise la couche granulaire. (Corrales et al., 2006)

### 1.2.2.2 Différenciation des PC

La migration des PC de la zone ventriculaire commence à E14 chez la souris et se termine 2 à 3 jours avant la naissance (Dastjerdi et al., 2012). Le processus est le même que pour les autres

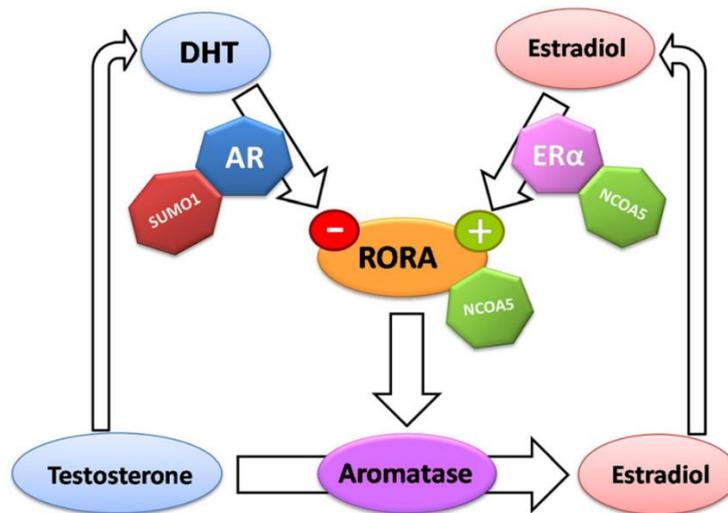
types neuronaux, la migration se fait radialement le long des axes gliaux, de façon ventro-dorsale, grâce à leur forme bipolaire. En effet, à ce stade de développement, la morphologie des PC correspond à un corps cellulaire fusiforme, stage I, de E16 à P4 (figure 20) (Boukhtouche et al., 2006). L'apparition des dendrites est ensuite progressive. Au stade II, appelé stade étoilé, de courtes dendrites se forment tout autour du soma, entre P2 et P6, au moment où les PC s'organisent en mono-couche. A partir de P5 et jusqu'à P10, une à trois protrusions se différencient (stade III). Enfin, s'ensuit le stade IV, correspondant à des cellules de Purkinje possédant leur arbre dendritique identifié par des dendrites primaires additionnées de multiples collatérales. Cette différenciation dendritique est assurée dans un premier temps par un facteur de régulation important dans le développement des PC, le récepteur alpha orphelin lié à l'acide rétinoïque  $ROR\alpha$ . Une étude réalisée à partir de souris mutantes *staggerer* ( $sg/sg$ ), a démontré son rôle dans les premières étapes de la différenciation des PC (Boukhtouche et al., 2006). Chez ce mutant, la taille du cervelet est réduite, les PC qui sont en nombre réduit et avec une distribution ectopique, ont un soma atrophique et sont dépourvues d'épines tertiaires (Sotelo and Changeux, 1974). La couche des cellules granulaires est appauvrie voire même inexistante. Ces souris *staggerer* sont également porteuses d'une mutation sur le gène de  $ROR\alpha$ , une délétion, responsable d'un déficit de ce facteur de transcription. Boukhtouche et ses collaborateurs ont montré que des PC de souris  $ROR\alpha^{sg/sg}$  mises en culture à P0 gardaient leur forme bipolaire de stage I même après 14 jours de différenciation, alors que les PC de souris contrôles  $ROR\alpha^{+/+}$  avait évolué du stade I au stade II après 7 jours puis au stade IV après 14 jours de différenciation. Cette même étude a également montré que la surexpression de  $ROR\alpha$  chez ces souris *staggerer* permettait la différenciation des PC au stade III voire IV après 7 jours de mise en culture. Ainsi, un déficit en protéines  $ROR\alpha$  entraîne un arrêt des processus de différenciation des PC au stade fusiforme. En revanche, une surexpression permettrait une restauration normale de leur différenciation.



**Figure 20 : Etapes de différenciation des cellules de Purkinje.**

Photos prises à partir de cultures organotypiques suite à un marquage de la calbindine sur des coupes mises en culture à P0 et maintenues pendant 3 jours (A), 7 jours (B), 10 jours (C) ou 14 jours (D). Barre d'échelle = 20  $\mu$ m. (Boukhtouche et al., 2006)

L'implication de *ROR $\alpha$*  à un âge plus avancé a depuis été identifié chez un modèle de souris transgéniques Cre-lox, par suppression de l'expression du gène de P10 à P21 (Chen et al., 2013). Cette étude a démontré son rôle dans le maintien des caractéristiques de maturité telles que la complexité dendritique ainsi que l'innervation par les fibres grimpantes. Cette privation de *ROR $\alpha$*  induirait, de plus, une perte des PC à P28. De façon intéressante, il a été montré que l'expression de cette protéine était réduite dans le cortex frontal chez des sujets atteints de TSA (Sarachana et al., 2011). *ROR $\alpha$*  est donc un nouveau gène candidat dans la physiopathologie des TSA, qui pourrait également expliquer la différence du nombre d'hommes diagnostiqués par rapport aux femmes. En effet, la protéine *ROR $\alpha$*  est impliquée dans la régulation des stéroïdes sexuels (figure 21). Inhibé par la dihydrotestostérone et activé par l'œstradiol, *ROR $\alpha$*  participe à la conversion de la testostérone en œstradiol par le biais de l'enzyme aromatase, membre de la famille des cytochromes P450 et elle-même retrouvée diminuée chez des cas de TSA (Sarachana et al., 2011).



**Figure 21 : Implication de ROR $\alpha$  dans la conversion de la testostérone en oestradiol.**

AR : récepteur à androgènes ; ER $\alpha$  : récepteur à oestrogènes  $\alpha$  ; SUMO1 : Small Ubiquitin-like Modifier ; NCOA5 : Nuclear receptor coactivator 5.

### *1.2.2.3 Mort neuronale développementale chez la souris : 1ere semaine post natale*

Il existe deux phénomènes de mort développementale programmée des PC par apoptose. Le premier a lieu entre E13 et E15 et concerne de nombreux types cellulaires. A ce stade, cette mort développementale sert d'une part à réguler les progéniteurs de la zone germinale du système nerveux central afin de moduler la taille du tissu par rapport à son environnement, et d'autre part, à éliminer de façon sélective les cellules ectopiques ou celles ayant des projections aberrantes. En somme, ces processus contribuent à l'établissement d'un réseau neuronal spécifique.

Lors de la première semaine post-natale, un deuxième phénomène se produit et cible spécifiquement les PC dans le cortex cérébelleux. Ces périodes de mort développementale programmée ont pu être mises en évidence par l'observation d'une augmentation du nombre de PC suite notamment à la surexpression du gène anti-apoptotique *BCL-2* (*B-cell lymphoma 2*).

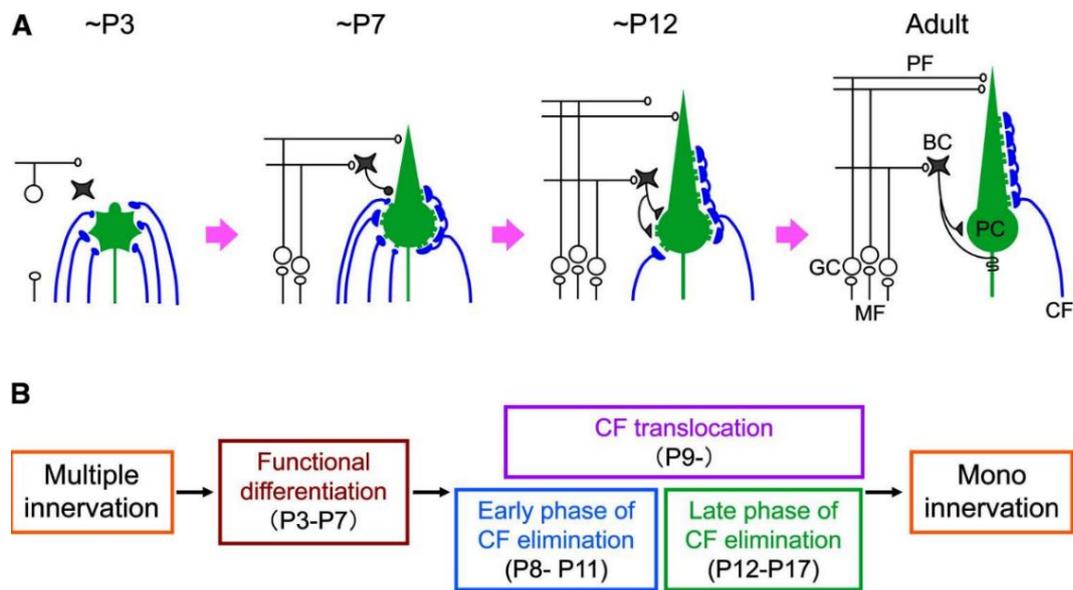
En effet, une étude menée sur des souris transgéniques a montré qu'une surexpression de *Bcl-2* induite à partir de E13 engendrait une augmentation de 43% du nombre de PC contre seulement 27% lorsque cette surexpression était provoquée dès P0 (Zanjani et al., 1996). En revanche, une surexpression au-delà de P7 induirait une différence de seulement 1% (Goswami et al., 2005). Ces deux études confirment les deux périodes successives de mort des PC, embryonnaire et post-natale. Une autre étude réalisée chez des souris transgéniques mutantes pour le gène pro-apoptotique *BAX* indique elle aussi une augmentation du nombre de PC de plus de 30% (Fan et al., 2001). Ce processus de mort des PC par apoptose est appuyé par Marín-Teva et ses collaborateurs qui ont démontré une activation de la caspase-3 dans les PC « sélectionnées » à P3 (Marín-Teva et al., 2004) et par Jankowski et al. qui n'indiquent aucun signe d'inflammation ni d'autophagie (Jankowski et al., 2009). Dans cette dernière étude, les auteurs ont aussi pu déterminer une influence spatiotemporelle de cette mort cellulaire. En effet, le nombre de PC atteintes serait plus important dans les zones du vermis, de la jonction vermo-hémisphérique au niveau des lobules IV à VII, du sous-lobule Crus I, ainsi que du lobule IX. Les chercheurs ont également démontré que cette mort physiologique des PC est plus intense à P3. Ils proposent également que ce processus cible les PC immatures (n'exprimant pas la calbindine), les surnuméraires, qui empêcheraient la formation correcte en mono-couche, et les PC dont le corps cellulaire serait plus petit.

#### *1.2.2.4 Elimination d'une innervation multiple (P7-P17)*

Pour rappel, les PC font synapse avec un grand nombre de fibres parallèles au niveau de leur dendrites distales (~100,000 chez la souris). A l'inverse, chaque PC est mono-innervée par une seule fibre grimpante, qui peut former entre 250 et 300 contacts synaptiques au niveau de leurs dendrites proximales. En revanche, au stade néonatal, plusieurs fibres grimpantes innervent une

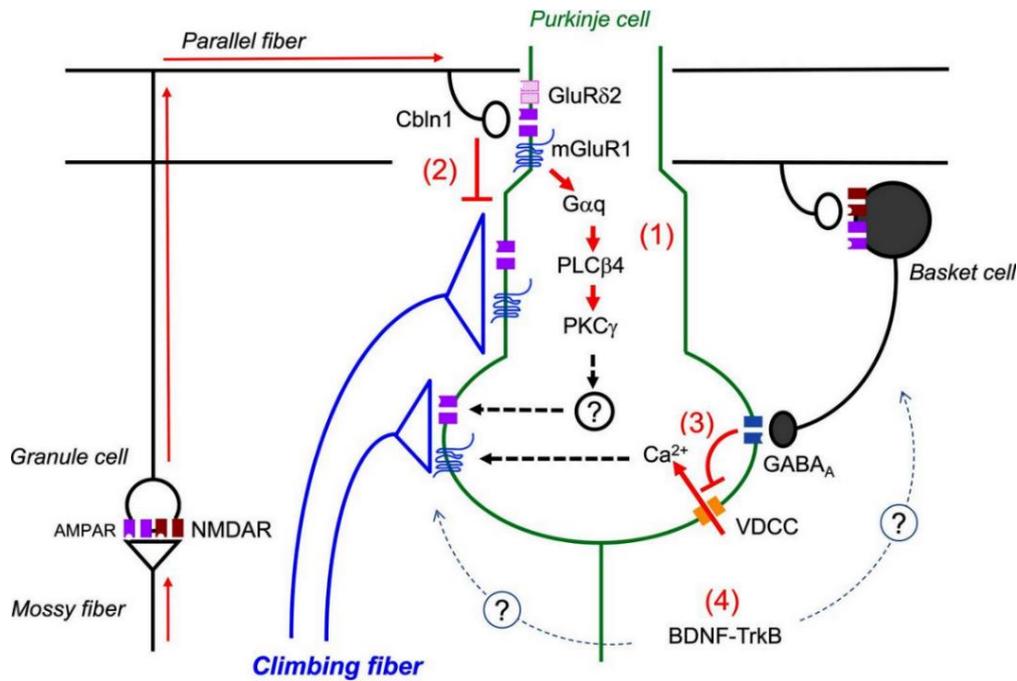
seule PC (Crepel et al., 1976) donnant alors lieu à un phénomène d'élimination synaptique au cours des trois premières semaines post-natales (figure 22) (Watanabe and Kano, 2011; Hashimoto and Kano, 2013). Lors de la première semaine, les PC sont encore immatures. A P3, elles ont une forme étoilée et ne disposent que de fines dendrites primaires ne permettant pas de former des synapses. De ce fait, les fibres grimpantes se terminent sur les protrusions périsomatiques et les épines des PC. A ce stade, une seule PC est innervée par plusieurs fibres grimpantes. A la fin de la première semaine post-natale, une seule fibre subit un renforcement sélectif. Plusieurs synapses vont être formées au niveau du soma de la PC à partir d'une seule fibre grimpante. Ce phénomène est appelé différenciation fonctionnelle. Il est rendu possible grâce à l'activité du canal calcique voltage dépendant (VDCC) situé sur le soma des PC (figure 23). L'inhibition de son activité, induite indirectement par les cellules en panier GABAergiques, facilite l'élimination des synapses non renforcées (Nakayama et al., 2012). A partir de P9, lorsque la morphologie des PC correspond au stade III, la fibre va étendre ses connexions au niveau dendritique. Cette phase de translocation dendritique est optimale à P15. Pendant ce temps, un processus d'élimination des synapses non renforcées des autres fibres grimpantes est mis en place. Il se déroule en deux temps : la phase précoce de P8 à P11 et la phase tardive jusqu'à P17. Cette dernière phase d'élimination est dépendante de la formation des synapses des fibres parallèles avec les PC qui est stabilisée par le système GluR $\delta$ 2-Cbln1-neurexine (figure 23) (Uemura et al., 2010). GluR $\delta$ 2 est impliquée dans la voie de signalisation du récepteur mGluR1 qui va renforcer la synapse fibre parallèle-PC au niveau des dendrites distales et ainsi réduire les possibilités d'innervation des fibres grimpantes sur les dendrites proximales. C'est ainsi qu'une étude sur des souris transgéniques mutantes pour le gène de GluR $\delta$ 2, sous-unité du récepteur ionotropique glutamatergique, a démontré qu'un déficit induit une réduction de moitié du nombre de ces connexions des fibres parallèles (Hashimoto et al., 2009). Une quantité plus importante de fibres grimpantes par PC entre P12 et P14 a été

également été constatée. La mutation de GluR $\delta$ 2 n'aurait en revanche aucun effet à un stade plus précoce, ni sur la morphologie des PC, ni sur l'architecture du cervelet. Egalement, la voie de signalisation du BDNF semble influencer l'élimination synaptique soit de façon indirecte, en promouvant la maturation du circuit inhibiteur GABAergique, soit directement en régulant le maintien ou l'élimination des synapses des fibres grimpantes.



**Figure 22 : Elagage des synapses fibres grimpantes-cellules de Purkinje en période post-natale chez la souris.**

CF : fibre grimpante (Hashimoto and Kano, 2013)



**Figure 23 : Mécanismes intervenant lors de la phase tardive d'élimination synaptique des fibres grimpantes**

1 : activation de mGluR1 et de la voie de signalisation renforçant la synapse fibre parallèle-épine de PC ; 2 : la stabilisation de la synapse des fibres parallèles au niveau des dendrites distales des PC empêche l'innervation des fibres grimpantes au niveau proximal; 3 : la terminaison des cellules en panier sur le soma des PC inhibe l'influx calcique par activation du canal calcique voltage-dépendant (VDCC) ; 4 : le BDNF semble intervenir en participant à la maturation des neurones GABAergiques ou en modulant l'élimination ou le maintien des synapses des fibres grimpantes. (Hashimoto and Kano, 2013)

### 1.3 Données physiopathologiques

Suite à un premier cas rapporté (Bauman and Kemper, 1985), un nombre croissant d'études a démontré que le cervelet est la région la plus souvent atteinte dans les TSA et également la plus altérée. En effet, suite à des analyses *post-mortem*, une diminution significative du nombre de PC a été constatée chez quasiment tous les cerveaux d'individus ayant des TSA (Bailey et al., 1998; Whitney et al., 2008). Cette perte neuronale serait prédominante dans la partie postérolatérale du cervelet (Skefos et al., 2014). L'imagerie par résonance magnétique a permis également d'identifier une hypoplasie des lobules VI et VII au niveau du vermis et de leur partie hémisphérique (Courchesne et al., 1994; Murakami et al., 1989). Des analyses de la connectivité

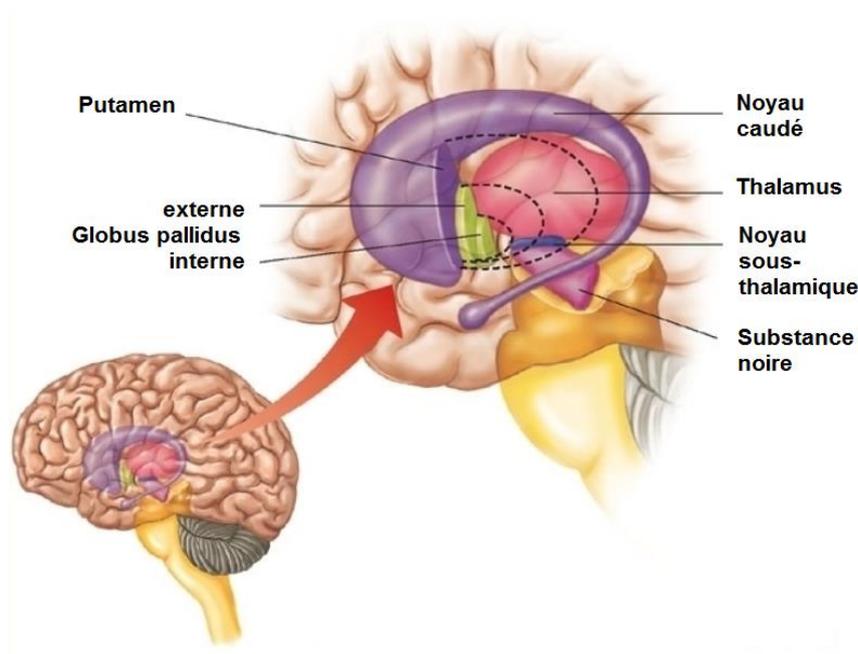
fonctionnelle ont mis en évidence une perturbation de la connectivité entre le cervelet et des aires motrices et non motrices du cortex cérébral chez des patients TSA (Igelström et al., 2017; Khan et al., 2015; Mostofsky et al., 2009).

Des études sur des modèles animaux sont ensuite venues étayer ces données cliniques (cf. II.1). Les lobules sont des entités structurales basiques du cervelet ayant une localisation particulière dépendante de leur fonction. Le vermis étant une structure apparue avec les premiers vertébrés, son organisation est bien conservée entre les espèces. En revanche, les hémisphères s'étant développés au cours de l'évolution, on peut retrouver, au niveau de leur extension, de légères différences structurelles entre les mammifères, notamment concernant les sous-lobules Crus I et Crus II qui sont les plus atteints dans les TSA. D'où l'importance d'identifier, chez les animaux servant de modèles, les lobules homologues, afin de se rapprocher au mieux des conditions pathologiques et de pouvoir comprendre l'étiologie des TSA. Les résultats de Sugihara (Sugihara, 2017) indiquent que chez le rongeur, Crus I est homologue aux sous-lobules Crus I et Crus II chez le primate non humain et chez l'Homme de par sa morphologie, sa localisation par rapport aux autres lobules, ses connections axonales et son profil d'expression moléculaire.

## **2. LE SYSTEME NIGRO-STRIE**

Il est composé de deux structures : le striatum et la substance noire *pars compacta* (SNc), reliées par une mono-synapse striatale. Cette voie uni-directionnelle est fondamentale dans la régulation de la motricité. Ce système fait partie intégrante des ganglions de la base (ou noyaux gris centraux), un ensemble de noyaux sous-corticaux formant avec le cortex et le thalamus une boucle cortico – sous-corticale contrôlant la motricité volontaire (Mink, 1996). Les autres

structures les composant sont le globus pallidus interne et externe (GPi, GPe), la substance noire *pars reticulata* (SNr) ; le noyau sous-thalamique (NST) (figure 24).



**Figure 24 : Organisation des structures composant les ganglions de la base**

## 2.1 Substance noire *pars compacta*

La substance noire est une région située dans la partie ventrale du mésencéphale. Elle est constituée de la SNr et de la SNc, deux aires distinctes qui se différencient par leur composition. Tandis que la SNr a un aspect fibreux, la SNc est la partie de la substance noire qui contient les corps cellulaires de neurones dopaminergiques de grande taille ce qui lui confère cet aspect dense. Les axones de ces neurones font synapse dans le striatum avec les neurones épineux moyens (NEM) et assurent ainsi la voie nigro-striée (Parent and Hazrati, 1995). C'est la dopamine libérée qui va jouer le rôle de modulateur de l'activité des NEM en portant un effet soit activateur via les récepteurs D1 soit inhibiteur via les récepteurs D2. Elle maintient ainsi l'équilibre entre la voie directe et la voie indirecte. Dans la maladie de Parkinson, les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* dégèrent, l'innervation dopaminergique nigro-striée n'est donc plus assurée (Kalia and Lang, 2015). Cette déplétion

dopaminergique conduit à l'inhibition de la voie directe, facilitatrice du mouvement, et à la levée de l'inhibition de la voie indirecte, ce qui induit alors une hypoactivité importante dans le thalamus et le cortex, à l'origine des symptômes moteurs observés : akinésie/dyskinésie, tremblements et rigidité musculaire (Alexander, 2004).

## **2.2 Striatum**

### **2.2.1 Organisation anatomo-fonctionnelle**

Le striatum est une grande région sous-corticale comprenant chez l'Homme le noyau caudé et le putamen. Il est composé d'un type neuronal principal qui représente environ 80-95% des neurones du striatum selon les espèces, nommés neurones épineux moyens (NEM) de par leur taille moyenne et la quantité importante d'épines retrouvées dans leur arborisation dendritique. Ces NEM sont des neurones de projections GABAergiques. Ils sont répartis de façon homogène dans tout le striatum ce qui ne lui confère donc pas d'organisation cytoarchitecturale particulière. Les NEM sont les principales cibles des afférences striatales, ils reçoivent les fibres glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus et constituent aussi les principales efférences (Gerfen, 1988). Bien que présents de manière homogène dans la structure striatale, les NEM se divisent de manière fonctionnelle en deux grandes populations : ceux exprimant les récepteurs de type D1 et ceux exprimant les récepteurs de type D2. Leur fonction respective sera détaillée ultérieurement (cf. III. 2.2.2).

L'autre population neuronale présente dans le striatum concerne les interneurones qui font synapse uniquement dans le striatum et majoritairement avec les NEM. Il en existe deux types : les cholinergiques et les GABAergiques (Kawaguchi, 1993). Les cholinergiques ont un corps cellulaire large et non épineux. Ils reçoivent les projections excitatrices du cortex et du thalamus. Les interneurones GABAergiques sont de même forme mais plus petits. Il en existe trois sous-types : ceux exprimant la parvalbumine, qui sont les plus nombreux, ceux exprimant

la calrétinine et enfin ceux exprimant la somatostatine. Les neurones à projections et les interneurons interagissent alors entre eux pour réguler la réponse aux excitations corticales majoritairement.

Le striatum est innervé par différentes régions corticales selon une topographie particulière qui lui confère des territoires fonctionnels. Ainsi, se distinguent dans un premier temps le striatum dorsal : sensorimoteur et associatif ; et le striatum ventral : limbique (Kreitzer, 2009; McGeorge and Faull, 1989; Parent and Hazrati, 1995; Voorn et al., 2004). Le striatum dorsal se compose des parties latérales du noyau caudé et dorsolatérales du putamen. Des études chez le rongeur ont permis de distinguer deux territoires fonctionnels : le striatum dorsolatéral (DLS) et le striatum dorsomédian (DMS) (Voorn et al., 2004; Yin et al., 2009). Le DLS correspond chez les primates au putamen. Ses afférences proviennent du cortex sensorimoteur. Il serait impliqué dans la mémoire procédurale, les processus de consolidation et d'habituation comportementale comme par exemple l'acquisition d'une automatisation dans l'exécution de mouvements (Yin et al., 2004). Le DMS correspond au noyau caudé chez le primate. Il est innervé par des projections des cortex préfrontal et associatif. Il jouerait un rôle fondamental dans les premières étapes d'apprentissage moteur et la mémoire spatiale (Yin et al., 2005). Quant au striatum ventral, il tiendrait un tout autre rôle, il serait plus impliqué dans la motivation, l'initiation et le contrôle d'une action ou d'un comportement « dirigé ». Il se compose du noyau accumbens et reçoit des afférences du cortex limbique (Heimer and Van Hoesen, 2006).

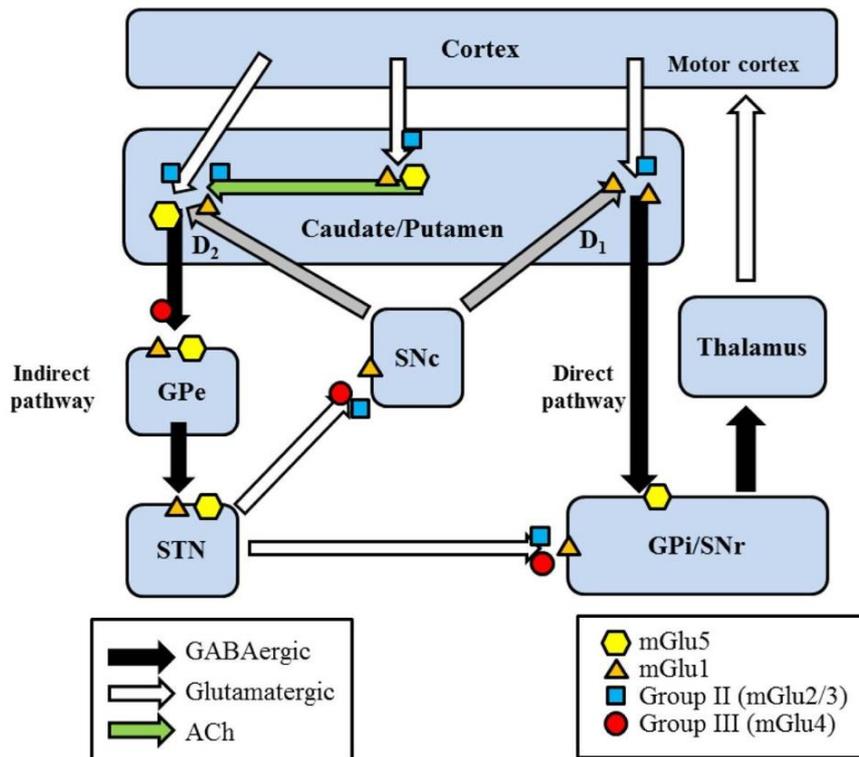
Le striatum est une région importante dans l'exécution du mouvement. Dans la maladie de Huntington, une perte des neurones striataux provoque des symptômes moteurs tels que des mouvements anormaux involontaires, des troubles de la posture et de l'équilibre, une démarche instable. Cette pathologie démontre également que le striatum intervient dans des processus cognitifs et comportementaux qui se manifestent par des déficits des fonctions exécutives et de l'attention, des erreurs de jugements, des difficultés d'apprentissage, des pertes de mémoire et

du sens de l'orientation, mais aussi par des états dépressifs, des troubles obsessionnels et de l'humeur, de l'agressivité (Ho et al., 2003).

Des études réalisées chez l'Homme indiquent que la pathologie des TSA induit des modifications de volume, de forme, d'activité et de connectivité au sein du striatum (Estes et al., 2011; Qiu et al., 2010; Shafritz et al., 2008; Turner et al., 2006). Langer et al. ont montré par IRM que la taille du noyau caudé augmentait deux fois plus rapidement chez des enfants diagnostiqués que chez des enfants au développement typique (+4.6% vs. +2.3% en 27 mois) et que cette augmentation était corrélée à un comportement répété (Langen et al., 2014).

### **2.2.2 Voie directe et indirecte**

Il existe deux sous-populations de NEM qui se différencient par leur projection et leur profil protéique. On distingue les neurones exprimant le récepteur dopaminergique D1 et le neuropeptide Substance P qui sont préférentiellement localisés sur les corps cellulaires des neurones de la voie directe vers la SNr afin de lever l'inhibition sur le thalamus et d'induire un mouvement. Les neurones exprimant le récepteur dopaminergique D2 et le neuropeptide enképhaline exprimés par les neurones striato-pallidaux de la voie indirecte ont pour rôle, à l'inverse, d'inhiber le thalamus et donc d'empêcher le mouvement (figure 25) (DeLong, 1990). Ainsi, le thalamus exerce un rétrocontrôle négatif ou positif sur l'activité corticale selon la voie activée. Il module ainsi l'activité motrice. La dopamine aurait ainsi à la fois un rôle activateur des neurones de la voie directe en se fixant sur les récepteurs D1 et un rôle inhibiteur des neurones de la voie indirecte en se fixant sur les récepteurs D2.



**Figure 25 : Circuits des ganglions de la base**

Les ganglions de la base constituent un ensemble de noyaux gris centraux essentiels au contrôle des fonctions motrices. La principale région afférente est le striatum (caudate/putamen). Le cortex cérébral (y compris le cortex moteur) stimule le striatum par ses projections glutamatergiques. Les principaux noyaux de sortie des ganglions de la base sont la substance noire *pars reticulata* (SNr) et le globus pallidus interne (GPe). Deux voies majeures projettent du striatum vers ces noyaux. La voie directe correspond à l'innervation inhibitrice de ces régions par le striatum : les neurones GABAergiques du striatum qui expriment le récepteur à dopamine D1 projettent sur la SNr et le GPe. La voie indirecte est poly-synaptique et se termine par des projections excitatrices du noyau sous-thalamique (STN) vers les noyaux de sortie. Les neurones GABAergiques du striatum exprimant les récepteurs à dopamine D2 projettent vers le globus pallidus externe (GPe) qui à son tour envoie des projections inhibitrices vers le STN. La balance entre l'activité inhibitrice de la voie directe et l'activité excitatrice de la voie indirecte sur les noyaux de sortie est essentielle au contrôle de la motricité. L'action de la dopamine dans le striatum diminue la transmission au travers de la voie indirecte au profit de celle de la voie directe. Une perte des neurones dopaminergiques dans la substance noire *pars compacta* (SNc), comme dans la maladie de Parkinson, engendre une diminution de l'inhibition de la voie directe, de ce fait l'effet excitateur de la voie indirecte est amplifié augmentant ainsi l'effet inhibiteur des projections GABAergiques des noyaux de sortie vers le thalamus et réduisant l'effet excitateur sur le cortex. Les récepteurs glutamatergiques métabotropiques sont exprimés dans les ganglions de la base. Ceux du groupe I (mGlu1 et mGlu5) sont localisés en post-synaptique et inhibent la réponse des ganglions de la base à la dopamine. Ceux du groupe II (mGlu2/3) sont en pré-synaptique sur les synapses cortico-striatales, STN-SNr, et STN-SNc. Enfin, les récepteurs du groupe III (mGlu4) modulent les synapses cortico-striatales et STN-SNr, ainsi que les synapses intrastriatales GABAergiques. Le système cholinergique module les fonctions des ganglions de la base notamment au travers de l'activité des interneurons cholinergiques dans le striatum qui libèrent de l'acétylcholine (ACh) sur les neurones moyens épineux exprimant les récepteurs muscariniques à acétylcholine M1, M2 et M4. Les M4 sont retrouvés sur les neurones D1. (D'après Nickols and Conn, 2014)

Sur le plan neuroanatomique, il a également été démontré l'existence de projections directes notamment entre les structures de début (GPe) et de fin de voie indirecte (GPi, SNr) qui éviteraient le NST (Jahanshahi et al., 2015). D'autres études ont mis en évidence des collatérales assurant une inter-connexion entre les deux voies (Kawaguchi et al., 1990). Initialement décrites comme étant parfaitement ségréguées, le réseau impliquant ces deux voies paraît finalement beaucoup plus complexe.

### **3. LE CORTEX MOTEUR**

Le cortex moteur est une région corticale située dans la partie postérieure du lobe frontal. Dans la continuité du cortex cérébral, sa composition ne varie pas, c'est-à-dire qu'il est organisé de façon laminaire en 6 couches, I à VI de la plus superficielle à la plus profonde. La plupart des neurones qui le composent sont des neurones excitateurs glutamatergiques (~70%), le reste des neurones sont pour la plupart (~30%) des interneurons inhibiteurs GABAergiques régulant l'activité des neurones à projection (Markram et al., 2004). En 2015, deux études ont montré que le cortex moteur est requis pour l'apprentissage d'une tâche motrice mais n'a en revanche pas d'implication dans son exécution. En effet, après la lésion du cortex moteur chez des rongeurs, seuls les animaux ayant reçu au préalable un entraînement étaient capables de réaliser correctement la tâche motrice (Grillner, 2015; Kawai et al., 2015).

Une récente étude par IRMf, réalisée chez des enfants atteints de TSA et chez des enfants au développement typique, a mis en évidence une parcellisation fonctionnelle du cortex moteur primaire (Nebel et al., 2014). Leurs résultats ont apporté de nouvelles informations concernant les conséquences neurofonctionnelles de la maladie en montrant des différences notables entre les deux groupes, comme par exemple l'expansion de la zone dorsomédiane au dépens de la dorsolatérale. Les auteurs indiquent que ces zones sont impliquées dans la représentation des

jambes par rapport au tronc et des bras par rapport aux mains. Ils suggèrent que de telles perturbations pourraient expliquer les troubles de la motricité fine et globale retrouvés dans les TSA.

Peu d'études se sont intéressées à la fonctionnalité du cortex moteur chez des individus atteints de TSA. Une exploration plus précise de cette région devrait apporter davantage de données concernant les désordres moteurs manifestés par une majorité de patients. Ces données pourraient par la suite suggérer de nouveaux moyens thérapeutiques pour gérer ces symptômes.

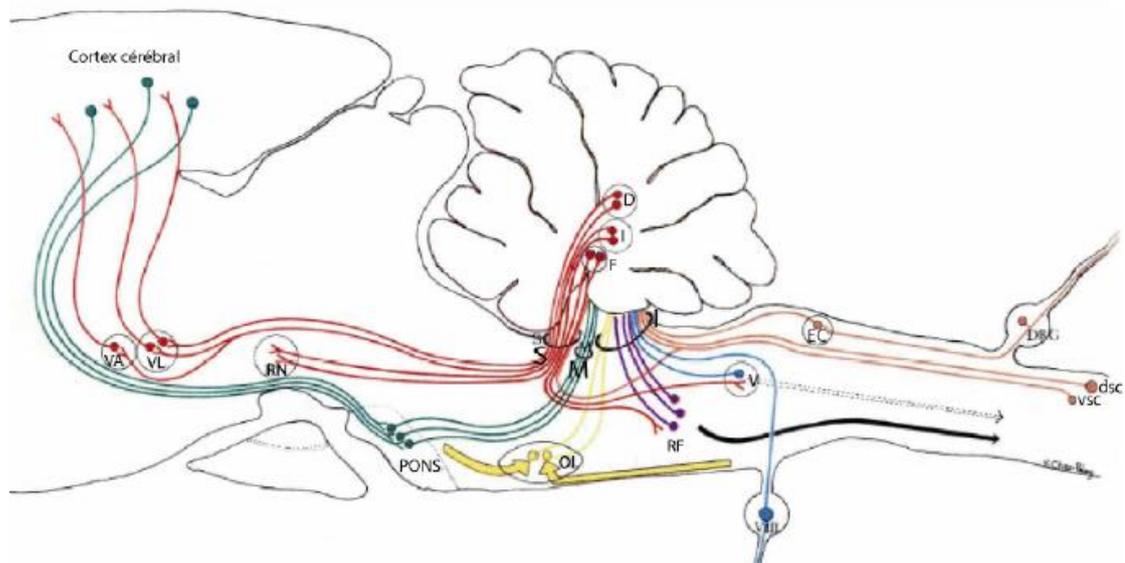
## **4. RELATIONS CERVELET/ SYSTEME NIGRO-STRIE/ CORTEX MOTEUR**

### **4.1 Les pédoncules cérébelleux**

Le cervelet intervient dans des boucles anatomo-fonctionnelles différentes selon les fibres qu'elles impliquent, organisées en faisceaux appelés pédoncules cérébelleux. Selon leur organisation anatomique, ces pédoncules reçoivent toutes les fibres afférentes et efférentes du cervelet, spécifiques de certaines régions (figure 26). Ils assurent ainsi la connectivité entre le cervelet et les autres structures cérébrales. On distingue les pédoncules :

- inférieurs, leur rôle est de relier le cervelet au bulbe par des fibres provenant de la moelle épinière, du tegmentum mésencéphalique et des noyaux vestibulaires vers lesquels se dirigent également des fibres efférentes et dont certaines projettent vers la formation réticulée ;
- moyens, la majorité de leurs fibres est afférente, en provenance du pont et relayant les informations du cortex cérébral et du colliculus supérieur ;
- supérieurs, ils constituent la connexion entre le cervelet et le mésencéphale par des fibres efférentes dirigées vers le thalamus, la formation réticulée, le noyau rouge et les

noyaux vestibulaires. Ces pédoncules tiennent une importance particulière dans cette thèse en raison de leur appartenance à la boucle anatomo-fonctionnelle cérébello-thalamo-corticale (cf. III. 4.2).



**Figure 26 : Schéma des voies afférentes et efférentes passant par les pédoncules cérébelleux**

En orange, les afférences de la moelle épinière qui atteignent le cervelet par les voies ventrale (vsc) et dorsale (dsc) spinocérébelleuses traversant les pédoncules inférieurs (I) et supérieurs (S). En bleu, les afférences vestibulaires constituent les fibres du noyau vestibulaire (V) et des fibres vestibulaires primaires (VIII). Elles projettent vers le noyau fastigial (F) et le lobe flocculo-nodulaire. En violet, les afférences provenant de la formation réticulée (RF). En jaune, les afférences de l'olive inférieure (OI) qui passent par le pédoncule inférieur et projettent vers l'ensemble du cortex cérébelleux. En vert, les afférences des noyaux du pont (pons) qui proviennent du cortex cérébral puis passent par le pédoncule moyen (M) pour terminer dans le cortex cérébelleux. En rouge, les efférences du cervelet qui empruntent le pédoncule supérieur. Celles provenant du noyau dentelé (D) projettent sur les noyaux ventro-latéral (VL) et ventro-antérieur (VA) du thalamus et se terminent dans le cortex cérébral. Les efférences du noyau interposé se terminent dans le noyau rouge (RN) et celles du noyau fastigial, dans la formation réticulée et les noyaux vestibulaires. DRG : ganglion dorsal projetant sur le noyau du cumérus externe (EC).

## 4.2 Boucle cerebello-thalamo-corticale

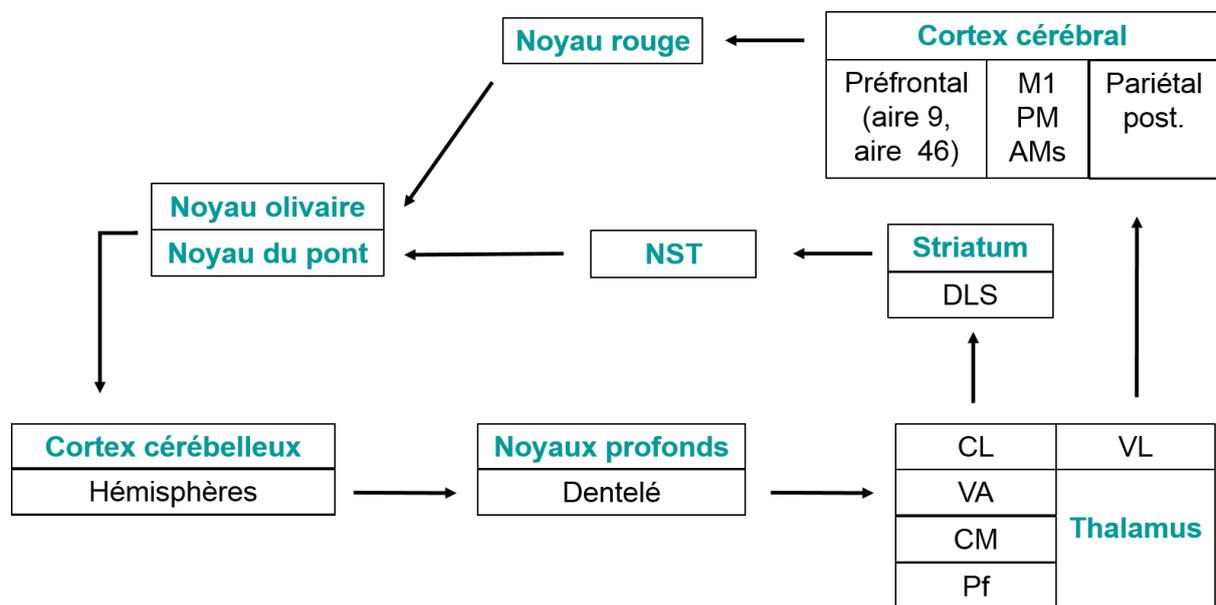
Pour rappel, les PC du cérébrocervelet (hémisphères) projettent sur le noyau dentelé. Les axones de ce noyau profond parviennent au cortex cérébral par l'intermédiaire de deux relais thalamiques : les noyaux ventral latéral (VL) et ventral antérieur (VA) (figure 27). Plus précisément, ces axones quittent le cervelet par les pédoncules supérieurs où ils décussent pour faire synapse majoritairement dans le VL controlatéral. Les efférences du VL projettent ensuite vers plusieurs aires du cortex cérébral : les cortex prémoteur, moteur primaire, l'aire motrice supplémentaire, le cortex préfrontal (aire 9 et 46) et le cortex pariétal postérieur (Clower et al., 2005; Kelly and Strick, 2003; Middleton and Strick, 2001; Na et al., 1997). Les informations cérébelleuses sont alors traitées par le cortex cérébral puis communiquées à nouveau au cervelet par l'intermédiaire du noyau rouge qui va projeter sur les noyaux du pont et les noyaux olivaires. Ceci forme la boucle cérébello-thalamo-corticale qui permet un contrôle direct des informations motrices via les voies cortico-spinales.

## 4.3 Communication bidirectionnelle entre le cervelet et les ganglions de la base

Une autre boucle de régulation intervient dans le contrôle de la motricité. Il s'agit de la boucle cortico-thalamo-striatale (figure 27). Ichinohe et ses collaborateurs ont démontré en 2000 l'existence d'une connexion di-synaptique entre les hémisphères cérébelleux et le striatum dorsolatéral chez le rat via le noyau intralaminaire centrolatéral (CL) du thalamus (Ichinohe et al., 2000). Effectivement, le noyau dentelé est également connecté aux ganglions de la base (striatum) suite aux mêmes relais thalamiques, le VL et le VA et également les noyaux intralaminaires centrolatéral (CL), centromédian (CM) et parafasciculaire (Pf) (Chen et al., 2014; Hoshi et al., 2005). Pour terminer cette boucle, une autre étude chez le primate non-humain a révélé que le noyau sous-thalamique, innervé par le striatum, projette vers les

hémisphères cérébelleux via les noyaux pontiques (Bostan et al., 2010). Il pourrait alors influencer l'activité du cervelet pendant une tâche motrice et non motrice.

Du fait des fonctions d'apprentissage du cervelet et du striatum, cette boucle pourrait jouer un rôle dans les processus de consolidation et d'automatisation de la motricité (Laforce and Doyon, 2001, 2002).



**Figure 27 : Boucles anatomiques impliquant le cervelet le cortex et les ganglions de la base**

AMs : aire motrice supplémentaire ; CL : noyau centrolatéral ; CM : noyau centro-médian ; DLS : striatum dorsolatéral ; M1 : cortex moteur primaire ; NST : noyau sous-thalamique ; Pf : noyau parafasciculaire ; PM : cortex prémoteur ; VA : noyau ventral antérieur ; VL : noyau ventral latéral

## Objectifs de la thèse

Les TSA sont une pathologie psychiatrique neurodéveloppementale dont les premiers signes apparaissent dès les premières années de l'enfant et persistent ensuite tout au long de la vie. Malgré leur amélioration, les méthodes de diagnostic restent associées à des paramètres cognitifs qui rendent souvent le diagnostic difficile. De plus, ces méthodes dépendantes de l'interprétation de l'examineur amènent à une certaine subjectivité dans l'évaluation des déficits.

Nous proposons l'hypothèse que les déficits moteurs retrouvés chez une majorité de patients atteints de TSA pourraient être inclus dans les critères de diagnostic en tant que marqueur biologique facilement quantifiable et non invasif, et qui n'exigerait que peu de participation des enfants. Cette thèse s'inscrit dans un projet de caractérisation de la motricité et des réseaux impliqués dans deux modèles environnementaux des TSA, chez la souris, basés sur deux facteurs de risque prénataux, l'un pharmacologique et l'autre lié à la MIA : suite à l'exposition *in utero* au VPA et au poly I:C respectivement. L'analyse comportementale a récemment fait l'objet d'une autre thèse. Les résultats ont montré des déficits de la coordination motrice corrélés à des déficits sociaux. Ces résultats sont en adéquation avec notre hypothèse de travail.

L'objectif de ma thèse est donc d'identifier, par une approche neuroanatomique, les réseaux neuronaux qui sous-tendent les désordres moteurs dans les TSA et qui seraient alors potentiellement associés également aux déficits sociaux chez ces animaux. Les régions ayant un rôle dans le contrôle de la motricité ont alors été explorées : le cortex moteur, le striatum, la substance noire *pars compacta* et le cervelet.

Les TSA affectant davantage les hommes que les femmes, cette étude a été réalisée en distinguant les femelles des mâles afin de pouvoir déterminer des différences comportementales

et histologiques. L'hypothèse d'un facteur hormonal comme modulateur d'une vulnérabilité face à ces troubles est en cours d'analyse.



# **Partie 2 : Résultats et Travaux en cours**



# I. Les troubles moteurs corrént avec les déficits sociaux et une neuropathologie restreinte dans le modèle d'exposition prénatale au VPA

## DESCRIPTION

Les TSA sont une pathologie psychiatrique neurodéveloppementale qui se caractérise par des déficits de la communication sociale et des comportements restreints et répétés. D'autres signes fonctionnels peuvent être également constatés très tôt chez les enfants atteints : les désordres moteurs. Bien que retrouvés chez une grande majorité de patients, les troubles de la motricité ne sont toujours pas à ce jour inclus dans les critères de diagnostic des TSA. Leur étude pourrait permettre d'apporter de nouvelles données sur la physiopathologie de cette pathologie complexe qui reste encore mal connue. Elle pourrait également amener à proposer de nouvelles voies diagnostiques et thérapeutiques. En effet, les relations entre les troubles moteurs et sociaux et les réseaux neuronaux respectivement impliqués ne sont toujours pas identifiés.

Ainsi, dans cette étude, nous avons exploré le comportement moteur et déterminé la physiopathologie sous-jacente, sur un modèle murin des TSA reconnu et pertinent : l'exposition *in utero* au VPA. Le VPA est une molécule pharmacologique utilisée comme traitement anti-épileptique (Dépakine). De nombreuses études chez l'Homme ont démontré que cette molécule était associée à une forte augmentation du risque de développer des TSA chez des enfants dont la mère prenait le traitement pendant la grossesse. En effet, le VPA serait responsable de perturbations neurodéveloppementales de type TSA chez l'Homme. Il est aujourd'hui couramment utilisé pour établir des modèles animaux dont la physiopathologie présente de nombreuses homologues avec celle retrouvée chez l'Homme. Néanmoins, aucune étude précise et complète de la motricité chez ces animaux n'a été publiée.

Notre objectif était donc d'identifier et de caractériser ces désordres de manière précise chez ce modèle à l'aide d'une batterie de tests et de mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre les troubles moteurs, les déficits sociaux et les atteintes histologiques dans les régions impliquées dans le contrôle de la motricité.

Pour obtenir ce modèle, une injection intrapéritonéale unique de VPA (450 mg/kg) est réalisée chez la souris gestante (C57Bl6/J) au jour embryonnaire E12.5. Le phénotype moteur a fait l'objet de nombreuses observations chez la descendance, dès le plus jeune âge (P9) et ce jusqu'au stade de jeune adulte (P45). Ces tests avaient pour objectif dans un premier temps d'analyser le neurodéveloppement des souriceaux avec l'observation de la date d'ouverture des yeux et la durée du réflexe de retournement une fois l'animal placé sur le dos. Ensuite, une batterie de tests moteurs a été effectuée afin de détecter des problèmes de coordination des mouvements, des irrégularités de la marche, des difficultés de motricité fine et globale. En parallèle, des tests visant à identifier chez ces souris les symptômes caractéristiques des TSA ont été également mis en place : mesure des interactions sociales, des gestes répétés et stéréotypés, de l'exploration. Ensuite, nous avons réalisé une analyse histologique par quantification des neurones dans les régions participant au contrôle de la motricité : le cortex moteur, la substance noire *pars compacta*, le striatum et le cervelet. Plus particulièrement, dans le cervelet, nous avons effectué des comptages des PC en distinguant chaque sous-lobule des lobules VI et VII dans le but d'établir des relations entre l'atteinte d'un sous-lobule et les phénotypes comportementaux. Comme la conformation structurelle du cervelet est aussi fonctionnelle, les lobules et sous-lobules qui le composent se distinguent également par leurs rôles dans la motricité, la cognition et les émotions.

Nos résultats montrent que l'exposition *in utero* au VPA entraîne des déficits moteurs chez les mâles et chez les femelles. La sociabilité des mâles est considérablement réduite tandis que celle des femelles n'est pas affectée. Au niveau histologique, l'exposition au VPA est associée

à une réduction du nombre de PC dans le cervelet plus importante chez les mâles que chez les femelles et localisée dans des sous-lobules différents en fonction du sexe des souris. Dans le cortex moteur, une diminution du nombre de neurones est retrouvée uniquement chez les mâles. De façon très intéressante, nous avons pu démontrer que les désordres moteurs corrèlent avec les déficits sociaux et que ces deux phénotypes corrèlent également avec la perte neuronale chez les mâles. Ainsi, cette étude suggère que les désordres moteurs pourraient contribuer au déficits sociaux dans les TSA et que ces troubles pourraient être liés à des dysfonctionnements dans des réseaux neuronaux communs, notamment dans le cervelet dont on sait qu'il est impliqué dans diverses fonctions motrices, cognitives et sociales. Nous avons pu déterminer également des relations entre le retard développemental et les désordres moteurs à un âge plus avancé, les déficits sociaux et la perte neuronale.

Pris dans leur ensemble, tous ces résultats suggèrent que les troubles moteurs pourraient constituer un marqueur biologique de sévérité des TSA. Une analyse systématique du comportement moteur chez des jeunes enfants pourrait aider au diagnostic des TSA en apportant de nouvelles données quantitatives et objectives. De plus, nous supposons qu'une prise en charge des enfants sur le plan moteur pourrait également participer à une amélioration de leurs déficits sociaux. Cette étude met aussi en évidence des différences entre les mâles et les femelles.

Dans ce modèle, les femelles ne présentent aucun déficit social mais témoignent d'importants problèmes de coordination ainsi que d'une diminution du nombre de neurones dans le cervelet. Ces résultats mettent en exergue les difficultés de diagnostic chez les filles suivant les critères utilisés actuellement et pourraient contribuer à apporter un élément de réponse quant au ratio de trois garçons atteints pour une seule fille. Nous supposons que la motricité est un paramètre important qui apporterait une première indication de troubles neurodéveloppementaux de type

TSA dès le plus jeune âge, lesquels suggèreraient alors une surveillance particulière pour un dépistage plus précoce.

## **TIRE A PART**

(voir pages ci-contre)

## REGULAR RESEARCH ARTICLE

# Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism

Tareq Al Sagheer, Obelia Haida, Anais Balbous, Maureen Francheteau, Emmanuel Matas, Pierre-Olivier Fernagut, Mohamed Jaber

INSERM U-1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, University of Poitiers, Poitiers, France (Dr Sagheer, Ms Haida, Dr Balbous, Ms Francheteau, Dr Matas, Dr Fernagut, and Dr Jaber); CHU Poitiers, Poitiers, France (Drs Balbous and Jaber); Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France (Dr Fernagut); CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France (Dr Fernagut).

T.A.S. and O.H. contributed equally to this work.

Correspondence: Mohamed Jaber, PhD, Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques-LNEC, INSERM U-1084, Université de Poitiers, Bâtiment B36, 1 rue Georges Bonnet, BP 633, TSA 51106, 86073 POITIERS cedex9 – France ([mohamed.jaber@univ-poitiers.fr](mailto:mohamed.jaber@univ-poitiers.fr)).

## ABSTRACT

**Background:** Motor impairments are amongst the earliest and most consistent signs of autism spectrum disorders but are not used as diagnostic criteria. In addition, the relationship between motor and cognitive impairments and their respective neural substrates remain unknown.

**Methods:** Here, we aimed at determining whether a well-acknowledged animal model of autism spectrum disorders, the valproic acid model, displays motor impairments and whether they may correlate with social deficits and neuronal loss within motor brain areas. For this, pregnant female mice (C57BL/6J) received valproic acid (450 mg/kg) at embryonic day 12.5 and offspring underwent a battery of behavioral analyses before being killed for histological correlates in motor cortex, nigrostriatal pathway, and cerebellum.

**Results:** We show that while valproic acid male mice show both social and motor impairments, female mice only show motor impairments. Prenatal valproic acid exposure induces specific cell loss within the motor cortex and cerebellum and that is of higher magnitude in males than in females. Finally, we demonstrate that motor dysfunction correlates with reduced social behavior and that motor and social deficits both correlate with a loss of Purkinje cells within the Crus I cerebellar area.

**Conclusions:** Our results suggest that motor dysfunction could contribute to social and communication deficits in autism spectrum disorders and that motor and social deficits may share common neuronal substrates in the cerebellum. A systematic assessment of motor function in autism spectrum disorders may potentially help the quantitative diagnosis of autism spectrum disorders and strategies aimed at improving motor behavior may provide a global therapeutic benefit.

**Keywords:** valproic acid, cerebellum, motor cortex, gait, Purkinje cells

Received: February 9, 2018; Revised: April 4, 2018; Accepted: May 9, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

## Significance Statement

The paper's main message is that motor impairments in ASD may be indicative of this pathology and may even underlie some of its core cognitive and behavioral features. For this, we conducted a detailed analysis of motor and social behavior in both sexes of a VPA mouse model and correlated these findings to cell loss in specific brain areas such as the cerebellum and motor cortex. Our work brings evidence that motor behavior can be used as a quantitative approach for the diagnosis of ASD and is indicative of social deficits. This opens new avenues in the diagnosis and treatment of ASD targeting the affected brain areas.

## Introduction

Autism is one of the most common and disabling neurological disorders of childhood with no commonly implemented diagnostic test or cure available. It affects 3 times more males than females with a prevalence that has been constantly increasing these last decades to reach a proportion of 1 in 68 individuals (CDC, 2014; Loomes et al., 2017). In the current DSM-5 classification, 2 global symptoms are recognized as hallmarks of autism spectrum disorder (ASD): disorders of social communication and restricted and repetitive behaviors (APA, 2013). However, in their initial reports of autistic patients, Kanner and Asperger described early motor deficits, including clumsy gait in what is now recognized as ASD (Kanner, 1943; Asperger, 1944). As such, motor impairments in ASD have been receiving increased attention recently, and study of their contribution to the pathophysiology of ASD is currently a growing field of research. For instance, there are a number of qualitative and quantitative reports in ASD describing impairments in visio-motor and manual dexterity tasks, limb coordination during tasks requiring balance, agility and speed as well as in gait and ataxia (Fatemi et al., 2012). Furthermore, motor impairments may be amongst the earliest signs of some forms of ASD (Ozonoff et al., 2008). Accordingly, the assessment of motor disorders might help the early and quantitative diagnosis of the pathology and the identification of dysfunctional brain regions and circuits in ASD. Such approach may also pave the way for novel therapeutic interventions that might correct motor impairments and potentially the cognitive and social deficits characteristic of ASD.

With this in perspective, the cerebellum has attracted a renewed interest in ASD as a potential brain area at the crossroads of cognitive and motor symptoms characteristic of the disease. The cerebellum is not only critical for the coordination and control of movements but also implicated in higher functions such as cognition, speech, and emotion. Indeed, the cerebellum controls balance and timing and also has an important contribution in facilitating language and executive functions, all behaviors associated with ASD (Fatemi et al., 2012).

Environmental factors acting in utero are suspected to strongly contribute to the etiology of ASD (Arndt et al., 2005). Among these, valproic acid (VPA) exposure during pregnancy to manage epilepsy and mood disorders has been consistently shown to be a major factor associated with developmental defects leading to ASD (Christianson et al., 1994). Hence, rodent models prenatally exposed to VPA have been increasingly used to model ASD with strong construct, face, and, more recently, predictive validity at the structural, behavioral, and pharmacological levels (Nicolini and Fahnstock, 2018). However, most if not all of these studies have solely focused on the social and cognitive aspects of ASD and have neglected motor aspects of the disease.

Here, we used the VPA model of ASD to extensively determine the motor disturbances associated with this pathology, both in males and females, and to identify associated brain histopathology. We then explored correlations between behavioral

and postmortem outcomes to identify their potential links and offer a new perspective on the disease by demonstrating that motor disorders are linked with social impairments and may share common neural substrates.

## Materials and Methods

### Animals

Animal housing and experimental procedures were performed in accordance with the European Union directive (2010/63/EU) and validated by the regional ethical committee (approval no. 2015020415093780). C57BL/6J Mice (Charles River Laboratories) were housed in ventilated cages with access to food and water ad libitum. Room temperature was maintained at 23°C on a 12-h-light/-dark cycle.

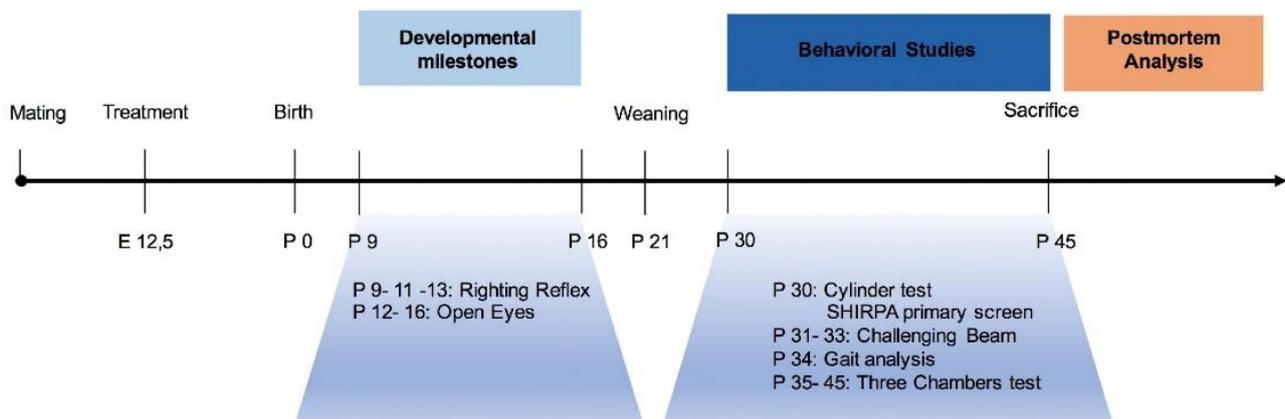
### Experimental Design and Statistical Analysis

Twenty females and 10 males were used for mating. Four females were placed with a single male and left overnight. Pregnant mice received a single i.p. injection of either VPA (450 mg/kg) or NaCl 0.9% at gestational day 12,5 (E12.5) (Nicolini and Fahnstock, 2018) when the neuronal tube is closing in rodents, followed by neurogenesis (Morriss-Kay et al., 1993). Following mating, pregnant mice were left undisturbed until they gave birth. At weaning (P21), pups from different litters were allocated to the 4 experimental groups depending on prenatal treatment: VPA males (n=34), saline males (n=27), VPA females (n=25), and saline females (n=30). The experiment timeline is presented in Figure 1. The battery of tests was performed in the least stressing and challenging order to avoid potential training and learning effects. Animals were tested during their light cycle, and the experimenter was blind to the treatment until all study and analyses were completed.

Data are expressed as mean±SEM and analyzed using GraphPad Prism-7 software. Data that followed a normal distribution (all data except grooming and raring behavior) were analyzed using 1- or 2-way ANOVAs whenever appropriate. Upon significant main effects, Tukey's or Fisher's LSD multiple comparisons were performed for behavioral or histological measures, respectively. When data did not follow a normal distribution, we conducted nonparametric tests (Kruskal-Wallis) followed by Dunn's multiple comparison tests. Pearson correlations between behavioral and neuroanatomical readouts were performed using SPSS Statistics version 21 (IBM). For all analyses,  $P < .05$  was considered significant.

### Assessment of Developmental Milestones (P9–P16)

During early postnatal life (1–3 weeks), pups were kept in their home cage and righting reflex and eye opening were assessed. To assess righting reflex, mice were placed in the supine position and the time taken to right was monitored 3 times with a 5-minute inter-trial interval. Eye opening was assessed daily



**Figure 1.** Behavioral experimental plan. For mating, 3 females were transferred to the male cage and the presence of vaginal plug designated gestational day 0 (GD 0). Pregnant dams were treated with either the antiepileptic agent valproic acid (VPA) (450 mg/kg) or NaCl 0.9% on embryonic day 12.5 (E12.5). Sex and age matched pups were separated from the dams on postnatal day 21 (P21) and raised by groups of 4 in a randomized fashion to avoid littermate effects. Comprehensive behavioral screening was performed between P30 and 45. Mice were then killed, brains harvested for histological analysis.

at postnatal day (P12) to P16 and scored as either 0=both eyes closed, 1=one eye open, or 2=both eyes open.

### SHIRPA Primary Screen (P30)

We implemented the primary SHIRPA screen that serves to identify global disturbances in gait, posture, and muscle tone as well as motor control and coordination abnormalities. Behavior was analyzed in a transparent Plexiglas arena (55×33×22 cm) with 11-×11-cm square grid on the bottom and a 3-mm metal wire crossing diagonally on top. The transfer reaction (time to initiate movement after being placed in the arena and distance covered over 30 seconds) was first evaluated, followed by the wire maneuver test to assess motor coordination and muscle function. Negative geotaxis to assess postural stability and coordination in space was evaluated as the time taken to turn and climb a 45° inclined grid (Rogers et al., 1997).

### Spontaneous Activity in the Cylinder (P30)

Spontaneous activity in the cylinder was performed as previously described (Fleming et al., 2013). Mice were put in a transparent Plexiglas cylinder (diameter: 12 cm), and their activity was videotaped for 3 minutes. Number of rearings and time spent grooming were quantified.

### Assessment of Motor Coordination on the Challenging Beam (P33)

The challenging beam was performed as described previously (Fleming et al., 2004, 2013). The beam consists of four Plexiglas sections (25 cm length) starting with a width of 3.5 cm and gradually narrowed to 0.5- by 1-cm decrements. Animals were first trained for 2 days to traverse the beam starting at the widest section and ending at the narrowest section that led into the home cage. On the test day, a mesh grid (1-cm squares) was placed over the beam surface. Animals were videotaped while traversing the grid-surfaced beam for 5 trials. Time to traverse, errors, number of steps, and errors per step made by each animal were measured and averaged.

### Spatial, Temporal, and Kinetic Gait Parameters (P34)

Gait was analyzed during spontaneous walk using an automated gait analysis system (Viewpoint). The apparatus is made of a

1.5-m-long glass corridor with a dim green light beamed into the glass walkway. The light is reflected downward and a high-speed camera captures footprints' spatial and kinetic parameters. Each mouse was assessed individually for 3 consecutive runs. The following parameters were analyzed: (1) stride length: distance between 2 consecutive placements of the same paw, (2) limb base of support: distance between 2 pair prints at contact during each step cycle, and (3) pair gap: gap between the placement of the 2 trailing feet, which measures spatial coordination between the 2 pairs.

### Assessment of Sociability in the Three Chambers Test (P35–P45)

Social interaction was assessed using the 3-chambers test (Moy et al., 2004). The apparatus consists of a Plexiglas box (60×45×22 cm) partitioned into 3 chambers with retractable doorways. The first phase (PHASE-I) comprises 2 identical nonsocial stimuli (inverted wire cups) placed in the opposite chambers. The second phase (PHASE-II) comprises a nonsocial stimulus and a social stimulus (a naïve mouse with no previous contact with the tested animal). Each phase was of 10 minutes, during which time spent in each chamber was recorded. Subsequently, a sociability index (SI) was calculated as follows: (time exploring social chamber – time exploring nonsocial chamber) / (time exploring social chamber + time exploring nonsocial chamber).

### Tissue Processing and Immunohistochemistry

After behavioral assays (P45), males and females from each group were randomly selected for histopathological analysis. Mice were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (120/20 mg/kg) and transcardially perfused with 0.9% saline at 37°C followed by 4% paraformaldehyde at 4°C. Brains were post-fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 24 hours before cryoprotection in 30% sucrose at 4°C for 48 hours. Serial 50 μm (cerebellum) and 40 μm (striatum, cortex, and substantia nigra) free-floating sections were collected and stored at -20°C until use.

Purkinje cells (PC) within the cerebellum, dopaminergic neurons within the substantia nigra, and neurons in the striatum and the motor cortex were quantified. Every fourth cerebellar section was mounted on gelatin-coated slides, PC were identified by cresyl violet staining as previously described

(Woodruff-Pak, 2006), and their phenotype was further confirmed with calbindin immunohistochemistry (1:2500; Cb-38a, Swant). However, calbindin was not used for PC quantification, as VPA treatment can lead to reduced calbindin protein expression (Main and Kulesza, 2017). Every 6th section throughout the entire striatum, substantia nigra, and motor cortex was selected and processed for either neuronal nuclei antigen (NeuN) to quantify neurons in the striatum and the motor cortex or for tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity to quantify dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). Sections were incubated for 90 minutes in a blocking solution (3% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 in PBS 1 M, pH 7.4). Rabbit anti-NeuN (1:500; Ab177487, abcam) or mouse anti-TH (1:5000; 22941, Immunostar) was applied overnight at 4°C. Biotinylated anti-rabbit or anti-mouse IgG was used as secondary antibody (1:250; BA-1000 and BA-9200, Vector laboratories) for 1 hour at room temperature. Signal was amplified with an ABC Elite kit and revealed with diaminobenzidine (Vector Laboratories). Sections were mounted on gelatin-coated slides and processed for cresyl violet counterstaining.

### Stereology

Stereological estimates were performed using the optical fractionator method and systematic random sampling to obtain the total number of cerebellar PC, motor cortex neurons, striatal neurons, and dopaminergic nigral neurons. Each region of interest was outlined based on the mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2008) at 2.5× objective and neurons were counted at 40× objective using Mercator Software (Explora Nova). Upper and lower guard zones of 1 μm were set at the top and bottom of the section to exclude lost profiles and each neuron or visible nucleus was counted (See Supplementary Table 1).

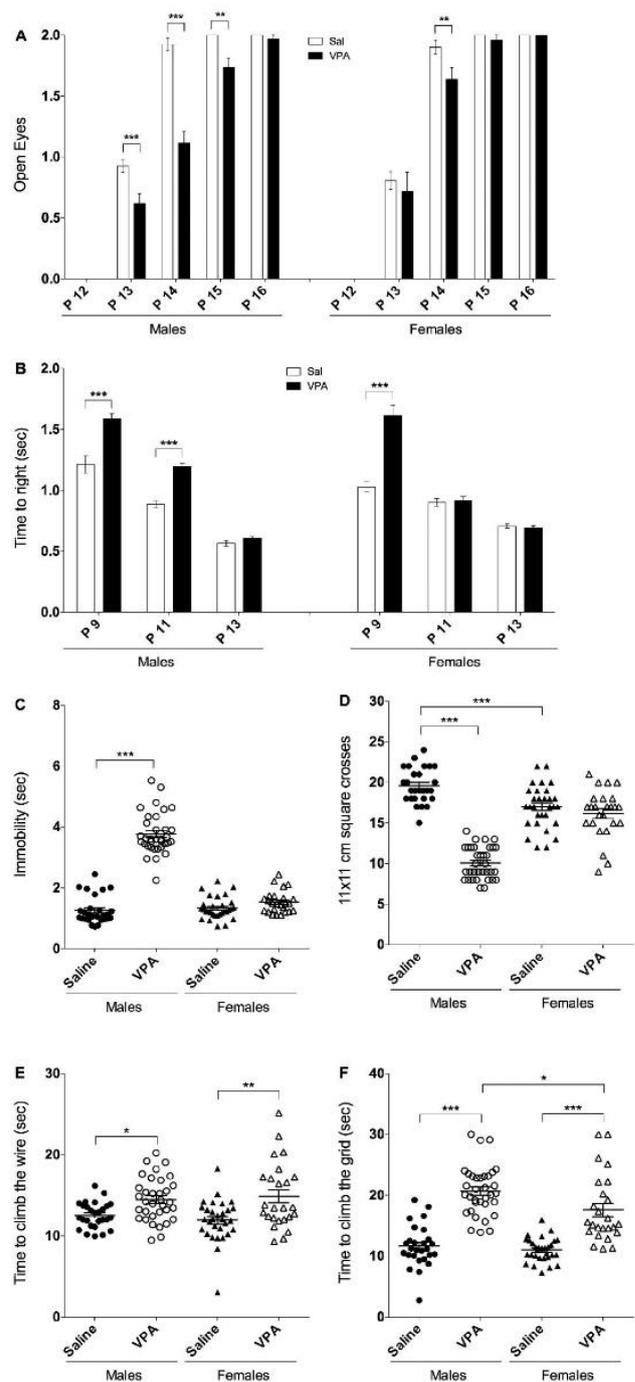
## Results

### VPA Mice Showed Delayed Postnatal Development

Delays in eye opening and righting reflex were assessed at P9–P16 as indicative of general postnatal development. For eye opening (Figure 2A), 2-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [ $F(3, 560)=22.60, P<.0001$ ], age [ $F(4, 560)=830.9, P<.0001$ ], and treatment × age interaction [ $F(12, 560)=6.623, P<.0001$ ]. VPA males showed a significant delay at P13 ( $P<.001$ ), P14 ( $P<.001$ ), and P15 ( $P<.01$ ). Delay appeared earlier and persisted longer in VPA males compared with VPA females, which showed a delay only at P14 ( $P<.001$ ). Regarding the righting reflex, 2-way ANOVA showed a significant effect of treatment [ $F(3, 336)=31.05, P<.0001$ ], age [ $F(2, 336)=323.3, P<.0001$ ], and treatment × age interaction [ $F(6, 336)=18.64, P<.0001$ ] (Figure 2B). VPA males showed a significant latency in righting at P9 and P11 compared with saline ( $P<.0001$ ), and VPA females displayed an increase in the latency only at P9 ( $P<.0001$ ). Thus, VPA prenatal exposure induces significant developmental delays in males compared with saline and that are more pronounced than in VPA females.

### VPA Mice Showed Altered Behavior in the SHIRPA Primary Screen

VPA mice showed altered behavior in different SHIRPA parameters tested at P30 (Figure 2C–F). Time spent immobile following transfer to the SHIRPA arena was assessed, and 2-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [ $F(1, 112)=214.2,$



**Figure 2.** Valproic acid (VPA) prenatal treatment affects several developmental and behavioral paradigms in young pups and that are more pronounced in males than females. (A) VPA mice displayed significant delayed eye opening and (B) latency to righting in comparison with saline. Eye opening was assessed daily at postnatal day (P12) to P16 and scored as 0=both eyes closed, 1=one eye open, or 2=both eyes open. (C) On P30, only VPA males showed a significant increase in immobility (freezing) when transferred to the SHIRPA arena as well as (D) a significant decrease in their locomotor activity. (E) VPA mice show a significant increase in the time climbing the wire and (F) time to climb the grid during the negative geotaxis test in comparison with saline. VPA males ( $n=34/34$ ), saline males ( $n=27/27$ ), VPA females ( $n=25/25$ ), and saline females ( $n=30/30$ ). Data are expressed as mean ± SEM; 2-way ANOVA followed by Tukey's posthoc were performed (\* $P<.05$ , \*\* $P<.01$ , \*\*\* $P<.001$ ).

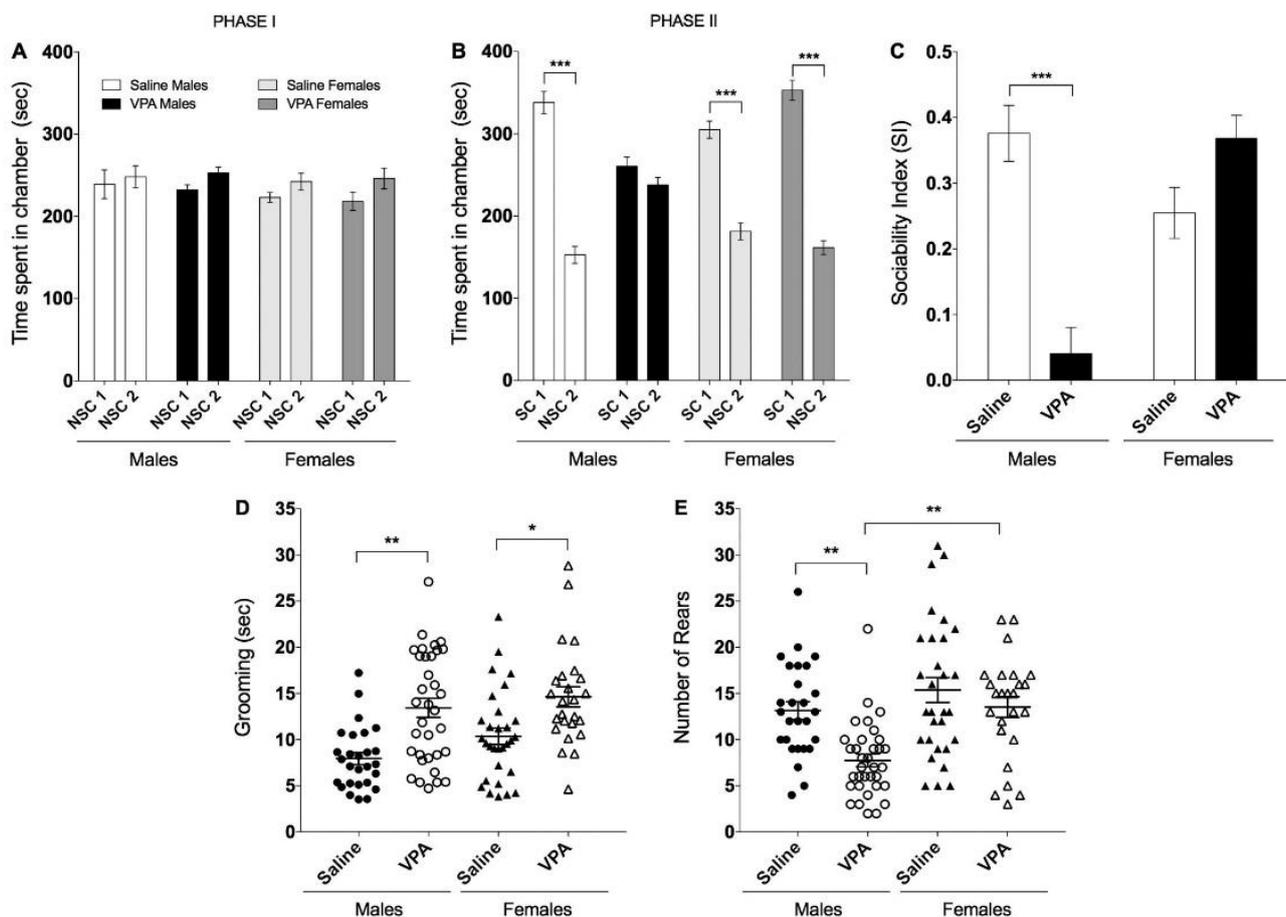
$P<.0001$ ), sex [ $F(1, 112)=136.7, P<.0001$ ], and treatment × sex interaction [ $F(1, 112)=155.6, P<.0001$ ] (Figure 2C). Only VPA males showed a 3-fold increase in immobility compared to saline

( $P < .0001$ ). Directly after transfer to the SHIRPA arena, spontaneous locomotor activity was assessed and an effect of treatment [ $F(1, 112) = 129.4, P < .0001$ ], sex [ $F(1, 112) = 14.64, P < .001$ ], and treatment  $\times$  sex interaction [ $F(1, 112) = 90.78, P < .0001$ ] were found (Figure 2D). VPA males showed a significant decrease in locomotor activity vs saline males (-50%,  $P < .0001$ ) while no difference was observed in females.

For the wire maneuver test, 2-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [ $F(1, 112) = 21.40, P < .0001$ ], and posthoc analysis showed that both VPA males and females were different from saline as they spent respectively +15% ( $P < .05$ ) and +25% ( $P < .001$ ) more time to climb (Figure 2E). Prenatal exposure to VPA also affected negative geotaxis with a significant effect of treatment [ $F(1, 112) = 16.62, P < .0001$ ] on time needed to turn on the grid that was only observed in VPA females ( $P < .001$ ). In addition, treatment [ $F(1, 112) = 117.0, P < .0001$ ] and sex [ $F(1, 112) = 6.557, P = .0118$ ] had an effect on the time needed to climb the grid (Figure 2F). Both VPA males and females spent significantly more time than controls to climb the grid (+78% and +59% respectively,  $P < .0001$ ). This increase in time to climb was more pronounced in VPA males compared with VPA females ( $P < .05$ ).

### VPA Mice Showed Core ASD Symptoms

The 3-chambers test was used to assess social behavior in 5- to 6-week-old male and female mice prenatally exposed to VPA or saline. None of the treatment groups, regardless the sex, showed a spontaneous preference for any of the chambers during the 10-minute habituation (PHASE I) (Figure 3A). As expected, there was a significant effect of treatment on PHASE II when a mouse was introduced to one of the chambers [ $F(1, 128) = 243.8, P < .0001$ ]. Indeed, while saline males spent more time in the social chamber than in the empty chamber (69% vs 31%,  $P < .0001$ ), VPA males spent similar time in both chambers (Figure 3B). This effect was not observed in females that spent more time in the social chamber than in the empty chamber, regardless of the treatment. The effect of VPA on sociability of male mice was even more striking when results were expressed as SI, with a significant effect of treatment [2-way ANOVA  $F(1, 64) = 6.285, P < .05$ ], sex [ $F(1, 64) = 5.453, P < .05$ ] and treatment  $\times$  sex interaction [ $F(1, 64) = 25.75, P < .0001$ ] (Figure 3C). Posthoc analysis showed that VPA males have a 7-fold decrease in sociability ( $P < .0001$ ) compared with saline males, while females had similar SI regardless of the treatment.



**Figure 3.** Valproic acid (VPA) prenatal treatment induced core symptoms of autism spectrum disorder (ASD) mainly in males. (A–C) Social behavior analysis. VPA males ( $n = 27/34$ ), saline males ( $n = 10/27$ ), VPA females ( $n = 16/25$ ), and saline females ( $n = 15/30$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; 2-way ANOVA followed by Tukey's posthoc were performed ( $*P < .05$ ,  $**P < .01$ ,  $***P < .001$ ). (A) Social interaction was assessed using the 3-chambers test. None of the treatment groups showed preference to any of the chambers during the 10-minute habituation (PHASE I). (B) VPA prenatally treated male mice spent less time in the social chamber and more time in the nonsocial chamber relative to controls, (C) they also show a significant decrease in sociability index. (D–E) Grooming and rearing behavior. VPA males ( $n = 34/34$ ), saline males ( $n = 27/27$ ), VPA females ( $n = 25/25$ ), and saline females ( $n = 30/30$ ). (D) VPA mice presented repetitive behavior and (E) a significant decrease in rearing exploratory behavior. Data did not follow a normal distribution and was analyzed using a non-parametric test (Kruskal-Wallis) followed by Dunn's multiple comparison test.

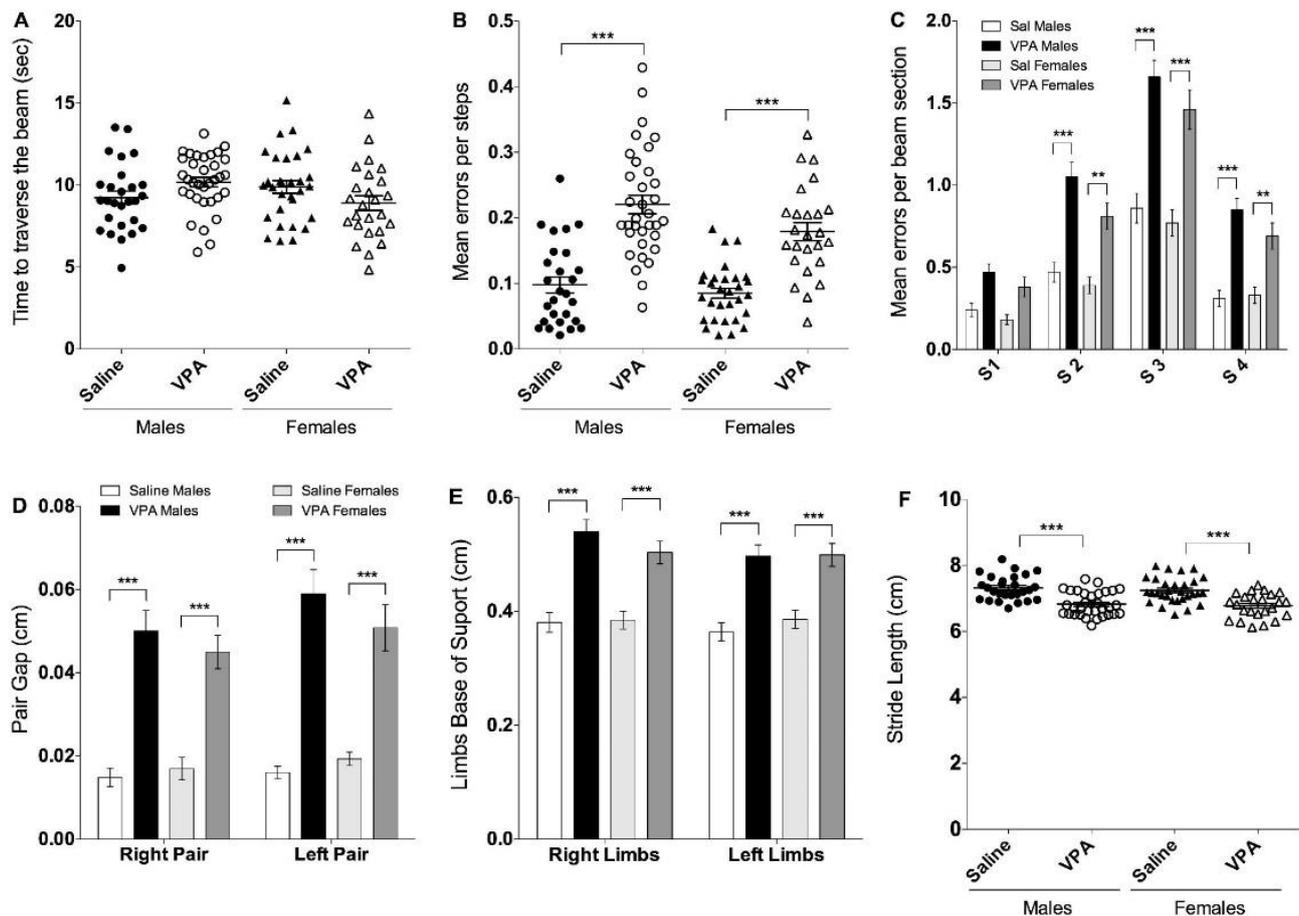
Repetitive and restricted behaviors are among the core symptoms and the earliest signs of ASD (APA, 2013). As the grooming and rearing data do not follow a normal distribution, Kruskal-Wallis nonparametric test was conducted. Time spent grooming in the cylinder test was significantly affected by treatment [ $P < .0001$ ] (Figure 3D) in both VPA males (+69%,  $P < .001$ ) and females (+41%,  $P < .05$ ) compared with their saline counterparts (Dunn's multiple comparison test). Additionally, Kruskal-Wallis test revealed a significant change ( $P < .0001$ ) in rearing behavior (Figure 3E) as VPA males showed a significant reduction in rearing behavior compared with saline (-41%,  $P < .001$ ) and with VPA females (-50%,  $P < .001$ ) (Dunn's multiple comparison test).

### Both VPA Males and Females Show Significant Deficits in Motor Coordination and Gait

On the challenging beam test, the time needed to traverse the beam was not affected by the treatment [ $F(1, 112) = 0.0045$ ,  $P = .9462$ ] (Figure 4A). However, the treatment affected errors per step [ $F(1, 112) = 67.04$ ,  $P < .0001$ ] as both VPA males and females showed a significant increase in errors per step compared with saline (+125% and +110%, respectively,  $P < .0001$ ; Figure 4B). There was also a significant effect of beam section [ $F(3, 448) = 101.0$ ,

$P < .0001$ ], group [ $F(3, 448) = 60.61$ ,  $P < .0001$ ] and beam section  $\times$  group interaction [ $F(9, 448) = 3.135$ ,  $P < .0011$ ] (Figure 4C). Indeed, male and female VPA mice made more errors on the second, third, and fourth beam sections compared with their saline counterparts ( $P < .0001$  each).

Gait analysis indicated that VPA treatment did not affect paw area, speed, or regularity of the run in males or females. However, there was a significant effect of treatment [ $F(3, 220) = 49.86$ ,  $P < .0001$ ] on pair gap (Figure 4D). Indeed, when compared with saline, VPA males and females showed significant increase in right (+2.3-fold,  $P < .0001$ ) and left pair gap (+1.62-fold,  $P < .01$ ). In addition, there was a significant effect of treatment [ $F(3, 220) = 33.74$ ,  $P < .0001$ ] on limb base of support (Figure 4E). Posthoc analysis showed that both VPA males and females have a significant increase in both right and left limbs base of support when compared with saline counterparts (+29 and +40%, respectively,  $P < .0001$ ), indicating that a significant ataxic gait is present in both males and females following prenatal exposure to VPA. Similarly, there was an effect of VPA [ $F(1, 109) = 46.39$ ,  $P < .0001$ ] on stride length (Figure 4F), with a decreased stride length in both VPA males and females (-6.5%,  $P < .0001$ ) compared with their respective saline controls. Altogether, these results indicate major deficits in gait in both VPA males and females.



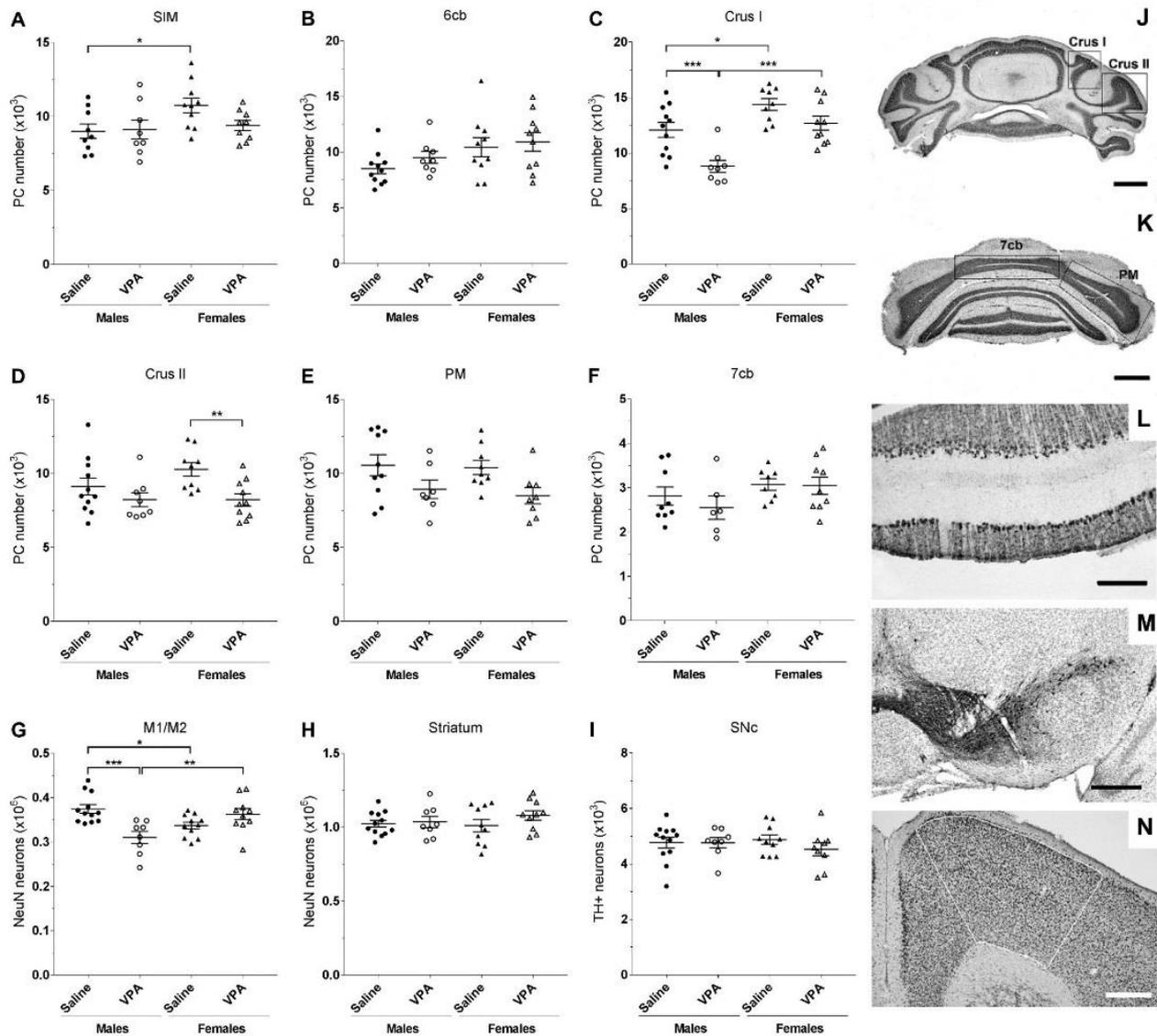
**Figure 4.** Valproic acid (VPA) prenatal treatment induced motor coordination deficits and abnormal gait in both males and females. (A) VPA treatment did not affect the time needed to traverse the beam for any group of mice. (B) VPA males and females showed similar and significant increase in the number of errors per steps in comparison to saline. (C) VPA mice showed significant deficits on the second, third, and fourth sections of the beam. (D) Gait analysis indicated that VPA males and females have a significant increase in both right and left pair gap, (E) right and left limb base of support as well as (F) a significant decrease in stride length in comparison with saline controls. For challenging beam: VPA males ( $n = 34/34$ ), saline males ( $n = 27/27$ ), VPA females ( $n = 25/25$ ), and saline females ( $n = 30/30$ ). For the gait analysis: For the challenging beam, VPA males ( $n = 32/34$ ), saline males ( $n = 27/27$ ), VPA females ( $n = 25/25$ ), and saline females ( $n = 30/30$ ). Data are expressed as mean of 5 trials  $\pm$  SEM, 2-way ANOVA followed by Tukey's posthoc were performed (\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ).

### Cell Loss in Motor Brain Areas of VPA Mice

In the cerebellum, we focused our analyses on lobules VI and VII that were found to be the most affected in ASD (Courchesne et al., 1994; Skefos et al., 2014) (Figure 5). In lobule VI (SIM, 6cb), there was no effect of treatment on PC cell number (Figure 5A–B). However, there was an effect of treatment in lobule VII depending on the sub-lobules (Crus I, Crus II, PM, and 7cb, Figure 5J–K) and sex of the VPA-treated mice. Two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [ $F(1, 34)=16.28$ ,  $P<.001$ ] and sex [ $F(1, 34)=25.3$ ,  $P<.0001$ ] in Crus I. Posthoc analysis revealed a significant PC loss in VPA males in Crus I (-28%,  $P<.001$ ) and a trend in VPA females ( $P=.0594$ ) compared with

saline (Figure 5C). There was also a significant effect of treatment in Crus II [ $F(1, 34)=8.502$ ,  $P<.01$ ] where VPA females, but not males, showed a significant reduction of the number of PC (-20%,  $P<.01$ ) (Figure 5D). These findings indicate that prenatal VPA treatment caused sex-dependent and specific regional loss of PC in the hemisphere part of the lobule VII.

To determine whether deficits in motor behavior may be related to a loss of cortical neurons, we quantified NeuN immunoreactive neurons in the primary and secondary motor cortex. Two-way ANOVA revealed a significant sex  $\times$  treatment interaction [ $F(1, 37)=17.61$ ,  $P<.001$ ], and posthoc analysis showed a significant cortical cell loss in VPA males (-17%,  $P<.001$ ;



**Figure 5.** Loss of neurons in mice prenatally exposed to VPA is sex and region specific. (A–F) Stereological Purkinje cell (PC) count after Nissl staining on coronal section of cerebellum. (J–K) Photos of the different sub-lobules of the lobule VII, scale bars=1 mm. (L) Illustration of the monolayer organization of PC in the cerebellar cortex after DAB-calbindin immunolabeling, scale bars=200  $\mu$ m. No difference in PC number was found within the hemispheric part of the lobule VI, SIM (A), or in the vermal part of the lobule VI, 6cb (B). Significant loss of PC was found in the sub-lobule Crus I of the lobule VII in VPA males (C), whereas VPA females showed PC cell loss in the sub-lobule Crus II (D) of the lobule VII. (E) No effect of treatment on the number of PC in the hemispheric sub-lobule PM, or (F) in the vermal sub-lobule 7cb of the lobule VII was found. (G) A decrease in the number of NeuN-stained neurons in the M1/M2 motor cortex was found in VPA males (outlined area on N, scale bars=400  $\mu$ m). (H) There was no effect of treatment on number of NeuN-stained neurons in the striatum. (I) No change was found in the number of neurons expressing tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra pars compacta (SNc) after DAB-TH immunolabeling on ventral mesencephalic coronal sections (M scale bars=400  $\mu$ m). n(A)=(saline males/VPA males/saline females/VPA females)=9/8/10/9; n(B)=11/8/10/10; n(C)=11/8/9/10; n(D)=11/8/9/10; n(E)=10/7/9/8; n(F)=9/6/8/9; n(G)=12/8/11/10; n(H)=12/8/10/9; n(I)=12/8/10/10. Statistical test: 2-way ANOVA with posthoc Fisher's LSD test. \* $P<.05$ , \*\* $P<.01$ , \*\*\* $P<.001$

Figure 5G). This loss was not observed in females ( $P = .0916$ ), indicating that VPA treatment induces sex-dependent alterations in number of neurons in the motor cortex.

We then explored the effect of VPA treatment on the nigrostriatal pathway, known to be involved in motor control and production of movement. Prenatal VPA exposure did not affect the number of striatal neurons (Figure 5H) or the number of dopaminergic neurons in the SNc (Figure 5I), indicating that motor deficits cannot be attributed to striatal or nigral neuronal loss.

### Relationships between Behavioral and Histopathological Findings

Correlation analyses were performed to determine potential links between behavioral and histological readouts that may be affected by VPA exposure (Table 1). Interestingly, more correlations were observed in males (46/136) than in females (17/136) (Fisher exact test:  $P < .0001$ ). In males, developmental delays observed at P9-16 correlated with motor impairments at a more advanced age (P30-34). For example, the delay of open eyes correlated with the increase of the time spent to climb the grid and with the increase of the left pair gap. The longer righting reflex correlated with the increase of the right pair gap and both delay of open eyes and righting reflex correlated with an increased immobility time in the transfer reaction and a decreased locomotor activity. Moreover, the righting reflex also correlated with the SI. Interestingly, the SI correlated with several motor impairments such as the number of errors per step, time to climb the grid, right pair gap, immobility time, and locomotor activity. Altogether, these data indicate that in VPA-exposed males, the severity of motor impairments correlates with decreased sociability. In addition, neuronal loss in males appears to be linked to a number of behavioral parameters. Indeed, the number of PC in Crus I correlated with motor impairments (errors per step, stride length, distance between the right pair print) and social deficits. The number of neurons in the motor cortex correlated with the time of righting reflex and with the distance of right and left pair gap. These two histological parameters also both correlated with the delay of eye opening, time of immobility and to climb the grid, and finally with the SI.

Collectively, this analysis revealed that, in males: (1) developmental delays correlate with motor impairments later assessed, with social interaction deficits and with neuronal loss in Crus I and motor cortex; (2) motor disturbances correlate with social interactions deficits and neuronal loss; (3) neuronal loss also correlate with the decrease of the SI. Finally, (4) developmental delays, motor impairments, sociability and neuronal loss are all inter-related in males.

In females, the time to turn and climb the grid and time to climb the wire are all correlated. Performances on the grid are also correlated with the distance between the right pair print, which also correlates with the right pair gap. PC loss in Crus II correlated with the time to climb the wire and with the stride length. Interestingly, the number of PC in Crus I also correlated with stride length and developmental delay observed with the righting reflex test. However, there was no correlation between PC counts in Crus I and II and the number of errors per step.

### Discussion

Increasing evidence indicates that motor impairments are present in children with ASD (Ming et al., 2007). However, their contribution to the overall clinical expression of the disease remains undetermined. Standardized and quantifiable procedures to

explore motor disorders may permit early and reproducible diagnosis of this disease. For instance, 5-year-old ASD children show lower gross and fine motor scores, greater praxis errors, lower movement rates, and greater movement variability (Kaur et al., 2018). Focusing on motor behavior may also allow a better identification of the underlying brain circuitry involved and that may be common to behavioral hallmarks of ASD (Stoodley et al., 2017).

Here, we show that prenatal exposure to VPA (1) provoked early developmental deficits and delayed central nervous system maturation; (2) produced ASD social core features in males but not in females; (3) resulted in deficits in motor coordination and gait in males and, to a lower extent, in females; (4) induced cerebellar PC loss in specific lobules and in relation to sex; and (5) decreased the number of motor cortex neurons only in males. In addition, we show that motor behavior is directly correlated with social deficits and is indicative of the extent of cell loss within the cerebellum and the motor cortex.

The VPA rodent model of ASD is widely used due to its proven construct, face, and, more recently, predictive validity (Nicolini and Fahnestock, 2018). This model stems directly from clinical observations showing that prenatal VPA exposure increases up to 10-fold the risk to develop ASD (Moore et al., 2000; Rasalam et al., 2005). Injection of VPA to pregnant rodent females systematically induces ASD-like syndromes in the offspring (Rodier et al., 1996) such as impaired social interaction (Schneider and Przewlocki, 2005; JW Kim et al., 2014; KC Kim 2014), repetitive behavior (Gandal et al., 2010; JW Kim et al., 2014), and delayed motor development (Schneider and Przewlocki, 2005; Main and Kulesza, 2017). Few studies explored motor performances in this model and reported impaired swimming performance (Schneider and Przewlocki, 2005) and righting reactions (Wagner et al., 2006).

Here, and in agreement with previous results, VPA prenatally exposed males and females displayed a delay in eye opening (Roullet et al., 2010) and an increased latency to righting (Iijima et al., 2016), indicating that postnatal development and motor reflexes are affected. VPA males displayed reduced rearing in the cylinder test, increased immobility, and reduced locomotor activity in the SHIRPA arena. This is in line with previous findings obtained in older animals showing reduced locomotor activity following prenatal VPA treatment (Kataoka et al., 2013; Yamaguchi et al., 2017) and with clinical studies showing that children with ASD spend less time actively exploring their environment (Pierce and Courchesne, 2001).

Motor stereotypies, repetitive and uncontrollable motor behaviors, are among the core symptoms of ASD (APA, 2013). In rodents, grooming behavior is often suggested to reflect repetitive/stereotypic behavior (Kalueff et al., 2016). In our study, VPA mice show increased grooming, confirming previous reports with the same animal model (Gandal et al., 2010; Castro et al., 2017). Motor coordination was further explored using the challenging beam test, usually performed in animal models of Parkinson's disease (Fleming et al., 2004, 2013). Both VPA males and females showed a significant increase in the number of errors made during the beam crossing, indicating major motor coordination deficits. This is in line with recent findings in chronically treated rats with VPA showing altered beam walking and motor coordination on a rotarod (Main and Kulesza, 2017).

Gait disturbances and motor development delays were reported in ASD patients (Yirmiya and Charman, 2010). We found altered stride length, pair base of support, and pair gap in our VPA mice models, in line with recent findings with mice bearing a TSC1 genetic knock-out (Tsai et al., 2012) or 15q11-13

Table 1. Interrelations of the Screened Shifts Behavior and the Anatomical Changes

DVPMT	MOTOR										SOCIAL					
	SHIRPA		WIRE		GRID		BEAM		GAIT LAB		3CT		HISTO		M1/M2	
	RR	TR	LA	WM	NG1	NG2	EPS	SL	LPG	RPG	LLBS	RLBS	SI	Crus I		Crus II
DVPMT	OE	.414	.596**	-.530*	.066	.148	.468*	.370	-.167	.456*	.289	.179	.350	-.474	.269	-.649**
	P=	.070	.006	.016	.781	.534	.037	.108	.482	.044	.216	.450	.131	.197	.266	.002
RR			.643**	-.586**	-.212	.042	.423	.340	-.030	.270	.624**	.152	.406	-.840**	-.254	-.569**
					.368	.859	.063	.143	.901	.249	.003	.522	.076	.005	.294	.009
MOTOR	TR	.357		-.776**	.217	.209	.685**	.713**	-.285	.480*	.401	.566**	.386	-.851**	-.247	-.634**
					.358	.377	.001	.000	.223	.032	.080	.009	.093	.004	.308	.003
LA		.050		.000	-.312	-.125	-.795**	-.521*	.050	-.560*	-.394	-.487*	.690*	.444	.189	.468*
					.180	.600	.000	.018	.834	.010	.011	.086	-.029	.040	.438	.038
WM		.837	.871													
NG1		.257	.270	-.482*		-.384	.207	-.145	.219	.233	.173	.392	.001	-.397	-.020	.044
						.095	.381	.543	.353	.322	.465	.088	.997	.290	.937	.858
NG2		.289	.263	.036												
EPS		-.250	.379	-.421												
SL		.302	.109	.073												
LPG		.932	.464	.127												
RPG		-.307	.336	.219												
LLBS		.202	.160	.367												
RLBS		-.077	-.327	-.200												
SI		.754	.172	.412												
Crus I		-.125	.042	.041												
Crus II		.611	.863	.866												
M1/M2		-.012	.300	-.090												
SOCIAL		.962	.212	.713												
HISTO		-.184	.362	-.064												
Males		.450	.128	.796												
Females		-.028	.361	.102												
Males		.341	.868**	.293												
Females		.409	.005	.482												
Males		-.249	-.557**	-.138												
Females		.319	.016	.585												
Males		-.191	-.317	-.325												
Females		.448	.200	.188												
Males		-.162	.444	.202												
Females		.508	.057	.408												

Abbreviations: Crus I, Crus II, number of PC in each sub-lobe of the cerebellum; EPS, errors per step on the challenging beam; LA, locomotor activity; number of crossed squares; LLBS, left limbs base of support; LPG, left pair gap; M1/M2, number of neurons in the motor cortex; NG1/2, negative geotaxis; 1: time to turn, 2: time to climb; OE, open eyes; age when both eyes are open; RR, mean of time of the righting reflex on P9 and P11; RLBS, right limbs base of support; RPG, right pair gap; SI, social index; calculated from the 3-chambers test; SL, stride length on the gait lab; TR, transfer reaction; time of immobility; WM, wire maneuver; time to climb. Correlation analyses using Pearson's method. Cases filled with dark grey or light grey, respectively, for males or females, and indicated in bold, represent the significant correlations between 2 variates. Note the strong correlations among developmental disorders, motor impairments, social interaction deficits, and neuronal loss in males, whereas in females, no relevant correlations were observed. \*P<.05, \*\*P<.01, coeff. gives the correlation coefficient r.

duplication (Piochon et al., 2014) they also in line with recent findings reported in rats exposed to VPA (Main and Kulesza, 2017). Interestingly, analyses of family videos have shown that, within a year, movements and postures of children that will later be diagnosed with ASD were asymmetric (Esposito et al., 2009). Karmel et al. (2010) showed that a decrease in arm tone is present at the age of 1 month in infants who will later develop ASD (Karmel et al., 2010). Furthermore, the presence or absence of fine motor delay at 14 months could predict the developmental trajectory of children who develop ASD (Landa et al., 2013), and 70% of high-risk ASD babies who showed early motor retardation were found to later develop a communication deficit (Bhat et al., 2012). Motor deficits may even aggravate social deficits via an impaired ability to properly interact with the environment and with peers. For instance, Crus I, which is affected in ASD and in the VPA animal model as described below, is involved in visuospatial, motor, and cognitive processing and is thus critical to interpreting the gestures of others but also to guide skilled behavior and imitation, all essential for normal social interaction and all affected in ASD (Marko et al., 2015; Nebel et al., 2016).

Beyond motor behavior, the present study points to a major sex-difference in the effect of VPA exposure on social behavior. We confirm previous findings in male mice prenatally exposed to VPA showing deficits in social behavior (Roullet et al., 2010; JW Kim et al., 2014) and we further report that, in contrast, VPA-exposed females developed normal social interaction skills. This suggests that clinical and preclinical exploration based exclusively on social and cognitive readouts may miss some of the neurodevelopmental consequences of VPA exposure in females.

Postmortem and brain imaging studies have consistently identified the cerebellum as one of the most abnormal brain region associated with ASD, and postmortem brains analyses showed a specific loss of cerebellar PC (Bailey et al., 1998; Wegiel et al., 2014). Here we show a loss of PC within the hemispheric part of lobule VII, in Crus I in males and in Crus II in females. The extent and regionally restricted loss is comparable to those found in postmortem ASD brains (Skefos et al., 2014; Wegiel et al., 2014). Interestingly, PC loss in Crus I was found to be correlated with decreased social interaction in VPA males in accordance with the known cognitive role of this sub-lobule in communication and speech in human, both altered in ASD (Stoodley et al., 2012).

The cerebellum is reciprocally connected to areas involved in motor control such as the striatum, the motor, and premotor cortex (Kelly and Strick, 2003; Bostan et al., 2010). Our results show no change in the number of striatal or dopamine nigral neurons of VPA mice, in accordance with postmortem analysis in the striatum of ASD patients (Wegiel et al., 2014). In contrast, the number of cortical neurons was decreased in VPA males. This resonates with a previous study showing altered cellular morphology in the motor cortex neurons of a VPA rat model of autism (Snow et al., 2008). All together our study indicates that the teratogenic effects of VPA on ASD symptoms extend beyond expression of social skills deficits, mainly observed in males, to reach motor deficits and specific cell loss that are observed in both males and females. As such, some forms of ASD may be equally expressed in both sexes but underdiagnosed in women who develop better social coping strategies than male ASD patients (Tierney et al., 2016).

This is the first study showing strong interrelationships among development, sociability, motor performances, and neuronal loss in any mouse model of ASD. Our study indicates that motor impairments are directly correlated to social interaction

deficits and to cell loss. Moreover, the more profound cell loss, the more deficits are observed both in social interactions and motor behavior.

Thus, we point out here that motor impairment is a relevant and easily implementable biomarker of ASD severity and suggest that a biomechanical assessment of the children's motor abilities may be a precious adjunct tool for the diagnosis of the pathology. Our findings also suggest that focusing on motor behavior and its histopathological correlates may pave the way towards the development of therapeutic strategies aimed at specific brain areas such as the cerebellum and the motor cortex.

## Supplementary Material

Supplementary data are available at *International Journal of Neuropsychopharmacology* online.

## Funding

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale. T.A.S. was awarded a scholarship from the Association of Specialization and Scientific Guidance (Lebanon). O.H. was supported by a fellowship from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the region Poitou-Charentes. The University of Poitiers and INSERM provided infrastructural support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Acknowledgments

We thank the staff of the PREBIOS animal facility (University of Poitiers-France), Marcello Solinas, Marianne Benoit-Marand, Afsaneh Gaillard, and Laurie Galvan for kind advice and Denis Couratin for technical support.

## Statement of Interest

None.

## References

- APA (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM (2005) The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci* 23:189–199.
- Asperger H (1944) Die autistische psychopathen im kindesalter. *Arch Psychiatr Nurs* 117:76–136.
- Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain* 121:889–905.
- Bhat AN, Galloway JC, Landa RJ (2012) Relation between early motor delay and later communication delay in infants at risk for autism. *Infant Behav Dev* 35:838–846.
- Bostan AC, Dum RP, Strick PL (2010) The basal ganglia communicate with the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8452–8456.
- Castro K, Baronio D, Perry IS, Riesgo RDS, Gottfried C (2017) The effect of ketogenic diet in an animal model of autism

- induced by prenatal exposure to valproic acid. *Nutr Neurosci* 20:343–350.
- CDC (2014) Health, United States, 2014: with special feature on adults aged 55–64. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics.
- Christianson AL, Chesler N, Kromberg JG (1994) Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Dev Med Child Neurol* 36:361–369.
- Courchesne E, Saitoh O, Yeung-Courchesne R, Press GA, Lincoln AJ, Haas RH, Schreibman L (1994) Abnormality of cerebellar vermal lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hypoplastic and hyperplastic subgroups with MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 162:123–130.
- Esposito G, Venuti P, Maestro S, Muratori F (2009) An exploration of symmetry in early autism spectrum disorders: analysis of lying. *Brain Dev* 31:131–138.
- Fatemi SH, et al (2012) Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* 11:777–807.
- Fleming SM, Salcedo J, Fernagut PO, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet MF (2004) Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J Neurosci* 24:9434–9440.
- Fleming SM, Ekhatior OR, Ghisays V (2013) Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp* doi: 10.3791/50303.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Cambridge, MA: Academic Press.
- Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ (2010) Validating  $\gamma$  oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry* 68:1100–1106.
- Iijima Y, Behr K, Iijima T, Biemans B, Bischofberger J, Scheiffele P (2016) Distinct defects in synaptic differentiation of neocortical neurons in response to prenatal valproate exposure. *Sci Rep* 6:27400.
- Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC (2016) Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17:45–59.
- Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 2:217–250.
- Karmel BZ, Gardner JM, Meade LS, Cohen IL, London E, Flory MJ, Lennon EM, Miroshnichenko I, Rabinowitz S, Parab S, Barone A, Harin A (2010) Early medical and behavioral characteristics of NICU infants later classified with ASD. *Pediatrics* 126:457–467.
- Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T (2013) Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:91–103.
- Kaur M, M Srinivasan S, N Bhat A (2018) Comparing motor performance, praxis, coordination, and interpersonal synchrony between children with and without autism spectrum disorder (ASD). *Res Dev Disabil* 72:79–95.
- Kelly RM, Strick PL (2003) Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J Neurosci* 23:8432–8444.
- Kim JW, Seung H, Kwon KJ, Ko MJ, Lee EJ, Oh HA, Choi CS, Kim KC, Gonzales EL, You JS, Choi DH, Lee J, Han SH, Yang SM, Cheong JH, Shin CY, Bahn GH (2014) Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *Plos One* 9:e104927.
- Kim KC, Lee DK, Go HS, Kim P, Choi CS, Kim JW, Jeon SJ, Song MR, Shin CY (2014) Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring. *Mol Neurobiol* 49:512–528.
- Landa RJ, Gross AL, Stuart EA, Faherty A (2013) Developmental trajectories in children with and without autism spectrum disorders: the first 3 years. *Child Dev* 84:429–442.
- Loomes R, Hull L, Mandy WPL (2017) What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 56:466–474.
- Main SL, Kulesza RJ (2017) Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience* 340:34–47.
- Marko MK, Crocetti D, Hulst T, Donchin O, Shadmehr R, Mostofsky SH (2015) Behavioural and neural basis of anomalous motor learning in children with autism. *Brain* 138:784–797.
- Ming X, Brimacombe M, Wagner GC (2007) Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain Dev* 29:565–570.
- Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, Dean JC (2000) A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet* 37:489–497.
- Morriss-Kay G, Ruberte E, Fukiishi Y (1993) Mammalian neural crest and neural crest derivatives. *Ann Anat* 175:501–507.
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 3:287–302.
- Nebel MB, Eloyan A, Nettles CA, Sweeney KL, Ament K, Ward RE, Choe AS, Barber AD, Pekar JJ, Mostofsky SH (2016) Intrinsic visual-motor synchrony correlates with social deficits in autism. *Biol Psychiatry* 79:633–641.
- Nicolini C, Fahnstock M (2018) The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol* 299:217–227.
- Ozonoff S, Young GS, Goldring S, Greiss-Hess L, Herrera AM, Steele J, Macari S, Hepburn S, Rogers SJ (2008) Gross motor development, movement abnormalities, and early identification of autism. *J Autism Dev Disord* 38:644–656.
- Pierce K, Courchesne E (2001) Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol Psychiatry* 49:655–664.
- Piochon C, Kloth AD, Grasselli G, Titley HK, Nakayama H, Hashimoto K, Wan V, Simmons DH, Eissa T, Nakatani J, Cherskov A, Miyazaki T, Watanabe M, Takumi T, Kano M, Wang SS, Hansel C (2014) Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism. *Nat Commun* 5:5586.
- Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ, Dean JC (2005) Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol* 47:551–555.
- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J (1996) Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol* 370:247–261.
- Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 8:711–713.
- Roulet FI, Wollaston L, Decatanzaro D, Foster JA (2010) Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience* 170:514–522.

- Schneider T, Przewłocki R (2005) Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30:80–89.
- Skefos J, Cummings C, Enzer K, Holiday J, Weed K, Levy E, Yuce T, Kemper T, Bauman M (2014) Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *Plos One* 9:e81255.
- Snow WM, Hartle K, Ivanco TL (2008) Altered morphology of motor cortex neurons in the VPA rat model of autism. *Dev Psychobiol* 50:633–639.
- Stoodley CJ, Valera EM, Schmahmann JD (2012) Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fmri study. *Neuroimage* 59:1560–1570.
- Stoodley CJ, D'Mello AM, Ellegood J, Jakkamsetti V, Liu P, Nebel MB, Gibson JM, Kelly E, Meng F, Cano CA, Pascual JM, Mostofsky SH, Lerch JP, Tsai PT (2017) Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nat Neurosci* 20:1744–1751.
- Tierney S, Burns J, Kilbey E (2016) Looking behind the mask: social coping strategies of girls on the autistic spectrum. *Res Autism Spectr Disord* 23:73–83.
- Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M (2012) Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in purkinje cell tsc1 mutant mice. *Nature* 488:647–651.
- Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, McRae P, Halladay AK (2006) A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord* 36:779–793.
- Wegiel J, Flory M, Kuchna I, Nowicki K, Ma SY, Imaki H, Wegiel J, Cohen IL, London E, Wisniewski T, Brown WT (2014) Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol Commun* 2:141.
- Woodruff-Pak DS (2006) Stereological estimation of purkinje neuron number in C57BL/6 mice and its relation to associative learning. *Neuroscience* 141:233–243.
- Yamaguchi H, Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K (2017) Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav Brain Res* 333:67–73.
- Yirmiya N, Charman T (2010) The prodrome of autism: early behavioral and biological signs, regression, peri- and post-natal development and genetics. *J Child Psychol Psychiatry* 51:432–458.

## II. Les déficits comportementaux et la neuropathologie de l'autisme sont dépendants du sexe dans un modèle d'activation du système immunitaire maternel

### DESCRIPTION

Dans cet article nos objectifs principaux sont identiques à ceux de l'étude sur le modèle d'exposition *in utero* au VPA. Nous souhaitons explorer le comportement moteur et les réseaux neuronaux sous-jacents sur un modèle de TSA différent afin de : i) explorer la présence potentielle de troubles moteurs quels que soient la cause ou le syndrome de cette pathologie neurodéveloppementale ; ii) appuyer notre proposition que les troubles moteurs peuvent être utiles dans les critères de diagnostic. Cette nouvelle étude est réalisée sur un autre modèle d'exposition prénatale lié au facteur de risque de MIA. En effet, les conséquences de la MIA suite à une infection pendant la grossesse augmentent fortement le risque pour l'enfant d'être affecté par des troubles psychiatriques neurodéveloppementaux tels que des TSA.

Pour induire ce modèle de MIA, nous avons traité des souris gestantes (C57Bl6/J) par injection intrapéritonéale à E12.5 avec un ARN double brin synthétique capable de mimer une infection virale en se fixant sur des récepteurs spécifiques : l'acide polyinosinique:polycytidylique (poly I:C, 20 mg/kg). Une cascade de production de cytokines pro-inflammatoire est alors activée, provoquant des perturbations neurodéveloppementales chez le fœtus. Ce modèle est fréquemment utilisé pour des études sur les TSA mais la motricité est un aspect qui n'a pas à ce jour été exploré en détail. Nous proposons donc pour la première fois sur ce modèle une caractérisation comportementale et histologique de la motricité à l'aide des mêmes analyses que celles utilisées sur le modèle d'exposition *in utero* au VPA. Dans ce projet, nous nous sommes également focalisés sur les effets du traitement selon le sexe des animaux afin de pouvoir proposer des hypothèses quant à l'origine du ratio 3:1 chez l'Homme.

Nos résultats ont montré que seuls les mâles sont affectés par le traitement *in utero* au poly I:C sur quasiment la totalité des paramètres explorés. Plus spécifiquement, les mâles Poly I:C montrent un retard dans développement moteur, des interactions sociales réduites, des irrégularités à la marche et des problèmes de coordination motrice. Au niveau neuroanatomique, une réduction du nombre de neurones dans le cervelet et dans le cortex moteur est constatée. Ces résultats suggèrent que les femelles sont mieux protégées face à cette perturbation développementale pouvant induire des symptômes de type TSA chez les souris. Cette étude sur un modèle de MIA démontre également que les troubles moteurs pourraient être un marqueur biologique des TSA, décelable précocement. Nos résultats apportent un soutien expérimental à notre hypothèse selon laquelle l'exploration de la motricité de l'enfant, dès son plus jeune âge, est un paramètre pouvant être pris en compte dans les critères de diagnostic des TSA. De plus, les troubles moteurs pourraient être considérés comme potentiellement prédictifs et faire l'objet d'un indicateur menant à une surveillance rigoureuse en cas de suspicion. Dans cette étude, nous avons identifiés des régions cérébrales spécifiquement atteintes par cette perturbation développementale provoquée par le poly I:C. Ainsi, ces régions pourraient être la cible de nouvelles approches thérapeutiques visant à pallier les conséquences des TSA sur la motricité et la sociabilité.

## **TIRE A PART**

(voir pages ci-contre)

## Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism

Haida Obelia<sup>a\*</sup> (MS), AL SAGHEER Tareq (PhD), <sup>a\*</sup>, BALBOUS Anais<sup>ab</sup> (PhD), FRANCHETEAU Maureen<sup>a</sup> (BS), MATAS Emmanuel<sup>a</sup> (PhD), SORIA Federico N<sup>c</sup> (PhD), FERNAGUT Pierre Olivier<sup>ac§</sup> (PhD), JABER Mohamed<sup>ab§#</sup> (PhD)

a. Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Université de Poitiers, INSERM, Poitiers, France.

b. CHU Poitiers, 2 Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

c. Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux, CNRS, Bordeaux, France.

**\* and §: These authors contributed equally to this work**

**#: Corresponding author.** Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques-LNEC, INSERM U-1084, Université de Poitiers, Bâtiment B36, 1 rue Georges Bonnet, BP 633, TSA 51106, 86073 POITIERS cedex9 – FRANCE. Email: mohamed.jaber@univ-poitiers.fr. Phone: 33-(0) 549 453 985

Number of words: 5496

Number of figures: 5 +1 supplementary

Number of Tables: 1 supplementary

**Running title:** Poly I:C induces autism-like deficits in males

**Keywords :** Poly I:C, gait, three chambers test, cerebellum, motor cortex, Purkinje cells.

## **Abstract**

Infections during gestation and the consequent maternal immune activation (MIA) increase the risk for developing neuropsychiatric disorders in infants and throughout life, including autism spectrum disorders (ASD). ASD is a neurodevelopmental disorder that affects three times more males than females and is mainly characterized by deficits in social communication and restricted interests. Consistent findings also indicate that ASD patients suffer from movement disorders such as gait dysfunction and motor coordination deficits, although these symptoms are not yet considered in ASD diagnosis criteria. Here we have used the double-stranded RNA analog polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) MIA animal model of ASD in mice and explored its effects both in males and females on social and motor behavior. We then investigated cell loss in brain areas implicated in controlling and coordinating movements, namely the nigro-striatal pathway, motor cortex and cerebellum. We show that only males are affected by this developmental insult in most if not all parameters explored. Specifically, male animals prenatally exposed to poly I:C show reduced social interactions, deficits in gait, motor development and coordination, as well as cell loss in restricted areas of the cerebellar cortex and the motor cortex. These results clearly indicate that females are better protected against early developmental insults leading to ASD symptoms in mice. They also point to movement disorders as possible early quantitative and reproducible diagnosis criteria in ASD. Finally, these results also identify specific brain areas that may be targeted in the aim to better manage social and motor consequences of ASD.

## **Introduction**

Autism spectrum disorders (ASD) are a set of heterogeneous neurodevelopmental disorders characterized by persistent difficulties in verbal and nonverbal communication and restricted and repetitive patterns of behavior (1). ASD can be diagnosed during childhood and affects 3 times more males than females (2). In the absence of biological markers, ASD is currently diagnosed based on clinical scales and there is presently no cure but only symptomatic relief to some of its comorbidities such as anxiety, sleep disorders or seizures (3).

ASD etiology remains elusive and both genetic and environmental components have been identified. Genetic factors have been long suspected to be involved in ASD as this is a highly heritable psychiatric disorder (4). Hundreds of genetic mutations have been associated with ASD, each one contributing to only a small percentage of the disease. A growing interest has been directed towards genes that encode chemokines and cytokines and that are involved in immune reactions but also in neurodevelopment where they regulate cell fate, synapse formation and maturation as well as neurotransmission. Knowledge in this area has been exponentially increasing since the seminal work of Money et al. who reported the first link between an autoimmune disorder and autism in a family transmitted form of the disease (5).

Infection during pregnancy is known to alter neurodevelopment either following direct infection of the fetus or, more often, through the immune response of the mother. Maternal immune activation (MIA) is known to induce several neurological and psychiatric disorders, that, although symptomatically different, share some overlapping etiological and pathophysiological features (6). These range from microcephaly, following the recently reported Zika virus infection for instance (7), to schizophrenia and ASD. Indeed, bacterial, viral or parasite infections during pregnancy (8,9) are reported to increase risks of ASD in offspring (10). The infectious agents do not cross the placental barrier but it's rather the maternal cytokines and immune reaction that impact the fetal brain development following permeation of the placental compartment (11). A study of over 10 000 cases of ASD in the Danish medical Register reported a clear link between viral infection during the first trimester of pregnancy and ASD; a weaker link was also established between bacterial infection during the second semester and ASD (12).

MIA is modeled in animals mainly through injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) or double-stranded RNA analog polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) that both have strong construct and face validity towards ASD and are preferred MIA paradigms compared to direct injection of bacteria or viruses (13,14). Poly I:C injection to pregnant rodent females is considered to have a stronger construct validity than LPS and is generally performed at embryonic day 12.5 (E12.5), when the neuronal tube has closed and progenitors are migrating, a time period when

neurodevelopment is highly vulnerable to environmental insults. This treatment regimen has been shown to induce several cognitive and social features of ASD (11). ASD symptoms reported in offspring include abnormal vocalization, deficits in social interaction and communication and also altered cytokines levels within the cerebellum (15). To this regard, a growing body of evidence is now pointing towards cerebellum abnormalities, where loss of Purkinje cells (PC) in post-mortem ASD brains has been documented. This is also highlighted by recent findings indicating that the cerebellum, mostly its lateral parts, is the site of higher functions regulating language and communication, both abnormal in ASD (16). This relatively recent new angle in the exploration of ASD pathophysiology may permit earlier, quantitative and biological diagnosis of the disease and may even open new avenues in intervention therapies aiming at compensating loss of PC cells in restricted cerebral regions (17,18).

Here, we investigated the behavioral and cellular effects of a poly I:C injection to pregnant female mice at E12.5. We explored behavioral developmental milestones in males and females analyzed separately, followed by special focus on social interactions, gait and fine motor skills and coordination. We then determined the consequence of this treatment on cell integrity in several brain areas implicated in motor control and coordination, namely the nigro-striatal pathway, the motor cortex and the cerebellum. We demonstrate that a single injection of poly I:C to pregnant females induces not only long lasting abnormal social behavior in offspring but also motor deficits and abnormal gait that were accompanied by restricted cell losses within the cerebellum and the motor cortex. Interestingly these defects were observed mainly in males, as females seemed largely unaffected by the MIA whether at the behavioral or cellular levels.

## **Material and Methods**

### Animals

Animal housing and experimental procedures were performed in accordance with the European Union directive (2010/63/EU) and validated by the regional ethical committee (Approval # 2015020415093780). C57BL/6J Mice (Charles River Laboratories, France) were housed in ventilated cages with access to food and water *ad libitum*. Room temperature was maintained at 23°C on a 12h light/dark cycle.

Pregnant mice received a single intraperitoneal injection of either poly I:C (20 mg/kg) (Sigma, P1530) or NaCl 0.9 % at E12.5 as previously described (19). At weaning (P21), pups from different

litters were allocated to four experimental groups depending on prenatal treatment: saline males (n=27), poly I:C males (n=11), saline females (n=30), poly I:C females (n=10). The experiment timeline is presented in supplementary Figure 1. Behavioral tests were performed in the least stressing and challenging order to avoid potential training and learning effects also previously performed with the ASD valproic acid (VPA) animal model (18). Animals were tested during their light cycle and the investigators were blind to treatment assignment.

#### Assessment of developmental milestones

During early postnatal life (1-3 weeks), pups were kept in their home cage and righting reflex and eye opening were assessed from P9 to P16. To assess righting reflex, mice were placed in the supine position and the time taken to right was monitored three times with a five-minute inter-trial interval. Eye opening was assessed daily at P12 to P16 and scored as either 0=Both Eyes Closed, 1=One Eye Open, or 2=Both Eyes Open.

#### SHIRPA primary screen

At P30, we implemented the SHIRPA primary screen that serves to identify global disturbances in gait, posture and muscle tone, as well as motor behavior and coordination (20). Experiments were performed in a transparent Plexiglas arena (55x33x22 cm) with 11x11 cm square grid on the bottom, and a 3-mm metal wire crossing diagonally on top. The transfer reaction (time to initiate movement after being placed in the arena and distance covered over 30 sec) was evaluated, followed by the wire maneuver test to assess motor coordination and muscle function. Negative geotaxis, used to assess postural stability and coordination in space, was evaluated as the time taken to turn and climb a 45° inclined grid (21).

#### Spontaneous activity in the cylinder

Spontaneous activity in the cylinder was performed at P30 as previously described (22). Mice were put in a transparent Plexiglas cylinder, (diameter: 12 cm), and their activity was videotaped for 3 minutes. Number of rearing and time spent grooming were quantified.

#### Motor coordination on the Challenging Beam

The challenging beam test was performed at P33 as previously described (23). The beam consists of four Plexiglas sections (25 cm each) starting with a width of 3.5 cm and gradually narrowed to 0.5 by 1 cm decrements. Animals were first trained for 2 days to traverse the beam starting at the widest section and ending at the narrowest section that led into the home cage. On the test day, a mesh grid (1 cm squares) was placed over the beam surface. Animals were videotaped while traversing the grid-surfaced beam for five trials. Time to traverse, errors, number of steps and errors per step made by each animal were measured and averaged.

#### *Spatial, temporal, and kinetic parameters of gait*

Gait was analyzed during spontaneous walk at P34 using an automated gait analysis system (Gaitlab, Viewpoint, France). The apparatus is made of a 1,5-meter- long glass corridor with dim green light beamed into the glass walkway. The light is reflected downward and a high-speed camera captures footprints' spatial and kinetic parameters. Each mouse was assessed individually for 3 consecutive runs. The following parameters were analyzed: (i) stride length: distance between two consecutive placements of the same paw, (ii) limb base of support: distance between two pair prints at contact during each step cycle and (iii) pair gap: gap between the placement of the two trailing feet, which measures spatial coordination between the two pairs.

#### *Sociability in the three chambers test*

Social interaction was assessed between P35 and P45 using the three-chambers test (24). The apparatus consists of a Plexiglas box (60×45×22 cm) partitioned into three chambers with retractable doorways. The first phase (PHASE-I) comprises two identical non-social stimuli (inverted wire-cups) placed in the opposite chambers. The second phase (PHASE-II) comprises a non-social stimulus and a social stimulus (a naïve mouse with no previous contact with the tested animal). Each phase was of 10 min during which time spent in each chamber was recorded. Subsequently, a sociability index (SI) was calculated as follows: (time exploring social chamber – time exploring non-social chamber) / (time exploring social chamber + time exploring non-social chamber).

#### *Tissue processing and immunohistochemistry*

At the end of behavioral assays (P45), males and females from each group were randomly selected for histopathological analysis. Mice were deeply anesthetized with ketamine-xylazine (120-20

mg/kg) and transcardially perfused with 0.9% saline at 37°C followed by 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C. Brains were post-fixed in 4% PFA at 4°C for 24h before cryoprotection in 30% sucrose at 4°C for 48 h. Serial 50 µm (cerebellum) and 40 µm (striatum, cortex and substantia nigra) free-floating sections were collected and stored at -20°C until use in an anti-freeze solution. PC within the cerebellum, dopaminergic neurons within the substantia nigra *pars compacta* (SNc) and neurons within the striatum and the motor cortex were quantified. Every fourth cerebellar section was mounted on gelatin-coated slides for PC quantification or microglia morphology analyses. PC were identified based on their morphology on cresyl violet staining as previously described (25) and their phenotype was further confirmed using calbindin immunohistochemistry (1:2500; Swant, Cb-38a). Calbindin was not used for PC quantification as ASD inducing treatments can lead to reduced calbindin protein expression (26). Microglia was revealed using a rabbit anti-Iba1 primary antibody (1:500; Wako, 019-19741) and a counterstaining with cresyl violet was used to identify granular and molecular layers. Every sixth section throughout the entire striatum, substantia nigra and motor cortex was selected and processed for either neuronal nuclei antigen (NeuN) to quantify neurons in the striatum and the motor cortex, or for tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity to quantify dopaminergic neurons in the SNc. Sections were incubated for 1h30 in a blocking solution (3% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 in PBS 1M, pH 7.4). Rabbit anti-NeuN (1:500; abcam, Ab177487) or mouse anti-TH (1:5000; Immunostar, 22941) antibodies were applied overnight at 4°C. Biotinylated anti-rabbit or anti-mouse IgG was used as secondary antibody (1:250; Vector laboratories, BA-1000 and BA-9200) for 1h at room temperature. Signal was amplified with an ABC Elite kit and revealed with diaminobenzidine (Vector Laboratories). Sections were mounted on gelatin-coated slides and processed for cresyl violet counterstaining.

### Stereology

Stereological estimates were performed using the optical fractionator method and systematic random sampling to obtain the total number of cerebellar PC, motor cortex neurons, striatal neurons and dopaminergic nigral neurons. Each region of interest was outlined based on the Franklin and Paxinos's mouse brain atlas (27) at 2.5x objective and neurons were counted at 40x objective using Mercator image analysis system (Explora Nova, France). Upper and lower guard zones of 1 µm were set at the top and bottom of the section to exclude lost profiles and each neuron or visible nucleus was counted (see supplementary Table 1 for stereology parameters).

### Microglial morphology

Z-stack images of Iba1-stained cerebellar sections were taken at 40x objective in different parts of the sublobule Crus II in males, and distinguishing between the granular and molecular layers. Images were then processed for segmentation and fractal analysis by a semi-automated method using ImageJ software as previously described (28). Briefly, diaminobenzidine and cresyl violet staining were artificially separated by color deconvolution. Resulting z-stacks were converted to maximal projection images with the stack 'sum' function before thresholded binarization. Area and perimeter of cells and their convex hulls were measured with ImageJ default tools to calculate shape descriptors. Fractal box counting dimension, form factor ( $4\pi \times \text{cell area}/\text{cell perimeter}^2$ ), convexity (convex hull perimeter/cell perimeter) and solidity (cell area/convex hull area) were calculated for at least 20 cells per animal.

### Statistical analyses

Data are expressed as mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM) and analyzed using GraphPad Prism-7 software (La Jolla, California, USA). Data were analyzed using Student's T-test, one-way, two-way analysis of variance (ANOVAs), or Mann-Whitney test whenever appropriate. Tukey's, Dunn's, or Fisher's LSD post-hoc multiple comparisons were applied. Pearson correlation coefficients between behavioral and neuroanatomical readouts were performed using SPSS Statistics version 21 (Armonk, NY: IBM Corp). For all analyses, a p value  $<0.05$  was considered significant.

## **Results**

### Post-natal development delays are more pronounced in poly I:C males

To determine the effect of prenatal exposure to poly I:C on general postnatal development we investigated eye opening delays and righting reflex at P9-P16. In the eye opening measurements (Figure 1A), statistical analyses indicated a significant effect of treatment [F (3, 370)=9.348,  $p<0.0001$ ], age [F (4, 370)=736.9,  $p<0.0001$ ] and a treatment x age interaction [F (12, 370)=2.891,  $p=0.0008$ ] but no effect of sex. Tukey's post-hoc test revealed a significant eye-opening delay in poly I:C males at P13 ( $p<0.001$ ) and P14 ( $p<0.01$ ). The delay was observed in poly I:C females only at P14 ( $p<0.0001$ ). For the righting reflex, there was a significant effect of treatment [F (3, 222)=15.30,  $p<0.0001$ ], age [F (2, 222)=83.37,  $p<0.0001$ ] and a treatment x age interaction [F (6, 222)=3.421,  $p=0.0030$ ] (Figure 1B). Tukey's post-hoc revealed a significant latency in righting in

poly I:C males at P9 ( $p<0.0001$ ) and P11 ( $p<0.05$ ) compared to saline. Poly I:C females displayed an increase in the latency only at P9 ( $p<0.01$ ). These results indicate that males and females exposed prenatally to poly I:C manifest developmental delays that appear earlier and are more pronounced in males.

#### *Poly I:C males show altered spontaneous activity and motor coordination*

At P30, poly I:C mice showed altered behavior in different SHIRPA primary screen and cylinder test parameters (Figure 1C-H). Time spent immobile following transfer to the SHIRPA arena was assessed and Kruskal-Wallis test showed a significant effect of treatment [ $p<0.01$ ] (Figure 1C). Dunn's multiple comparison test revealed that only poly I:C males showed ~65% increase in immobility ( $p<0.01$ ). Directly after the transfer to the SHIRPA arena, locomotor activity was assessed. An effect of treatment [ $F(1, 74)=18.72, p<0.0001$ ], and a treatment x sex interaction [ $F(1, 74)=6.124, p<0.05$ ] was found (Figure 1D). Tukey's post-hoc analysis showed a significant (-24%) decrease in locomotor activity only in poly I:C males ( $p<0.0001$ ). We then assessed postural stability and coordination in space using negative geotaxis measured as the time needed to turn and to climb a 45° inclined grid (Figure 1E). We found an effect of treatment [ $F(1, 74)=9.794, p<0.01$ ] on time needed to turn on the grid. However, Tukey's post-hoc test revealed no significant difference between groups. In addition, sex [ $F(1, 74)=4.486, p<0.05$ ] had an effect on the time needed to climb the grid but the post-hoc test did not indicate significant difference between groups. Finally, we implemented the wire maneuver test to assess motor coordination and muscle function (Figure 1F). Kruskal-Wallis test showed a significant effect of treatment [ $p<0.01$ ] and Dunn's multiple comparison tests determined that only poly I:C males were statistically different from saline as they spent more time to climb the metal wire (+17%,  $p<0.05$ ).

Repetitive and restricted behaviors are among the core symptoms and the earliest signs of ASD (1). We assessed repetitive grooming and rearing behaviors in a new environment using the Plexiglas cylinder test for 3 minutes. Time spent grooming was affected by treatment [Kruskal-Wallis,  $p<0.05$ ] (Figure 1G) but Dunn's multiple comparison test indicated no significant change in both poly I:C males and females compared to their saline counterparts. Poly I:C treatment had a significant effect on rearing behavior (Kruskal-Wallis test,  $p<0.01$ ) in both males and females that showed an almost 50% reduction compared to control (Dunn's multiple comparison test,  $p<0.05$ ) (Figure 1H). These results indicate that poly I:C males, but not females, exhibited motor coordination deficits and were more affected by a changing environment while both sexes showed decreased exploratory behavior.

### *Poly I:C males show altered gait*

As several studies in ASD patients clearly pointed to gait disturbances, including reduced stride length and increased base of support (29,30), we analyzed gait at P33-34 with a special focus on stride length, pair base of support and pair gap. Our analyses revealed that poly I:C treatment did not affect paw area, nor speed or regularity of the run, neither in male or female mice. However, we found a significant treatment effect [ $F(3, 148)=49.86, p<0.0001$ ] on the pair gap (Figure 2A). Indeed, when compared to saline, poly I:C males, but not females, showed significant increase in both right and left pair gap (respectively: +1.97 fold,  $p<0.001$  and +1.76 fold,  $p<0.05$ ; Tukey's post-hoc). Two-way ANOVA revealed no significant effect of group [ $F(3, 148)=0.7706, p=0.5122$ ] on limbs base of support (Figure 2B) or stride length [ $F(1, 47)=0.1638, p=0.6868$ ] (Figure 2C). Two-way ANOVA showed an effect of sex [ $F(1, 47)=4.801, p<0.05$ ] on stride length but with no significant change in both poly I:C males and females in comparison to saline controls (Tukey's post-hoc analysis). These results indicate that only poly I:C males show specific gait deficits that are reminiscent of those observed in ASD patients.

On the challenging beam test, statistical tests indicate no effect of treatment or sex on the time needed to traverse the beam sections (Figure 2D). In addition, the number of errors per step (Figure 2E) and the number of errors at each beam section (Figure 2F) were not affected by the treatment.

### *Reduced sociability in poly I:C males*

One of the hallmarks of ASD are deficits in social interactions (1). Social behavior of mice prenatally exposed to poly I:C was assessed at age of 5-6 weeks (P35-45) using the three-chambers test (Figure 3). None of the treatment groups, regardless the sex, showed a preference to any of the chambers during the 10 minutes habituation (PHASE I) (Figure 3A). In Phase II, Kruskal-Wallis test detected a significant effect of treatment ( $p<0.0001$ ). Indeed, while saline males spent more time in the social chamber than in the non-social one (69% versus 31%,  $p<0.001$ ), poly I:C males spent 58% of their time in the social chamber versus 42% in the non-social one ( $p>0.999$ ) showing no significant preference towards social interaction (Figure 3B). Dunn's multiple comparison test showed that both saline and poly I:C females spent more time in the social chamber [ $(p<0.01)$  and  $(p\leq 0.05)$  respectively]. These findings were further confirmed when expressed as SI as poly I:C males showed a 57% decrease in sociability (Mann Whitney test,  $p\leq 0.05$ ), while females had similar SI regardless of the treatment (Figure 3C). These results reveal that poly I:C prenatal exposure impairs sociability in males, but not in females. This is in accordance with the sex differences of ASD in clinical settings where ASD is 4 times more diagnosed in males than in females (2).

### Purkinje cell loss in poly I:C males

Given the behavioral motor deficits observed, we aimed at determining the effect of poly I:C treatment on cell numbers in major brain areas involved in motor control such as the cerebellum, the nigro-striatal pathway and the motor cortex. In the cerebellum, we focused our analyses on the two lobules that have been demonstrated to be the most affected in ASD: lobule VI and VII (31,32). In lobule VI, we did not observe any effect of treatment on PC cell number (Figure 4A-B). However, in lobule VII, there was an effect depending on the sub-lobules investigated (Crus I, Crus II, PM and 7cb, Figure 4C-F, J-L) and on the sex of poly I:C mice. Indeed, in Crus II, two-way ANOVA analyses revealed a significant effect of treatment [ $F(1, 32) = 10.62, p < 0.01$ ] and sex [ $F(1, 32) = 7.165, p < 0.05$ ]. Post-hoc tests revealed a significant ~17% PC loss in poly I:C males in the sub-lobule Crus II ( $p < 0.05$ , Figure 4D) but no significant change in females. There was also a significant effect of treatment in 7cb [ $F(1, 28) = 5.834, p < 0.05$ ] and a significant effect of sex [ $F(1, 28) = 6.584, p < 0.05$ ]. A significant PC loss around 15% was determined in poly I:C males ( $p < 0.05$ ) but not in females (Figure 4F). These findings indicate that poly I:C treatment induced a sex-dependent loss of PC cells affecting only males and within specific sub-regions of the cerebellum.

We then quantified NeuN immunoreactive neurons in the primary and the secondary motor cortex (Figure 4N). Two-way ANOVA analysis revealed a significant effect of treatment [ $F(1, 37) = 5.523, p < 0.05$ ] and sex [ $F(1, 37) = 6.263, p < 0.05$ ]. Post-hoc tests showed a small but significant ~6% cortical cell loss in poly I:C males ( $p < 0.01$ ) but not in females (Figure 4G). We also investigated whether the nigro-striatal pathway could be implicated in the motor deficits observed. Our results showed that neither the number of striatal neurons (Figure 4H) were altered, nor the number of neurons in the SNc (Figure 4I), as evidenced by TH labeling (Figure 4M), indicating that motor or exploratory deficits following poly I:C treatment are not attributable to striatal or nigral neuronal loss. In all, specific and restricted cell loss was observed in the cerebellum and the motor cortex of poly I:C males but not females with the nigro-striatal pathway being intact in both sexes.

### No changes in the microglia morphology at P45 in Crus II

Following the observation of a PC loss in Crus II in poly I:C males, we then investigated whether MIA could have induced long-lasting microglial activation in this area (Figure 5). We found no change of Iba1 positive microglial cells morphology between the saline and the poly I:C male mice, neither in the granular layer (Figure 5B), nor in the molecular layer (Figure 5C). The majority of the

cells had a small soma with multiple processes, features that characterize quiescent microglial cells (Figure 5A). This indicates that there is no protracted microglial activation in this area.

## **Discussion**

This study aimed at investigating several behavioral and cellular parameters related to ASD in male and female mice that were exposed to a MIA during their prenatal life. For this, we explored social interactions, motor and gait performances, and determined their histological correlates in brain areas implicated in motor control, regulation and coordination. Our results indicate that poly I:C prenatal exposure leads to delayed development mainly in male pups as evidenced by delayed eye opening and increased immobility time when pups are put in an unnatural supine position. Poly I:C periadolescent males also showed increased immobility in a novel environment, decreased motor activity and increased time necessary to climb a grid, all phenotypes that were unaffected in poly I:C females. Poly I:C young adult males were also unable to develop normal social behavior in the three chambers test whereas that of poly I:C females did not differ from saline. While neither poly I:C males nor females showed deficiencies in fine motor skills evaluated using the narrowing beam walking paradigm, male poly I:C mice did show gait abnormalities as evidenced by increased pair gap. Interestingly, these behavioral deficiencies observed only in poly I:C males were mirrored by restricted cell loss in the lateral parts of the cerebellum, its vermis, and in the motor cortex. Most previous studies using the poly I:C prenatal exposure rodent model have focused only on males (33) or have pooled together males and females with scarce data (19) rendering it difficult to determine potential sex differences following MIA. This is of relevance given that ASD ratio is 3:1 in males (2) and being a male a major risk factor in developing neurological or psychiatric disorders (34).

As ASD is mainly diagnosed based on the behavioral hallmarks of the disease that are social deficits and restricted and repetitive behaviors, previous studies using the poly I:C paradigm focused mainly on social symptoms (33,35,36). However, it is increasingly recognized that ASD patients suffer also from fine motor skills disturbances and gait problems. It is of interest to remind that initial and almost concomitant, but separate works of Asperger and Kanner, indicated that ASD is also accompanied by movement disorders including gait (37,38). Despite their recurrence, these symptoms are still not currently used in the diagnosis of ASD. This is of importance as motor paradigms may provide earlier and more quantitative diagnosis of ASD and thus possibly better management. In addition, focusing on motor behavior in animal models, rather than social and cognitive behavior may better help identify the brain regions associated with the phenotype observed. This in turn may even lead to the development of new interventional therapies aimed at

ameliorating motor dysfunction as a symptom or at improving the functioning of targeted brain areas, among which the cerebellum, as others and we have recently proposed (18,39).

#### *The poly I:C animal model of autism*

Poly I:C-induced MIA is a common procedure used to generate animal models of ASD, but also depression and schizophrenia. These psychiatric pathologies, although different in their expression, seem to share to some extent overlapping clinical and therapeutic management and common biological mechanisms such as epigenetic modifications involving histone acetylation and promoter methylation (40). The link between MIA and ASD is potent and has been confirmed in human (12,41) and animal models (33,35,42) The poly I:C animal model of ASD has been repeatedly validated and shows strong construct and face validity (19,35,43).

Previous reports have shown that poly I:C prenatal treatment induces decreased social interaction with normal grooming behavior (35) and decreased motor performance in a rotarod task (33). Additionally, prior research using similar dose and time of exposure of poly I:C have found that this treatment induces decreased exploration in open-field as well as reduced preference for the social chamber in three chambers test (43). However, and to the best of our knowledge, this is the first study exploring in detail motor behavior, fine motor skills and gait in both sexes in the poly I:C mouse model. This is also the first study that also focused on cerebellar sub-regions, motor cortex and the nigrostriatal pathway in these animal models and reporting restricted cell loss in distinct regions of the cerebellum and the motor cortex and that were only observed in males.

The finding that gestational MIA can induce ASD-like postnatal behavior abnormalities underlines the roles played by the prenatal environment in shaping brain development and in provoking lasting complex behaviors. Gestation is a critical and sensitive period where environmental insults can permanently shape brain morphology and function. Alterations in neuronal development occurring around E12 in rodents can result in severe abnormalities as this is a key period of neuronal proliferation, migration, differentiation, synaptogenesis, apoptosis and myelination (44).

#### *Poly I:C treatment induced neuronal loss in the motor cortex and cerebellar cortex*

Cerebellar lobules VI and VII play a major role in movement regulation, exploratory behavior, stereotyped and repetitive behaviors, and oculomotor activity (45–47) but also in cognitive functions such as speech (48). PCs are the integrating center of the cerebellum and the sole output from the cerebellar cortex. Several studies have shown a loss of these neurons in ASD (49–52). In this study, we have demonstrated a PC loss in the cerebellum of male, but not female, mice

prenatally exposed to poly I:C. To the best of our knowledge, no study has ever examined the cellular consequences of poly I:C treatment in separated groups of males and females. Indeed, most studies with animal models of ASD either use only males (33) or combine males and females within the same group (19). In this latter reference, the authors showed a 20% loss of PC in the vermal lobule VII, but not in lobule VI. This finding was later confirmed by Naviaux et al. in 2013 who reported a 63% PC loss at the age of 16 weeks (33). Our results are thus in accordance with these studies indicating no PC loss in the lobule VI and a significant loss in the lobule VII, of 15 to 17% magnitude at the age of 45 days. Moreover, we show here that this loss appears to be restricted to the sub-lobules Crus II and 7cb, easier to delineate with coronal sections as used here compared to sagittal sections used in prior studies. Indeed, the lobules of the cerebellum are divided into sub-lobules that have their own specific functional roles relatively to the different brain areas that they project to. Thus, a sub-lobule segregation is a significant regional parameter to explore and this has not been performed to date. In human, Crus II plays an important role in speech, social cognition, stereotyped and repetitive behaviors, movement regulation, oculomotor activity (39,48,53) all being affected in ASD (54). The PC of this region are inter-connected with the area 46 of the dorsolateral prefrontal cortex, a region involved in working memory, attention, movement regulation and organization. Deficits in PC in this cerebellar area could underlie some ASD symptoms such as language/communication disturbances, stereotyped and repetitive behaviors, social interaction deficits and sensorimotor impairments.

Additionally, we report here a deficit in PC in the vermis (sub-lobule 7cb) of male animals, in line with previous reports in this animal model (19,33). These findings are in relevance with clinical data that report vermal hypoplasia in ASD patients. The role of vermal part of the cerebellum is still not clearly determined. Nevertheless, it has been shown in human, that a transcranial magnetic stimulation provoked impaired visual motion discrimination suggesting a role of the cerebellar vermis in visual motion processing (55). A study on vermal connections in non-human primate has demonstrated that the cerebellar vermis receives projections from motor areas including the primary motor cortex (56). In relation with this, we showed here a modest but significant neuronal loss in the M1/M2 motor cortex in poly I:C males. These findings could be indicative of a connectivity dysfunction between the motor cortex and the cerebellum occurring only in male animals but not in females.

Vargas et al (57), have reported a microglial activation within the cerebellum of ASD patients. This was further corroborated by a later study showing microglial activation mediated by TLR3-poly I:C binding (58). Given these clinical data, we have examined microglial status in poly I:C animals but found no morphological alterations, in accordance with Hui et al. using the poly I:C mouse model

(59). Together these results indicate that behavioral deficits displayed by male mice exposed prenatally to poly I:C occur in the absence of protracted neuroinflammation in the cerebellum.

In a previous study, we recently reported that VPA mouse models of ASD also exhibit autism-like behavioral phenotype and PC cell loss (18). The main differences between the two studies is that VPA treatment affected similarly both males and females, except for the social interaction paradigm that was not alerted in VPA females whereas with the poly I:C treatment females seemed better protected against MIA as they showed almost no behavioral or cellular notable deficits. These results highlight the heterogeneity found in ASD relative to the wide range of syndromes and symptoms and indicate that males, more than females, are differentially vulnerable to various environmental insults occurring during pregnancy. The basis for this male bias is unknown with theories including the “extreme male brain”, hormonal differences, and genetic influences (for a review see (60)). Hormonal influences on sex bias in ASD are complex although it is now widely accepted that testosterone must play a key role in ASD during fetal and postnatal development (61). For instance, increased levels of testosterone have been correlated with ASD (62) including in women with autistic traits (63). Several loci on the X chromosome were found to be associated with ASD. This is the case with the gene *PTCHD1* at chromosome Xp22.11 (64) or *FOXP3* (65) being key candidates for male sex bias in ASD.

## **Conclusion**

We report here that a single poly I:C injection on E12.5 negatively affects behavioral neurodevelopmental parameters, sociability, motor activity and coordination as well as gait and that these deficiencies are mainly if not only observed in males. These findings are reminiscent of clinical and epidemiological observations showing higher incidence of ASD in males than in females. They clearly question the biological basis sustaining such differences and that may be of genetic or endocrine nature (66,67). As a matter of fact, being male is one of the major risk factors to develop psychiatric or neurological disorders with ASD being amongst the most gender-biased disorders (34). This stresses the need to study how gender may protect against the effects of MIA in ASD and emphasize the importance of assessing behavioral phenotypes and underlying biological parameters in both sexes in animal models relevant to neurodevelopmental disorders such as ASD.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). TAS was awarded a scholarship from the Association of Specialization and Scientific Guidance (ASSG- Lebanon). OH was supported by a fellowship from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the region Poitou-Charentes. The

University of Poitiers and INSERM provided infrastructural support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. We thank the staff of the PREBIOS animal facility (University of Poitiers-France), Afsaneh Gaillard and Marcello Solinas for kind advice in behavioral studies, Erwan Bezard for support with the glial studies and Denis Couratin for technical support.

**Conflict of interest:** The authors have no competing financial interests or potential conflicts of interest.

## References

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub; 2013. 1519 p.
2. Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017;56(6):466–74.
3. Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options. *Neurosci Bull*. 2017;33(2):183–93.
4. Bohm HV, Stewart MG. Brief report: on the concordance percentages for autistic spectrum disorder of twins. *J Autism Dev Disord*. 2009;39(5):806–8.
5. Money J, Bobrow NA, Clarke FC. Autism and autoimmune disease: a family study. *J Autism Child Schizophr*. 1971;1(2):146–60.
6. Buckley PF, Miller BJ, Lehrer DS, Castle DJ. Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2009;35(2):383–402.
7. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects - Reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med*. 2016;374(20):1981–7.
8. Atladóttir HO et al. Association of hospitalization for infection in childhood with diagnosis of autism spectrum disorders: a Danish cohort study. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010;164(5):470–7.
9. Spann MN, Sourander A, Surcel H-M, Hinkka-Yli-Salomäki S, Brown AS. Prenatal toxoplasmosis antibody and childhood autism. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res*. 2017;10(5):769–77.
10. Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res*. 2009;204(2):313–21.
11. Reisinger S et al. The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther*. 2015;149:213–26.
12. Atladóttir HO et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2010;40(12):1423–30.

13. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun.* 2010;24(6):881–97.
14. Meyer U. Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry.* 2014;75(4):307–15.
15. Pendyala G et al. Maternal immune activation causes behavioral impairments and altered cerebellar cytokine and synaptic protein expression. *Neuropsychopharmacology.* 2017;42(7):1435–46.
16. D’Mello AM, Moore DM, Crocetti D, Mostofsky SH, Stoodley CJ. Cerebellar gray matter differentiates children with early language delay in autism. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res.* 2016v;9(11):1191–204.
17. Stoodley CJ et al. Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nat Neurosci.* 2017;20(12):1744–51.
18. Al Sagheer T et al. Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(9):871–82.
19. Shi L et al. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav Immun.* 2009;23(1):116–23.
20. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user’s guide. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(7):519–29.
21. Rogers DC et al. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 1997;8(10):711–3.
22. Fleming SM, Ekhtor OR, Ghisays V. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson’s disease. *J Vis Exp JoVE.* 2013;(76).
23. Fleming SM et al. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2004;24(42):9434–40.
24. Moy SS et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 2004;3(5):287–302.
25. Woodruff-Pak DS. Stereological estimation of Purkinje neuron number in C57BL/6 mice and its relation to associative learning. *Neuroscience.* 2006;141(1):233–43.
26. Main SL, Kulesza RJ. Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience.* 2017;340:34–47.
27. Franklin KBJ, Paxinos G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press; 2008. 360 p.
28. Soria FN et al. Glucocerebrosidase deficiency in dopaminergic neurons induces microglial activation without neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* 2017;26(14):2603–15.
29. Vilensky JA, Damasio AR, Maurer RG. Gait disturbances in patients with autistic behavior: a preliminary study. *Arch Neurol.* 1981;38(10):646–9.

30. Weiss MJ, Moran MF, Parker ME, Foley JT. Gait analysis of teenagers and young adults diagnosed with autism and severe verbal communication disorders. *Front Integr Neurosci.* 2013;7:33.
31. Courchesne E et al. Abnormality of cerebellar vermal lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hypoplastic and hyperplastic subgroups with MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 1994;162(1):123–30.
32. Skefos J et al. Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PLoS One.* 2014;9(2):e81255.
33. Naviaux RK et al. Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly(IC) mouse model. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e57380
34. McCarthy MM. Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016;18(4):361–72.
35. Schwartzer JJ et al. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. *Transl Psychiatry.* 2013;3:e240.
36. Xuan ICY, Hampson DR. Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. *PLoS One.* 2014;9(8):e104433.
37. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr.* 1943;35(4):100–36.
38. Asperger H. [Die “Autistischen Psychopathen”im Kindesalter]. 1944;117: 76–136.
39. D’Mello AM, Crocetti D, Mostofsky SH, Stoodley CJ. Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *NeuroImage Clin.* 2015;7:631–9.
40. Tang B, Jia H, Kast RJ, Thomas EA. Epigenetic changes at gene promoters in response to immune activation in utero. *Brain Behav Immun.* 2013;30:168–75.
41. Fox E, Amaral D, Van de Water J. Maternal and fetal anti-brain antibodies in development and disease. *Dev Neurobiol.* 2012;72(10):1327–34.
42. Hsiao EY, Patterson PH. Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development. *Dev Neurobiol.* 2012;72(10):1317–26.
43. Smith SEP, Li J, Garbett K, Mimics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2007;27(40):10695.
44. Rice D, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 3:511–33.
45. Pierce K, Courchesne E. Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol Psychiatry.* 2001;49(8):655–64.
46. Takagi M, Zee DS, Tamargo RJ. Effects of lesions of the oculomotor vermis on eye movements in primate: saccades. *J Neurophysiol.* 1998;80(4):1911–31.
47. Voogd J, Schraa-Tam CKL, van der Geest JN, De Zeeuw CI. Visuomotor cerebellum in human and nonhuman primates. *Cerebellum Lond Engl.* 2012;11(2):392–410.

48. Stoodley CJ, Valera EM, Schmahmann JD. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. *NeuroImage*. 2012;59(2):1560–70.
49. Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*. 1985;35(6):866–74.
50. Bailey A et al. A clinicopathological study of autism. *Brain J Neurol*. 1998;121 ( Pt 5):889–905.
51. Whitney ER, Kemper TL, Bauman ML, Rosene DL, Blatt GJ. Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains: a stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum Lond Engl*. 2008;7(3):406–16.
52. Wegiel J et al. Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 141.
53. Jack A, Keifer CM, Pelphrey KA. Cerebellar contributions to biological motion perception in autism and typical development. *Hum Brain Mapp*. 2017;38(4):1914–32.
54. Fatemi SH et al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum Lond Engl*. 2012;11(3):777–807.
55. Cattaneo Z et al. Cerebellar vermis plays a causal role in visual motion discrimination. *Cortex*. 2014;58(Supplement C):272–80.
56. Coffman KA, Dum RP, Strick PL. Cerebellar vermis is a target of projections from the motor areas in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):16068.
57. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005;57(1):67–81.
58. Town T, Jeng D, Alexopoulou L, Tan J, Flavell RA. Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *J Immunol*. 2006;176(6):3804–12.
59. Hui CW et al. Prenatal immune challenge in mice leads to partly sex-dependent behavioral, microglial, and molecular abnormalities associated with schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2018 Feb 8;11:13
60. Becker KG. Male gender bias in autism and pediatric autoimmunity. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res*. 2012;5(2):77–83.
61. Baron-Cohen S, Knickmeyer RC, Belmonte MK. Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science*. 2005;310(5749):819–23.
62. Auyeung B, Taylor K, Hackett G, Baron-Cohen S. Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old children. *Mol Autism*. 2010;1(1):11.
63. Ingudomnukul E, Baron-Cohen S, Wheelwright S, Knickmeyer R. Elevated rates of testosterone-related disorders in women with autism spectrum conditions. *Horm Behav*. 2007;51(5):597–604.
64. Noor A et al. Disruption at the PTCHD1 locus on Xp22.11 in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Sci Transl Med*. 2010;2(49):49ra68.

65. Bonnet C et al. Pure de-novo 5 Mb duplication at Xp11.22-p11.23 in a male: phenotypic and molecular characterization. *J Hum Genet.* 2006;51(9):815–21.
66. Auyeung B et al. Fetal testosterone and autistic traits. *Br J Psychol Lond Engl* 1953. 2009;100(Pt 1):1–22.
67. Hu VW, Sarachana T, Sherrard RM, Kocher KM. Investigation of sex differences in the expression of RORA and its transcriptional targets in the brain as a potential contributor to the sex bias in autism. *Mol Autism.* 2015; 6: 7.

## Legends

### **Figure 1: Prenatal exposure to poly I:C leads to developmental delays, altered spontaneous activity and motor coordination in male mice.**

(A) Delay in eye opening was measured as the mean number of open eyes (0, 1, or 2) per group from P12 to P16 in males (left) and females (right). Note that males show earlier delay in this parameter. (B) Increased latency to right at P9 and P11 in poly I:C males (left) but only at P9 in poly I:C females (right). (C) Immobility time when transferred to the SHIRPA arena is increased only in poly I:C males. (D) Locomotor activity (LA) after the transfer to the SHIRPA arena. Only poly I:C males showed a decrease in this parameter. (E) No significant change in time to climb on the grid was found in poly I:C mice compared to saline. (F) Significant increase in time spent climbing the wire was found only in poly I:C males. (G) No significant change in the time spent grooming was found in poly I:C mice compared to saline. (H) Poly I:C prenatal exposure significantly decreased the number of vertical rears in the cylinder in both sexes. poly I:C males n=11; saline males n=27; poly I:C females n=10; saline females n=30. Data expressed as mean  $\pm$  SEM; two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc (A, B, D and E), and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (C, F, G, and H) (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### **Figure 2: Prenatal exposure to poly I:C leads to gait abnormality only in males.**

(A) Poly I:C males (black bars) show significant increase in both right and left pair gap during the run on the Gait-Lab. Poly I:C mice show no significant change in both right and left limbs base of support (B) and stride length (C). (D) Poly I:C treatment did not affect the time needed to traverse the beam nor the number of errors per steps crossing the beam (E). Poly I:C prenatally exposed males (black bars) and females (dark gray bars) show no change in the number of errors per steps on different beam sections, in comparison to Saline (F). poly I:C males n=11; saline males n=27; poly I:C females n=10; saline females n=30. Data expressed as mean  $\pm$  SEM; two-way ANOVA

followed by Tukey's post-hoc (A, B, C, D, and F), and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (E) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

**Figure 3: Prenatal exposure to poly I:C leads to reduced social behavior in males.**

Sociability was assessed through the three-chambers test. **(A)** PHASE I: time spent in nonsocial chamber-1 (NSC1) *versus* nonsocial chamber-2 (NSC2) is unaffected by treatment or sex. **(B)** PHASE II: time spent in the social chamber-1 (SC1) is significantly higher than time spent in NSC2 for each groups. However, this difference was significantly lower in poly I:C males compared to saline males. In line with this finding, **(C)** Sociability Index (SI) indicates that poly I:C prenatally treated males have a significantly decreased sociability. poly I:C males  $n=8$ ; saline males  $n=10$ ; poly I:C females  $n=5$ ; saline females  $n=15$ . Data expressed as mean  $\pm$  SEM; Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (A and B), and Mann-Whitney test (C) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Figure 4: Prenatal exposure to poly I:C leads to restricted cell loss in the cerebellum and motor cortex in males.**

**(A-F)** Stereological Purkinje cells (PC) counts on coronal sections of the cerebellum. **(J-K)** Photomicrographs of the different sub-lobules of lobule VII, scale bars = 1 mm. **(L)** Illustration of the monolayer organization of PC in the cerebellar cortex after DAB-calbindin immunolabeling, scale bars = 200  $\mu\text{m}$ . No loss of PC cells occurred within lobule VI, neither in the hemispheric part, SIM **(A)** nor in the vermal part, 6cb **(B)**. In the hemispheric part of the lobule VII, the number of PC in Crus I **(C)** or in PM **(E)** was not affected by treatment whereas a significant loss was found in Crus II in poly I:C males **(D)**. In the vermal part, sub-lobule 7cb **(F)**, the number of PC was significantly decreased in poly I:C males. **(G)** Decreased number of NeuN-stained neurons in M1/M2 motor cortex in poly I:C males (outlined area on **(N)**, scale bars = 400  $\mu\text{m}$ ). **(H)** Unaffected

numbers of NeuN-stained striatal neurons or **(I)** tyrosine hydroxylase-positive neurons in the Substantia Nigra *pars compacta* (SNc, **(M)** DAB-TH immunolabelling, scale bars = 400  $\mu$ m). n=saline males / poly I:C males / saline females / poly I:C females; n(A)=9/7/10/9; n(B)=11/8/10/8; n(C)=11/9/9/8; n(D)=11/8/9/8; n(E)=10/7/9/8; n(F)=9/7/8/8; n(G)=12/9/10/9; n(H)=12/9/10/9; n(I)=12/9/11/9. Data expressed as mean  $\pm$  SEM; two-way ANOVA followed by Fisher's LSD (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

**Figure 5: Poly I:C prenatal treatment does not induce alterations in the microglial cell morphology.**

**(A)** Workflow for the morphological analysis of individual Iba1+ microglial cells from DAB-staining images. Binary images were used to calculate shape descriptors and outlined images to quantify box counting fractal dimension. Quantification of fractal dimension and morphology descriptors in microglia from the sublobule Crus II of saline and poly I:C male mice in the granular layer **(B)** and in the molecular layer **(C)**. Data are presented as mean  $\pm$  SEM; Data were analyzed using student's T-test or Mann-Whitney test when sample did not follow a Gaussian distribution.

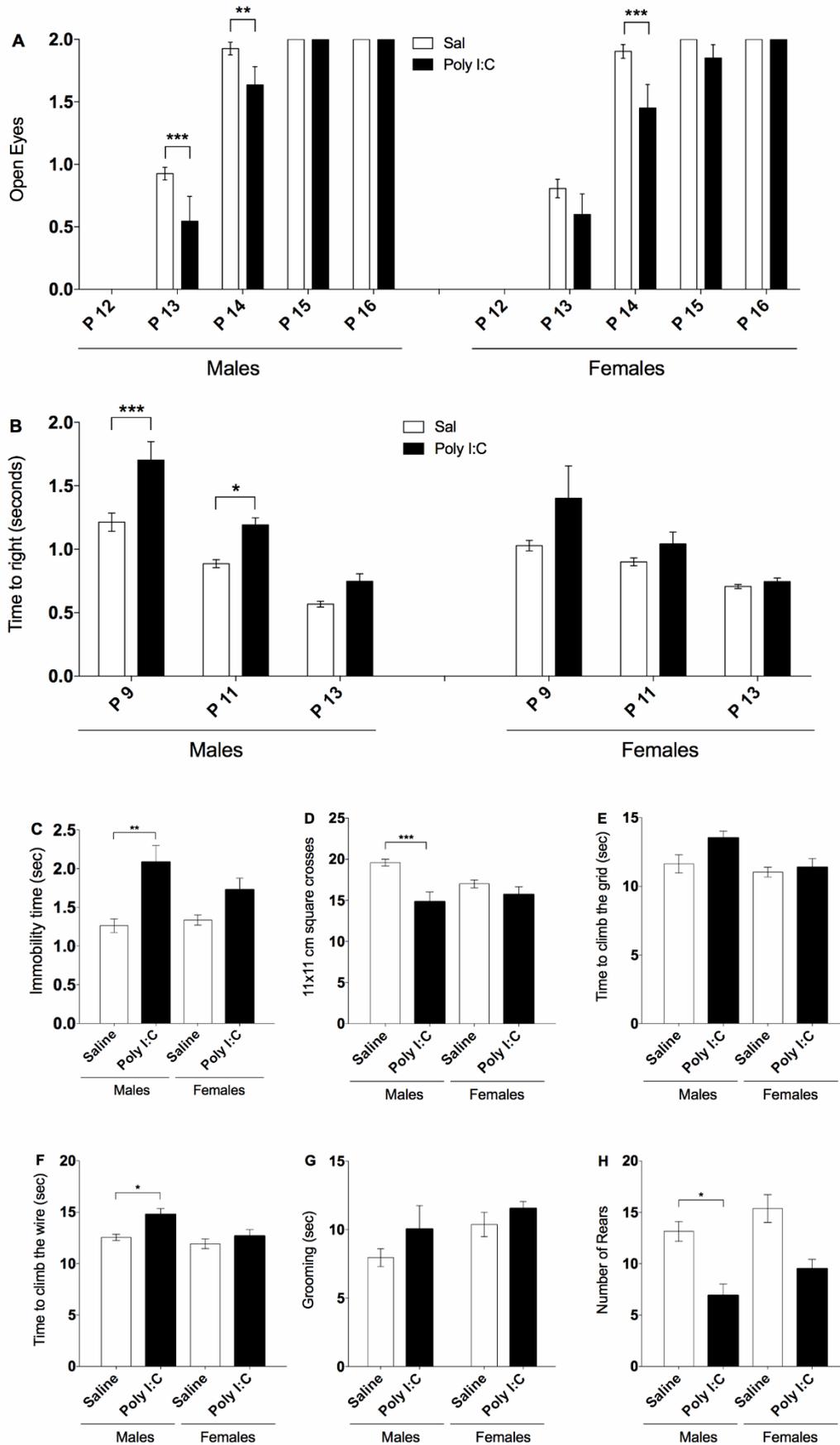
## **Supplementary Figures**

### **Supplementary Figure 1: Experiment timeline.**

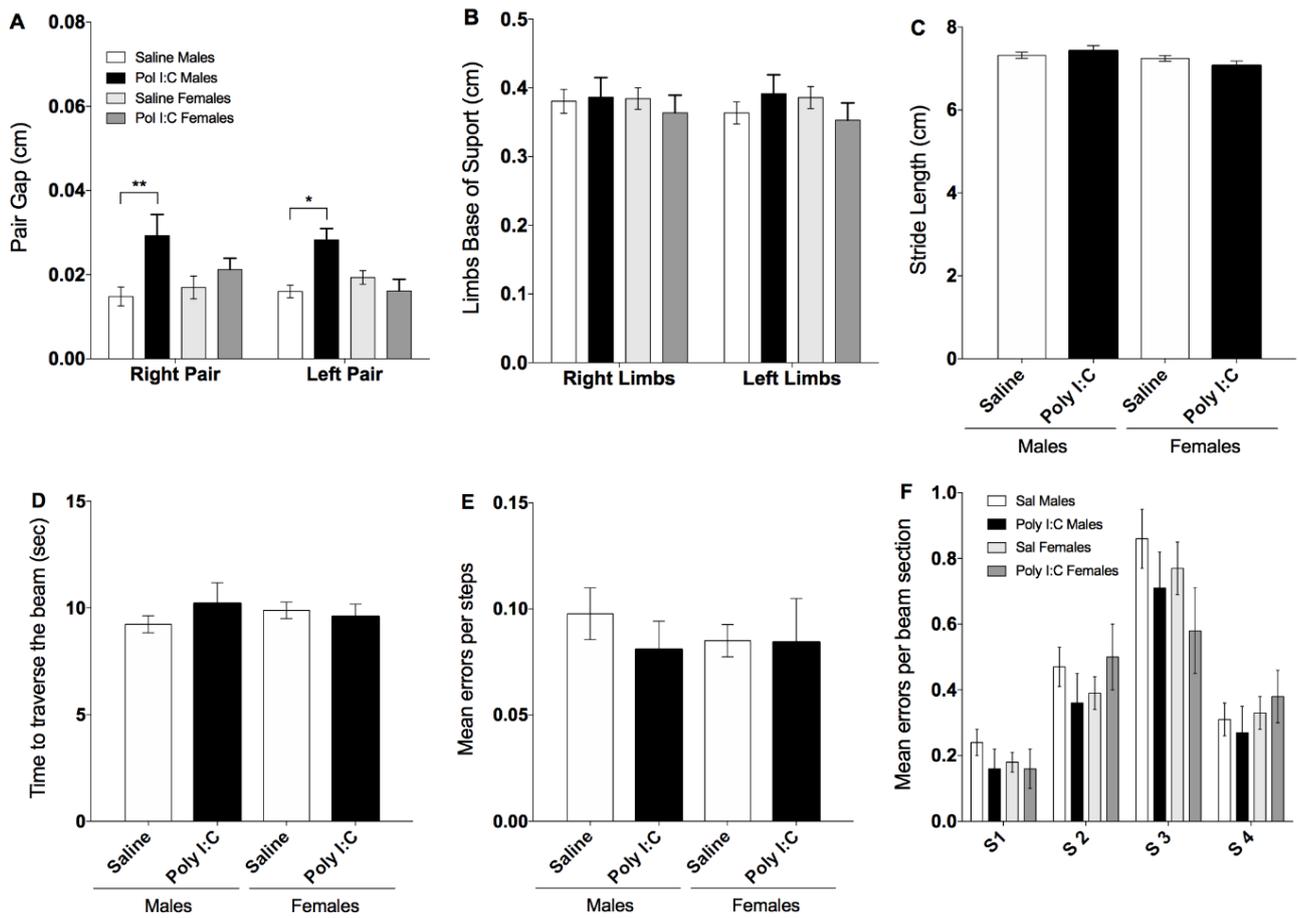
For mating, 3 females were transferred to the male cage and the presence of vaginal plug designated gestational day 0. Pregnant dams were treated with either polyinosinic-polycytidylic acid (20 mg/kg) or NaCl 0.9 % on embryonic day 12.5 (E12.5). Sex and age matched pups were separated from the dams on postnatal day 21 (P21) and raised by groups of 4 in a randomized fashion to avoid litter effects. Comprehensive behavioral screening was performed between postnatal days 30 and 45 (P30- 45). Mice were then sacrificed and brains were harvested for histological analysis (P45).

### **Supplementary Table 1: Stereological sampling parameters in various brain regions implicated in motor control and coordination.**

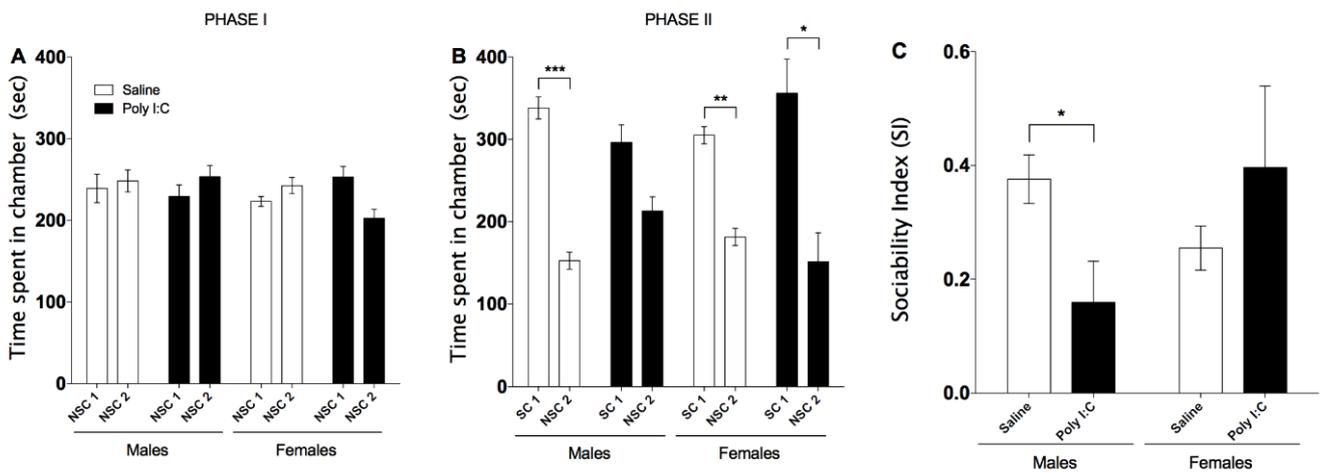
SIM: simple lobule ; PM: paramedian lobule ; SNc: substantia nigra *pars compacta* ; M1/M2: primary and secondary motor cortex ; PC: Purkinje cells ; TH: tyrosine hydroxylase



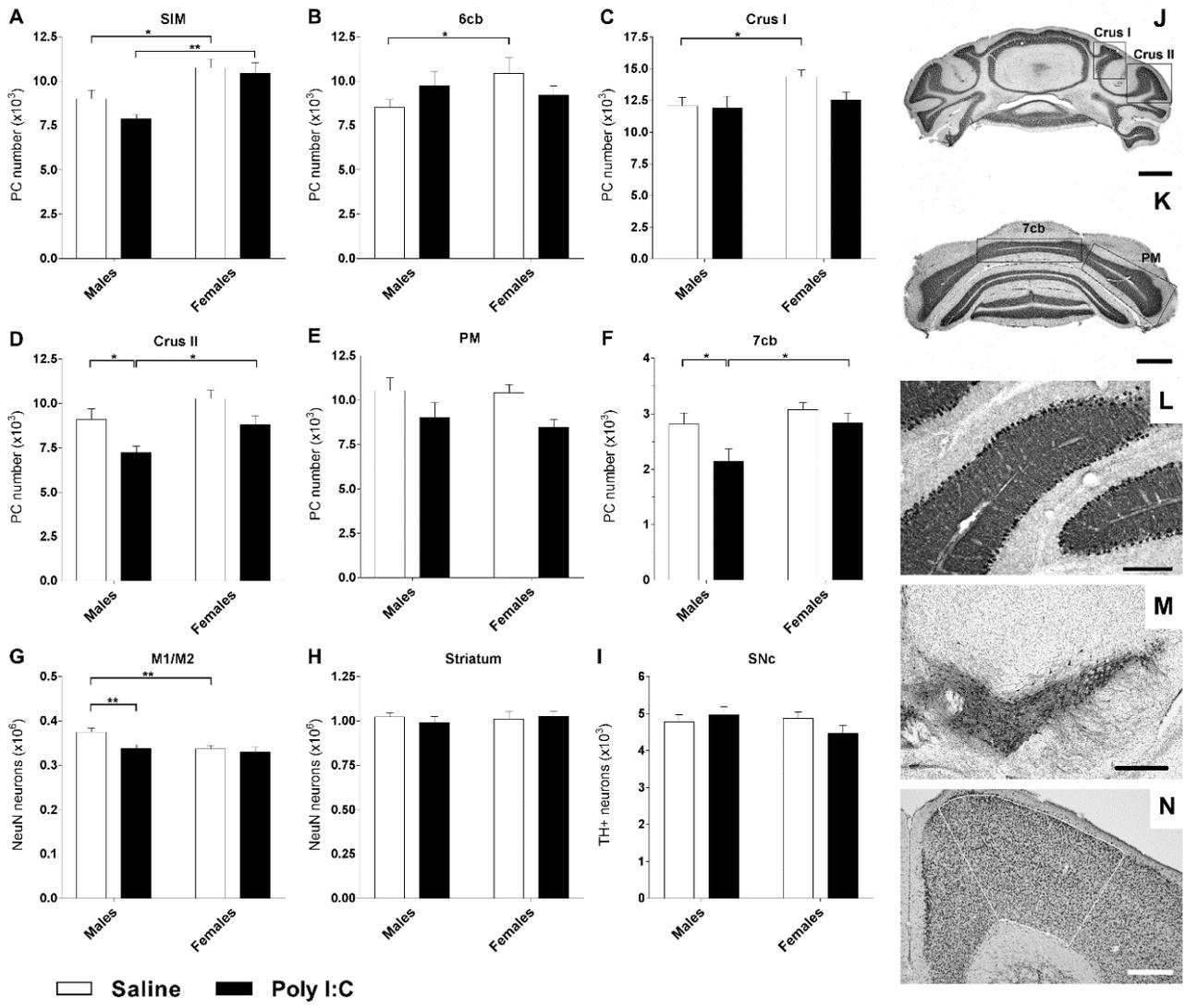
**Figure 1: Prenatal exposure to poly I:C leads to developmental delays, altered spontaneous activity and motor coordination in male mice.**



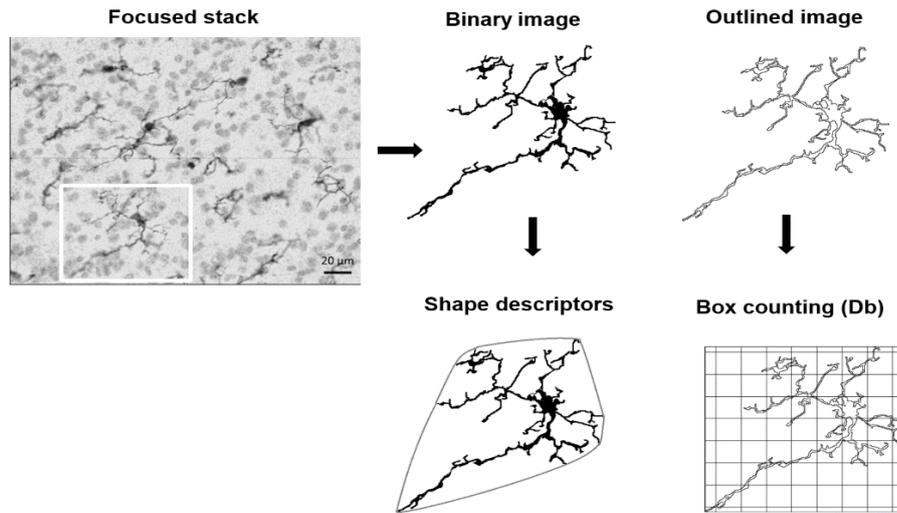
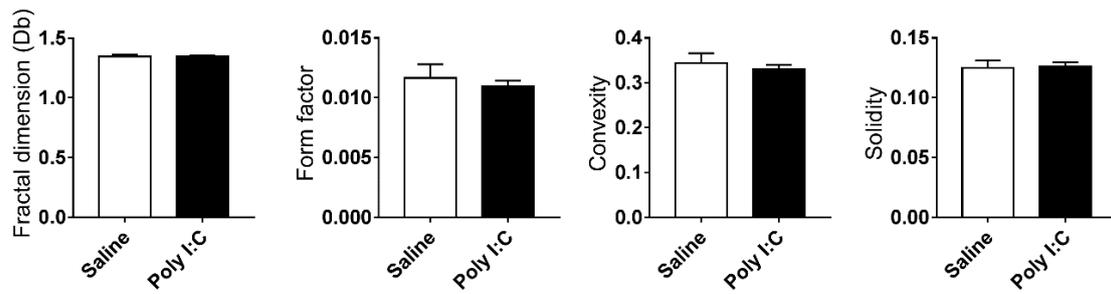
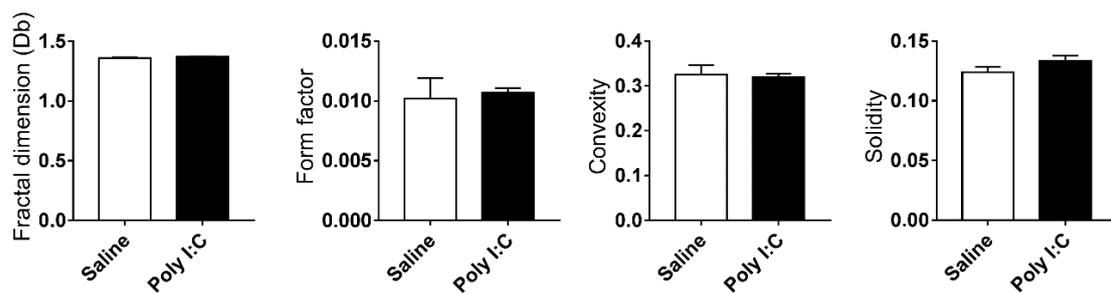
**Figure 2: Prenatal exposure to poly I:C leads to gait abnormalities only in males.**



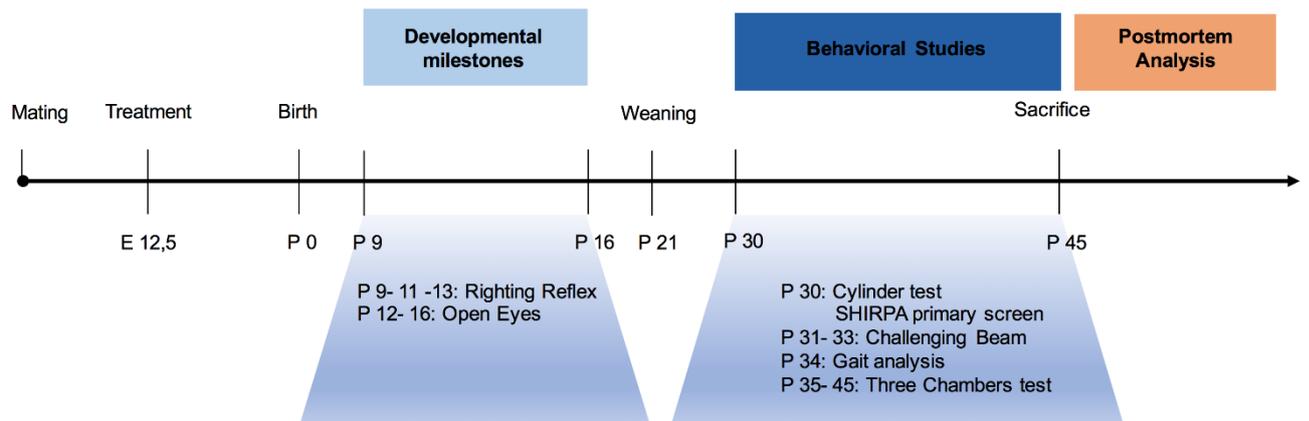
**Figure 3: Prenatal exposure to poly I:C leads to reduced social behavior in males.**



**Figure 4: Prenatal exposure to poly I:C leads to restricted cell loss in the cerebellum and motor cortex in males.**

**A****B****Granular layer****C****Molecular layer**

**Figure 5: Poly I:C prenatal treatment does not induce alterations in the microglial cell morphology.**



**Supplementary Figure 1: Experiment timeline**

Brain region	Neurons counted/staining	No. of sections	Counting frame area ( $\mu\text{m}$ )	Sampling grid area ( $\mu\text{m}$ )
Sim	PC/cresyl	4	50 x 50	130 x 170
6cb		4		
Crus I		5		
Crus II		4		170 x 130
PM		4		
7cb		3		
SNc	TH+/ anti-TH mouse	5		150 x 150
Striatum	Total neurons/ anti-NeuN rabbit	12	40 x 40	375 x 325
M1/M2	Total neurons/ anti-NeuN rabbit	6	40 x 40	375 x 325

**Supplementary Table 1: Stereological sampling parameters in various brain regions implicated in motor control and coordination**



### **III. Etude de l'expression de l'aromatase, facteur de risque hormonal**

#### **INTRODUCTION**

A l'observation des différences entre les mâles et les femelles, tant sur le plan comportemental qu'au niveau histologique, j'ai souhaité explorer les mécanismes pouvant influencer cette variabilité. Je me suis alors orientée vers les facteurs hormonaux en me rappelant tout d'abord la théorie d'Asperger qui propose que l'autisme est une amplification du caractère masculin. Je me suis donc penchée sur les travaux de Auyeung et de ses collaborateurs qui ont montré des corrélations entre le taux fœtal de testostérone et le degré de sévérité des TSA (Auyeung et al., 2009). Je me suis également intéressée à ceux de Sarachana et de ses collaborateurs qui ont démontré, suite à des analyses *post-mortem* de tissu cérébral, une réduction, dans le cervelet et le cortex frontal, de l'expression du facteur de transcription ROR $\alpha$  ainsi que de l'enzyme qu'il régule, l'aromatase, qui a pour rôle de convertir la testostérone en œstrogènes (figure 21) (Sarachana et al., 2011). Comme décrit précédemment (cf. partie 1 III 1.2.2.2), ROR $\alpha$  est impliqué dans le développement du cervelet et dans la différenciation des PC. J'ai donc poursuivi mes travaux par une quantification de l'expression de l'aromatase en ciblant les aires du cervelet où une diminution des PC a été constatée afin de corréliser cette perte à une éventuelle réduction de l'enzyme.

#### **MATERIELS ET METHODES**

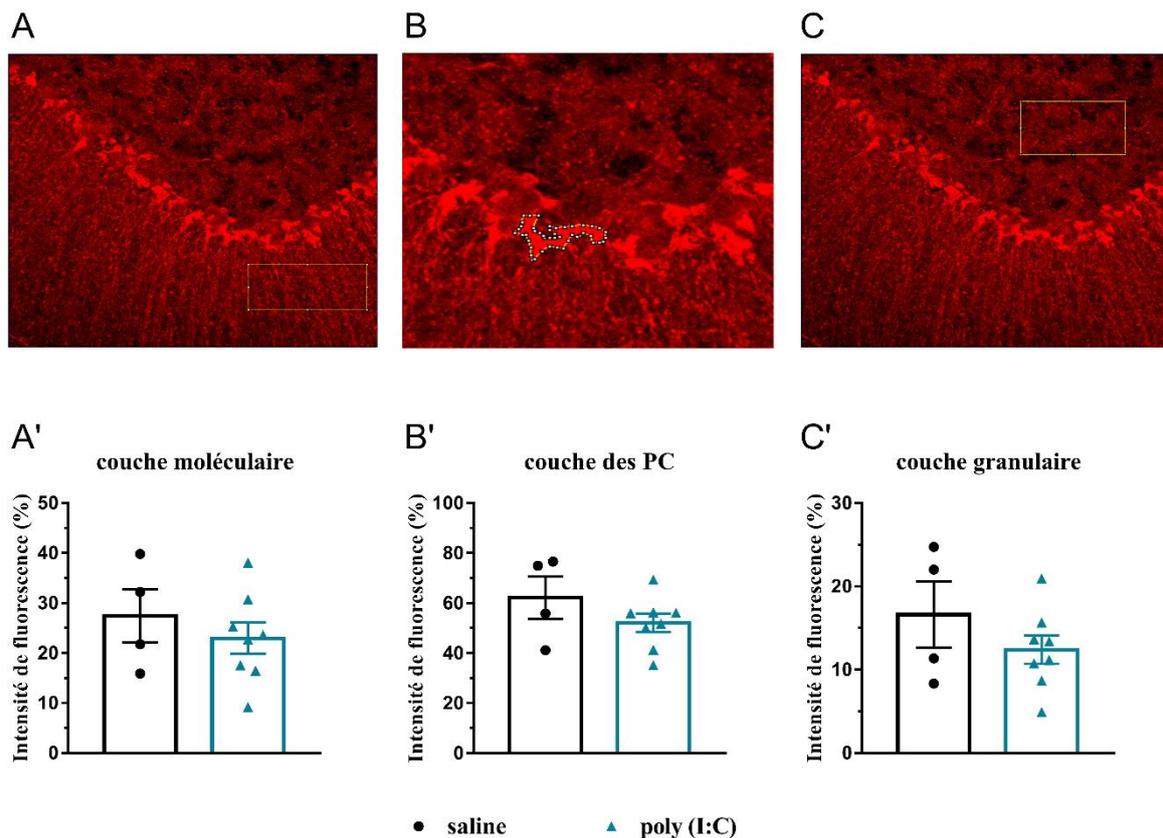
Dans un premier temps, cette analyse a été effectuée chez les mâles en comparant 8 souris poly I:C à 4 souris saline à P45. Malheureusement il ne nous a pas été possible d'augmenter le nombre de souris salines. La méthode de quantification par intensité de fluorescence a été utilisée pour doser l'expression de l'aromatase.

Une coupe flottante sur quatre de cervelet de chaque animal a tout d'abord été incubée dans une solution de blocage (3% BSA, 0.3% triton, TBS 1M, pH 7.5) pendant une heure et demi à température ambiante puis mise en présence des anticorps primaires lapin anti-aromatase (1:250, Abcam Ab18995), dilués dans le tampon de blocage, à 4°C pendant 36 heures. Après rinçages au TBS 1M, un anticorps de chèvre anti-lapin biotinylé a été utilisé comme anticorps secondaire (1:250, Vector laboratories, BA-1000,) et incubé une heure à température ambiante. Une fois les coupes rincées, le signal est amplifié à l'aide du kit ABC Elite (Vector Laboratories) pendant 45 minutes à température ambiante, puis révélé grâce à de la streptavidine Alexa 568 (1:250, invitrogen S11226) pendant une heure. Les coupes sont ensuite mises en présence de DAPI 1:1000 pendant 10 minutes afin de marquer les noyaux puis montées sur lames gélatinées et couvertes grâce à du milieu de montage Depex (VWR).

L'aromatase est exprimée chez l'adulte dans les PC (Azcoitia et al., 2011). Cette enzyme est également retrouvée dans les cellules granulaires de la couche granulaire externe du cortex cérébelleux (Biamonte et al., 2009; Sakamoto et al., 2003; Xi et al., 2015). Lors de la période post-natale, les cellules granulaires de la couche externe migrent ensuite vers la couche interne. Cela suggère que les cellules exprimant l'aromatase peuvent être également retrouvées dans la couche granulaire interne quelques temps encore après leur migration, se terminant lors de la troisième semaine, et jusqu'à la fin du développement cérébral à l'âge adulte. Les analyses ont été effectuées dans le lobule Crus II. Trois coupes ont été sélectionnées afin de représenter la partie antérieure, médiane ou postérieure du sous-lobule. J'ai procédé à une quantification en distinguant les trois couches du cortex cérébelleux afin de pouvoir observer d'éventuelles différences d'expression entre l'arborisation dendritique et les corps cellulaires des PC et les cellules granulaires. L'acquisition des images a été effectuée à l'objectif X40, en z-stacks d'intervalle de 1µm, sur 3 champs par sous-lobule droit et gauche, en respectant les mêmes zones sur chaque coupe et pour chaque animal en comprenant les trois couches. Le logiciel

ImageJ a été employé pour la mesure de l'intensité de fluorescence. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test de Student. La significativité est considérée quand  $p < 0.05$ .

## RESULTATS



**Figure 28 : Expression de l'aromatase dans Crus II chez les mâles exposés *in utero* au poly I:C.**

Quantification de l'intensité de fluorescence suite à un immunomarquage de l'enzyme aromatase en rouge (A-C) et analyse sous ImageJ de la densité optique dans les zones délimitées en jaune selon la couche moléculaire (A, A'), la couche des PC (B, B') et la couche granulaire (C, C') du cortex cérébelleux dans Crus II. Aucune différence significative de l'expression de l'aromatase n'est observée entre les mâles exposés *in utero* au poly (I:C) et ceux du groupe saline (A'-C'). Test statistique : test de Student, moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. Significatif :  $p < 0.05$ .

L'analyse statistique ne montre aucune différence significative d'intensité de fluorescence entre le groupe poly I:C et le groupe contrôle ni dans la couche moléculaire ( $p = 0.62$ ), ni dans

la couche des PC ( $p= 0.22$ ), ni dans la couche granulaire ( $p= 0.27$ ) (figure 28). Il est cependant important de noter une importante variabilité au sein du groupe saline.

## DISCUSSION / CONCLUSION

Nous n'avons pas pu démontrer de diminution de l'expression de l'aromatase, ce qui ne nous permet pas de conclure sur la diminution de  $ROR\alpha$ . Cependant, le nombre d'animaux dans le groupe saline est faible ( $n=4$ ) et présente une hétérogénéité notable. De façon intéressante, l'animal contrôle dont l'intensité de fluorescence est la plus faible, traduisant l'expression la plus faible de l'aromatase, présentait également des résultats comportementaux et histologiques différents de ceux de son groupe. Par exemple : i) une durée de toilettage élevée (14.98 s) : supérieure à la moyenne du groupe VPA (14.03 s), dont la différence significative par rapport au groupe contrôle a pu être démontrée ( $p<0.01$ ), contrairement au groupe poly I:C ; ii) un nombre de redressement sur les pattes arrières (7) inférieur à la moyenne du groupe poly I:C (8.568), significativement réduite par rapport au contrôle ( $p<0.01$ ) ; iii) un nombre de cellules de Purkinje dans Crus II (7369) très proche de la moyenne du groupe poly I:C (moy poly I:C =7234 ; moy salines =9117).

Ces résultats suggèrent que des troubles neurodéveloppementaux aient pu subvenir chez cet animal de manière spontanée entraînant certaines caractéristiques communes avec les TSA. En revanche, la sociabilité de cet animal ne semble pas affectée. En effet, il faut considérer la variabilité interindividuelle au sein de nos groupes d'animaux, d'où l'importance de récolter un nombre suffisant de données pour augmenter la robustesse de nos résultats. Des travaux pour compléter ces résultats sont en cours. Il s'agira également de mesurer l'expression de cette enzyme chez les femelles poly I:C et sur le modèle d'exposition prénatale au VPA puisque les femelles présentent également moins de déficits que les mâles.

L'aromatase étant régulée par ROR $\alpha$  qui est impliqué dans le développement des PC, il serait intéressant d'étudier sa transcription. De plus, l'évaluation des conséquences sur les cibles moléculaires en aval, comme par exemple les récepteurs aux œstrogènes et à la testostérone, pourrait fournir d'importantes données quant aux mécanismes dérégulés dans cette pathologie psychiatrique neurodéveloppementale. En effet, une étude a montré des différences d'expression des récepteurs aux androgènes sur les PC de rats VPA (Perez-Pouchoulen et al., 2016). Le poly I:C pourrait également être responsable de tels modifications. A ce jour, ces analyses n'ont pas été réalisées sur ce modèle.



## IV. Construction virale dans le but d'induire la mort des cellules de Purkinje dans Crus I

### INTRODUCTION

Suite aux données histologiques obtenues, montrant un lien potentiel entre la perte des PC dans Crus I et les troubles comportementaux moteurs et sociaux, j'ai proposé de déterminer si cette perte neuronale pouvait à elle seule être la cause de ces déficits. L'objectif de ce nouvel axe de travail est d'induire la mort spécifique des PC de manière restreinte au sous-lobule Crus I chez des souris adultes et d'explorer les effets de cette perte sur leur comportement social et moteur. L'intérêt de ce projet réside dans la détermination de nouvelles données fondamentales concernant l'étiologie de cette pathologie psychiatrique et ouvrirait la voie à de nouvelles approches thérapeutiques.

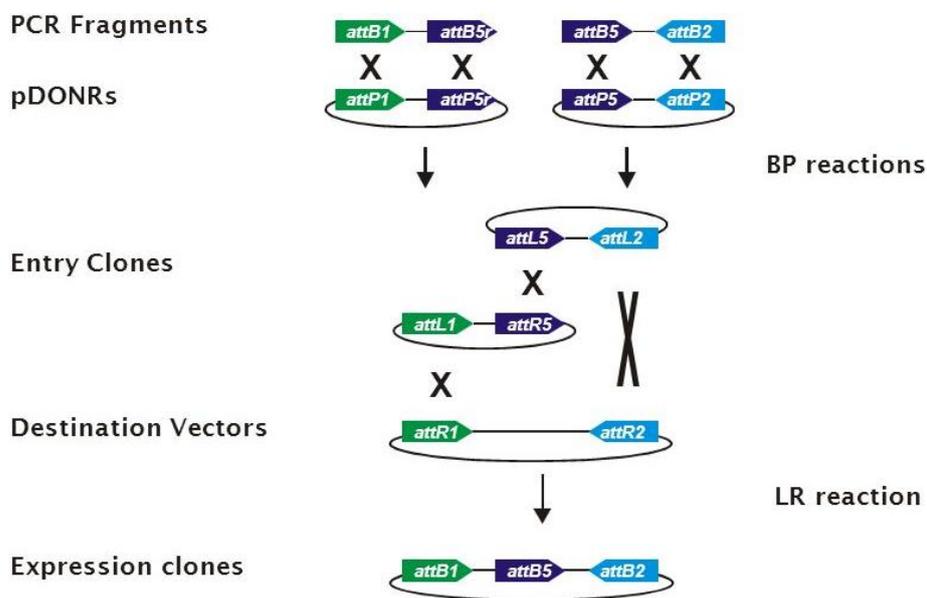
### MATERIELS ET METHODES

Pour induire la perte des PC dans Crus I, nous avons pour projet d'utiliser la méthode d'injection stéréotaxique de vecteurs lentiviraux (VLe) exprimant la protéine pro-apoptotique Bax, sous le contrôle du promoteur L7/Pcp2. Le promoteur choisi est celui du gène *L7* codant la protéine Pcp2 qui est spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet (Oberdick et al., 1990). Une surexpression de *BAX* devrait activer la voie intrinsèque de mort programmée des cellules par apoptose (Pastorino et al., 1998). L'avantage du VLe par rapport à l'adénovirus associé (AAV) est son pouvoir de diffusion limité, moindre par rapport à l'AAV, et qui permet donc de mieux isoler l'action du virus à la région d'intérêt suite à une injection stéréotaxique directement dans celle-ci. En effet, l'expression de *BAX* n'est souhaitée que dans 20 à 30% des PC de Crus I, comme retrouvé dans nos travaux ainsi que chez des cas de TSA (Skefos et al., 2014). Un

second VLe L7/Pcp2-*GFP* servira de contrôle afin de déterminer le pourcentage de cellules transfectées et de reproduire les mêmes conditions de traitement chez le groupe de souris contrôles. Les cellules exprimant la *GFP* seront alors identifiables par fluorescence. Ces VLe n'étant pas disponibles sur le marché, nous avons décidé de construire leur forme plasmidique au laboratoire, puis de les envoyer à une plateforme habilitée pour la synthèse virale.

## 1) Construction plasmidique

La technologie Multisite Gateway® (Invitrogen) a été choisie afin de pouvoir cloner de façon simultanée plusieurs fragments d'ADN (figure 29). Cette technique nous permet l'insertion rapide et efficace à la fois du promoteur L7/Pcp2 suivi du gène de *GFP* ou de *BAX* grâce à des sites de recombinaison spécifiques (*attB*) qui encadrent les fragments.

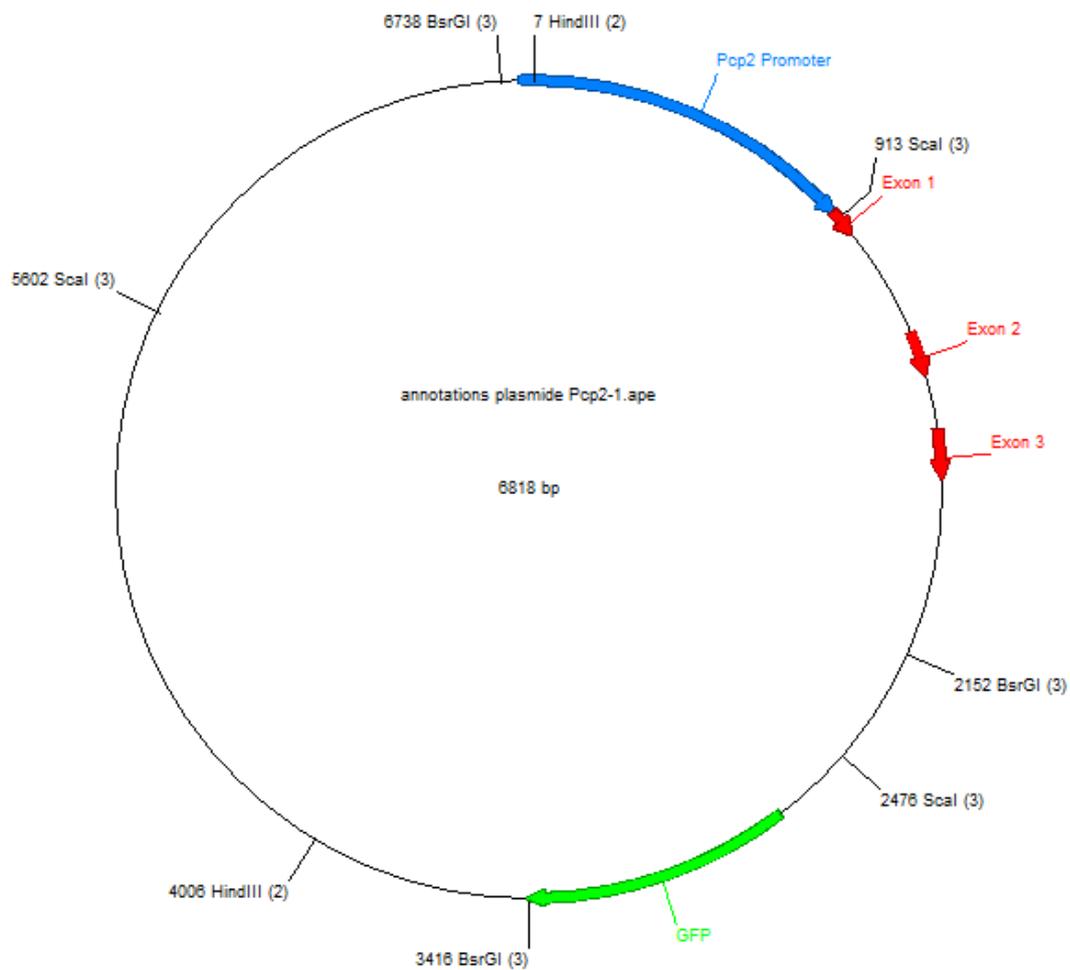


**Figure 29 : Schéma explicatif de la technique de recombinaison de deux fragments d'ADN dans un plasmide**

La technique nécessite plusieurs étapes. L'encadrement par polymérase chain reaction (PCR) du premier fragment d'ADN avec les séquences *attB1* en 5' et *attB5r* en 3' et du second fragment avec les séquences *attB5* en 5' et *attB2* en 3'. Ensuite les fragments sont mis en présence des vecteurs donneurs (pDONRs) associés pour la réaction BP, c'est-à-dire contenant des séquences spécifiques permettant la recombinaison : *attB1* se recombine avec *attP1* et *attB5r* avec *attP5r* pour l'insertion du premier fragment dans le vecteur donneur, et *attB5* se recombine avec *attP5* et *attB2* avec *attP2* pour l'insertion

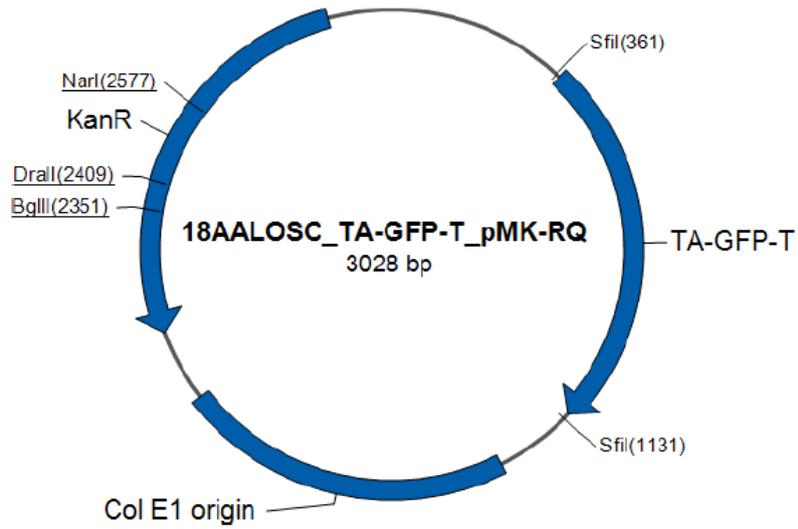
du second fragment dans son vecteur donneur. Les réactions de recombinaison sont représentées par une croix. Enfin, les deux vecteurs donneurs sont mis en présence du vecteur de destination pour la réaction LR qui consiste à l'insertion des deux fragments de manière successive en respectant le sens 5'-3'. La partie attL1 en 5' du premier fragment, résultante de la BP, va être recombinaisonnée à attR1 présente sur le vecteur de destination pour donner attB1. Les séquences attL5 en 5' du deuxième fragment inséré dans le vecteur donneur et attR5 en 3' du premier fragment après la BP vont se recombinaisonner. Le site attL2 résultant de la BP du deuxième fragment en 3' se recombinaisonne avec attR2 sur le vecteur de destination pour donner attB2. Dans le vecteur final, les deux fragments seront séparés par attB5. (2-fragment MultiSite Gateway® Pro, Invitrogen)

Un plasmide contenant le promoteur *L7/Pcp2* et le gène *GFP* nous a généreusement été donné par le Dr F. Selimi (CIRB, Collège de France, Paris) (figure 30). Le gène *GFP* encadré par les séquences de recombinaison attB a également été synthétisé par Thermofisher et réceptionné dans un plasmide (figure 31). Le gène *BAX* inséré dans un plasmide a été commandé chez Addgene : 3534 pcDNA3 *BAX* (#8783) et réceptionné dans un stock bactérien (figure 32). Les vecteurs pDONR P1-P5r et P5-P2 servant à la réaction de recombinaison BP (figure 33) permettent l'insertion d'un fragment (promoteur ou gène). Le vecteur de destination pLVI-RFA-WPRE-dU3, utilisé pour la réaction de recombinaison LR (figure 34), permet l'insertion de deux fragments successifs. Ces vecteurs ont été généreusement donnés par le laboratoire Mircen - CEA (Fontenay-aux-Roses).



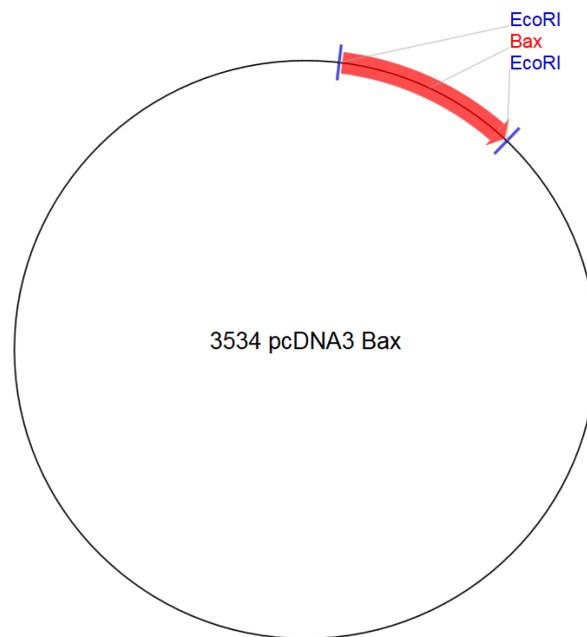
**Figure 30 : Carte du plasmide contenant le promoteur L7/Pcp2**

En bleu, le promoteur du gène L7/Pcp2 et en rouge ses exons ; en vert, le gène *GFP*. Les sites des enzymes de restriction utilisées pour la digestion du plasmide sont indiqués en noir. Taille du plasmide : 6818 pb.



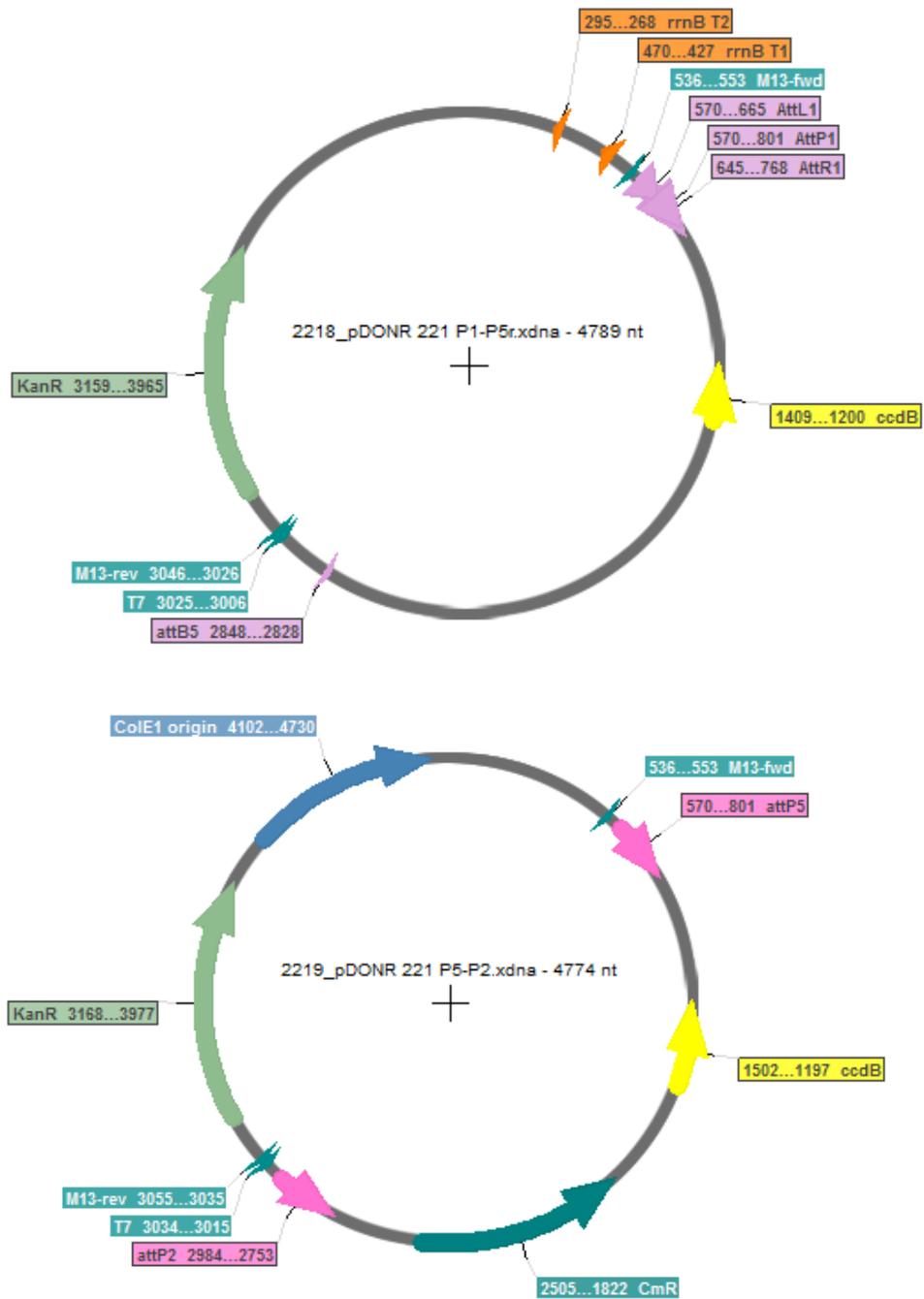
**Figure 31 : Carte plasmidique contenant la séquence du gène *GFP* encadré des sites de recombinaison attB**

Taille du plasmide : 3028 pb.



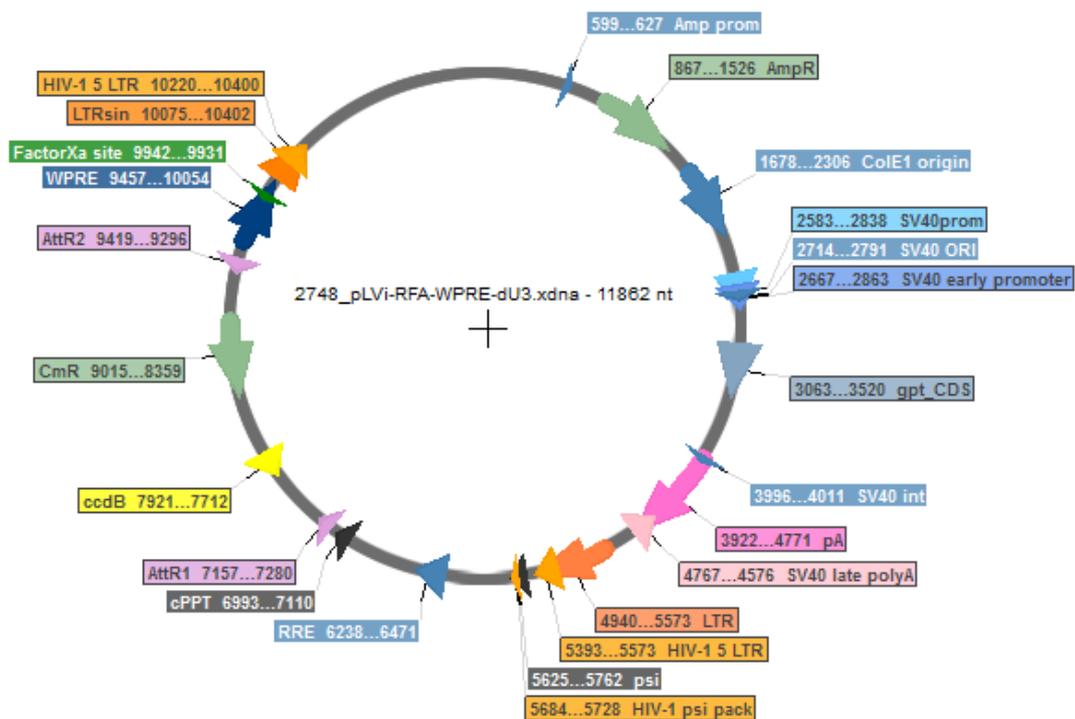
**Figure 32 : Plasmide 3534 pcDNA3 contenant le gène *BAX***

Addgene (plasmide #8783). Taille du plasmide : 5400 pb



**Figure 33 : Carte plasmidique des vecteurs donneurs P1-P5r et P5-P2 pour la réaction BP**

Taille des vecteurs P1-P5r : 4789 pb, P5-P2 : 4774 pb.



**Figure 34 : Carte plasmidique du vecteur de destination pour la réaction LR**

Taille du vecteur : 11862 pb.

L'objectif est d'obtenir deux vecteurs de destination contenant successivement le promoteur *L7/Pcp2* puis soit le gène *GFP*, soit le gène *BAX*, et qui permettront la synthèse de deux lentivirus. Plusieurs étapes sont nécessaires à cette construction. Elles sont détaillées successivement ci-après.

### 1.1 Isolement des fragments d'ADN linéaire

Pour pouvoir isoler les fragments d'intérêt (promoteur *L7/Pcp2*, gènes *GFP* et *BAX*), il est nécessaire d'obtenir un stock important d'ADN plasmidique. Pour cela, les plasmides ayant été reçus sous forme purifiée (tous excepté celui contenant le gène *BAX*) ont d'abord été transformés dans des bactéries *E.coli* Dh5 $\alpha$  (Invitrogen, #18265-017) ou Mach1 T1<sup>R</sup> (Invitrogen, #C862003) selon s'ils sont porteurs du gène suicide *ccdB*, ces dernières lui étant résistantes. Les bactéries associées à chaque plasmide ou vecteur ont ensuite été ensemencées

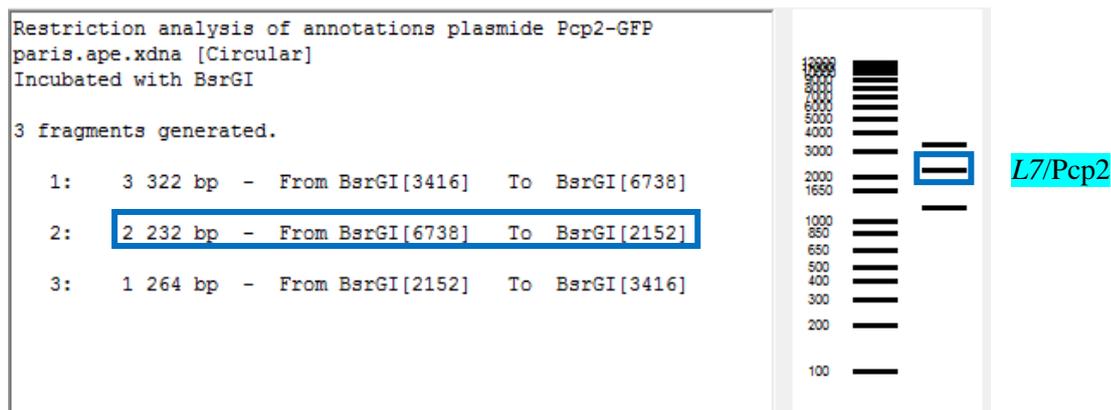
sur plaque de milieu *Luria-Bertani* (LB) agar accompagné d'un antibiotique adéquat (100 µg/ml) et mises à 37°C pendant 16h. Quelques colonies sont ensuite récupérées et cultivées séparément dans du milieu LB broth + antibiotique (100 µg/ml) sous agitation à 37°C pendant 16h pour permettre la prolifération des bactéries et donc l'amplification du plasmide. L'ADN plasmidique est extrait, purifié à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel #740420) et dosé par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop .

Le plasmide est digéré par des enzymes de restriction afin d'obtenir l'ADN sous forme linéaire et d'isoler la séquence d'intérêt. Les enzymes ont été choisies à l'aide des logiciels Serial Cloner 2.6 et Ape (voir table 5 pour le détail des enzymes utilisées selon le plasmide).

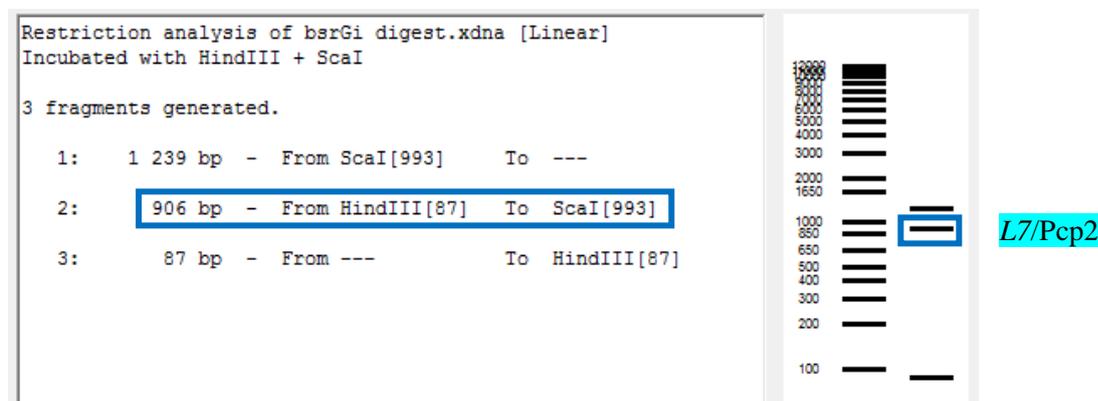
Fragment d'intérêt	Enzyme	T. (°C)	Ref produit (NEB)
L7/Pcp2	BsrGI	37	R0575S
	ScaI / HindIII-HF	37	R3122S / R3104S
<i>GFP</i>	SfiI	50	R0123S
<i>BAX</i>	EcoRI-HF	37	R3101S

**Table 5: Enzymes de restriction utilisées pour isoler les fragments d'ADN à partir des plasmides**

Après une heure de digestion, l'ADN est mis à migrer 25 minutes à 100 V sur gel d'électrophorèse 1 à 2% d'agarose et contenant 0.01 % de bromure d'éthidium, un intercalant d'ADN qui permet la révélation sous UV. Les bandes correspondant au poids moléculaire attendu sont extraites et purifiées à l'aide des kits Monarch DNA Gel Extraction (New England Biolabs, NEB #T1020S) ou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up #740609 (Macherey-Nagel). La récupération du promoteur n'a pu se faire qu'en deux temps avec une première digestion avec BsrGI (figure 35), migration du gel et récupération de la bande contenant le promoteur, puis une seconde digestion avec ScaI et HindIII (figure 36).



**Figure 35 : Digestion du plasmide *L7/pcp2-GFP* par BsrGI et résultat théorique de la migration sur gel**



**Figure 36 : Digestion du plasmide *L7/Pcp2-GFP* par ScaI et HindIII et résultat théorique de la migration sur gel**

## 1.2 Encadrement par PCR

Afin d'être reconnus et intégrés correctement aux vecteurs donneurs, les fragments d'ADN sont encadrés par des séquences d'ADN spécifiques en 5' et en 3', indiquées dans le table 6, qui serviront de sites de recombinaison. Ainsi, nous obtenons ; 5' attB1-*L7/Pcp2*-attB5r 3' ; 5' attB5-*GFP*-attB2 3' ; 5' attB5-*BAX*-attB2 3'. Des amorces ont été conçues pour permettre cet encadrement par PCR à l'aide de la Taq polymerase (Invitrogen #10342020) et d'un mélange de dNTP (Invitrogen #18427088).

Vector and Recombination Type	att sites Flanking Insert	Primer Sequences
pDONR™ 221 P1-P5r 2-fragment, 4-fragment	attB1 attB5r	Fwd: 5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN Rev: 5' GGGG AC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TGT
pDONR™ 221 P5-P2 2-fragment	attB5 attB2	Fwd 5' GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GNN Rev 5' GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA

**Table 6 : Séquences des sites de recombinaison attB spécifiques des régions 5' et 3' des fragments d'ADN à encadrer**

- L7/Pcp2

*Séquence du promoteur après digestions*

En bleu la séquence du promoteur. Les parties s'hybridant sont soulignées.

5' AGCTTCTCAGAGCATGGTCAGAAAGCCACAGCTCATCAATGAAATGGTCAGGGACTTCCTGTCCT  
GCTCCATGCATAAATGAAAGACGAAGACAACCTCAAATTGGCATTGAGGGGCAGATAAACAGGAG  
CATCCGGTAGTTTCACAGGTGGTCGGGTAGCAGGAGCCGGTTGGTTGGTTGGTCTGTGGAGAGTG  
CAGGGATTAAGGGGAAGAGGCCTGGACCCCAACTTCCTTTCTGGCTACCCCCCTGAAAAAATG  
TCACCTGCCTTGCAGTGGACGAACCTCACAGGCAGGAATGGGTTGGCTTGGGTGGGGACATCCTGCA  
GGTCCACCCTCATGTTGGTTGATCTTCAACATTGTACTGACTTCTTCCACTTGACATTCCTCAAGG  
TCCTGTGATCATGGCTGGGTCTAGTGAGTTCAAACCTGCACTGCCCTACCCACACCCACACCCAG  
CTCAGCGTCAGTCAGGATCAACAATTACCTAGAGATCATCTTTCTGGGGCTTAAGCATTGGTGGGA  
GCAGATGGGATATGAGCTGGGGATTTGGGAATGGGGGAAGATATCTGCTCCCCCTCCGCCCTAC  
ACCCTAGCCTTTTAAAAGGCCTTCTCAGGTCAGAGACCAGGAGAAAAGTATAGGAGAGATACACA  
ATGGACCAGGAAGAAGAAAAGGGAGAGGGAGGCTCAGACCTTCTAGACAAGGTAAGAGGGCTCT  
GGCTGACTCCACCATCCGCTTCTTGAGGTCTCGGCACCTGTAATTGACAAGATTAATTCATTTATAG  
GGCATCTAATTAGCAAGCAAGTCTCTGGAGTCCCCTGACCCAGTTACTATAACACACAGGGGGTAT  
AGGTAGGAGAGTATAAGAGCCCCTCCTCAGGGCAAATGAAT GGA TTC TTA GT (+1 cadre lecture) 3'

Amorce sens : attB1

5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA AGC TTC TCA GAG CAT GG TCA 3'

20 nt CG= 50% Tm= 57.3°C

Amorce anti-sens : attB5r

5' GGGG AC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TGT TAC TAA GAA TCC ATT CAT TTG CCC TG 3'

25 nt CG= 40% Tm= 56.5°C

La Tm permettant l'amplification est de 57°C.

- *GFP*

*Séquence de GFP après digestion par SfiI*

En vert, la séquence du gène. Les parties s'hybridant sont soulignées.

5' (+1 cadre de lecture) AG GCC GCA TTA

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA  
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA  
CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGA  
CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG  
CCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC  
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC  
AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATAT  
CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG  
GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGC  
CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAC  
ATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCC  
CAGGATCCACCGGATCTAGATAACTGA TCT GGG CCT CAT 3'

Amorce sens : attB5

5' GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GTA CAG GCC GCA TTA ATG GTG AGC 3'

20 nt CG= 55% Tm= 60.2°C

Amorce anti-sens : attB2

5' GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA ATG AGG CCC AGA TCAGTTATCTAGA  
 3'

25 nt CG= 48% Tm= 60.4°C

La Tm permettant l'amplification est de 60.3°C.

- *BAX*

*Séquence de BAX après digestion par EcoRI*

En rouge, la séquence du gène. Les parties s'hybridant sont soulignées.

5' (+1 cadre de lecture) AA TTC

ATGGACGGGTCCGGGGAGCAGCTTGGGAGCGGGCCACCAGCTCTGAACAGATCATG  
AAGACAGGGGCTTTTTGCTACAGGGTTTCATCCAGGATCGAGCAGGGAGGATGGCTGGG  
GAGACACCTGAGCTGACCTTGGAGCAGCCGCCCCAGGATGCGTCCACCAAGAAGCTGAGC  
GAGTGTCTCCGGCGAATTGGAGATGAACTGGACAGCAATATGGAGCTGCAGAGGATGATT  
GCTGACGTGGACACGGACTCCCCCGAGAGGTCTTCTTCCGGGTGGCAGCTGACATGTTTG  
CTGATGGCAACTTCAACTGGGGCCGCGTGGTTGCCCTTCTACTTTGCTAGCAAAGTGGTG  
CTCAAGGCCCTGTGCACTAAAGTGCCCGAGCTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACACTGG  
ACTTCCTCCGTGAGCGGCTGCTTGTCTGGATCCAAGACCAGGGTGGCTGGGAAGGCCTCCT  
CTCCTACTTCGGGACCCCCACATGGCAGACAGTGACCATCTTTGTGGCTGGAGTCCTCACC  
GCCTCGCTCACCATCTGGAAGAAGATGGGCTGACG 3'

Amorce sens : attB5

5' GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GTA CAA TTC ATGGACGGGTCCG 3'

18 nt CG= 56% Tm= 56.7°C

Amorce anti-sens : attB2

5' GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTAT CGT CAG CCC ATC TTC TTC C 3'

19 nt CG= 58% Tm= 57.7°C

La Tm permettant l'amplification est de 57°C.

### 1.3 Réaction de recombinaison BP

Le fragment d'intérêt encadré des sites de recombinaison attB est mis en présence du vecteur donneur (pDONR) correspondant (attB1-L7/Pcp2-attB5r avec pDONR P1-P5r ; attB5-GFP-attB2 ou attB5-BAX-attB2 avec pDONR P5-P2). Un mélange d'enzymes BP clonases (Gateway BP clonase II enzyme mix, Invitrogen #11789) est ajouté et la réaction BP se produit alors pendant 18h à 25°C. Le produit de la réaction est ensuite transformé dans des Mach1 T1<sup>R</sup> puis ensemencé sur plaque de LB agar pour incubation à 37°C pendant 16 heures. Des colonies sont alors récupérées et cultivées plusieurs heures dans du milieu LB à 37°C sous agitation. L'ADN est ensuite purifié grâce à l'utilisation des kits Monarch plasmid miniprep (NEB, #T1010S) ou NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (Machery-Nagel, # 740588) pour des petites quantités ou à l'aide du kit

NucleoBond® Xtra Midi EF pour des stocks plus importants. L'ADN est ensuite mis en présence d'enzymes de restriction (table 7) et mis à migrer sur gel d'électrophorèse pour vérifier l'étape de recombinaison en fonction de la taille des bandes d'ADN obtenues visibles sous UVs.

Vecteur produit de la BP	Enzymes	T. (°C)	Ref produit (NEB)
<i>L7/Pcp2_P1-P5r</i>	XbaI	37	R0145S
	HindIII-HF	37	R3104S
<i>GFP_P5-P2</i>	BsrGI	37	R0575S
<i>BAX_P5-P2</i>	BamHI	37	R3136S
	AclI	37	R0598S

**Table 7 : Enzymes utilisées pour la vérification de la réaction de BP**

### 1.4 Réaction de recombinaison LR

Deux réactions sont effectuées à partir des produits de la réaction BP : celle de *L7/Pcp2\_P1-P5r* avec *GFP\_P5-P2* et celle de *L7/Pcp2\_P1-P5r* avec *BAX\_P5-P2*. Un mélange d'enzymes LR clonases (Gateway LR clonase II Plus enzyme mix, Invitrogen #12538) est ajouté et la réaction LR se produit alors pendant 18h à 25°C. Le produit de la réaction est ensuite transformé dans des Mach1 T1<sup>R</sup> puisensemencé sur plaque de LB agar pour incubation à 37°C. Des colonies sont alors récupérées et cultivées dans du milieu LB à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est ensuite extrait et purifié. Une vérification par digestion enzymatique et électrophorèse est ensuite effectuée.

### 1.5 Séquençage (Eurofins Genomics)

Les produits de réaction LR obtenus sont envoyés pour séquençage à Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne) pour une dernière vérification avant l'envoi pour la construction virale.

Les amorces utilisées sont celles recommandées par Invitrogen pour cette méthode du Multisite Gateway. Il s'agit des amorces universelles :

M13 sens : 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3' (Invitrogen, #N52002)

M13 anti-sens : 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' (Invitrogen, #N53002)

## 2) Détermination des coordonnées stéréotaxiques chez l'adulte

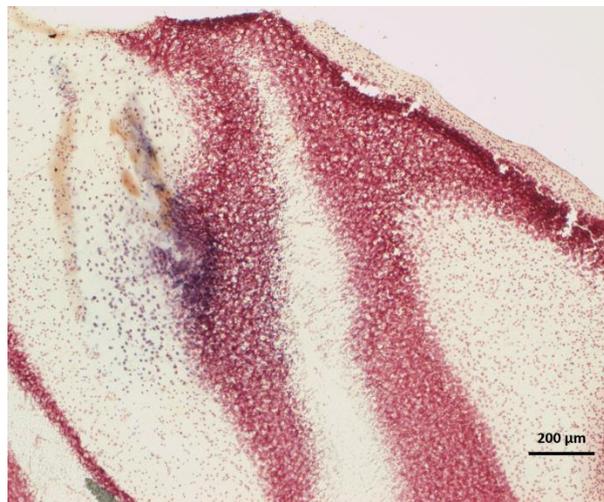
Les injections stéréotaxiques dans le cervelet n'ayant jamais été réalisées auparavant au laboratoire, il a fallu déterminer les coordonnées permettant d'obtenir des injections bilatérales dans Crus I de sorte qu'elles soient également reproductibles d'un animal à l'autre. Pour cela, nous avons réalisé une série de tests d'injections de colorant Chicago sky blue 6B (Sigma, #C8679) sur des souris C57Bl6/J de 10 semaines, sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

Nous en avons déterminé les coordonnées stéréotaxiques suivantes (figure 37) :

AP : -6.35

ML : 2.7

DV : 2.3



---

**Figure 37 : Détermination des coordonnées stéréotaxiques sur coupe coronale de l'atlas de souris C57Bl6/j pour injection dans Crus I**

Photo du site d'injection dans Crus I marqué par un colorant bleu sur coupe colorée au crésyl violet et au rouge neutre. Microscope optique à lumière transmise - objectif X5.

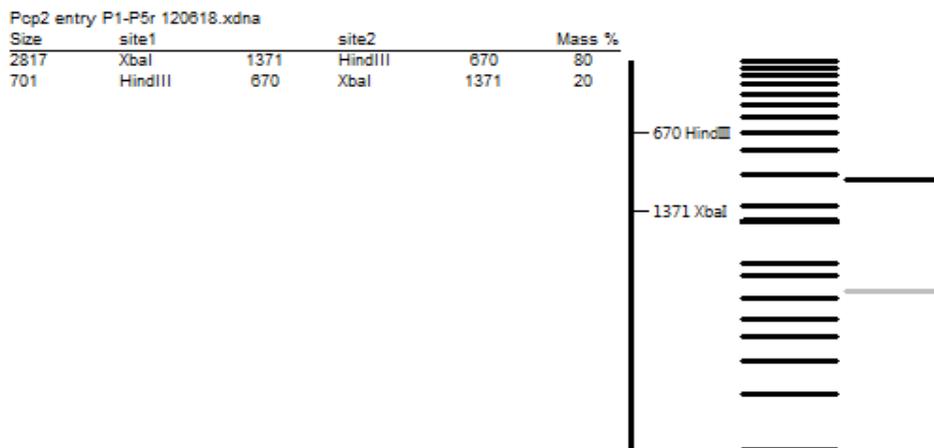
---

## RESULTATS

La construction virale n'a pas pu à ce jour être achevée. Les étapes du processus ont pu être effectuées jusqu'à la réaction de BP. Chacune des réactions d'intégration du fragment d'ADN d'intérêt (promoteur *L7/Pcp2* / gène *GFP* / gène *BAX*) dans son vecteur associé a bien été effectuée : pour chacun la pousse des bactéries sur plaque a démontré l'intégration d'un fragment d'ADN suite à la réaction de recombinaison. Après vérification par digestion enzymatique et migration par électrophorèse, nous avons bien observé des bandes correspondantes à la taille des fragments attendue.

### 1) Réaction de recombinaison BP

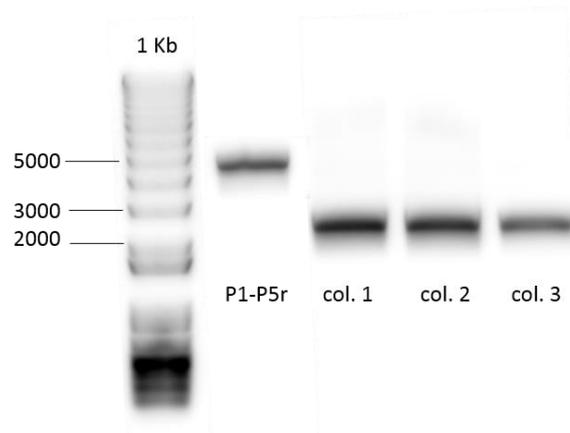
#### 1.1 *L7/Pcp2\_P1-P5r*



**Figure 38 : Résultat théorique de la digestion du vecteur *L7/Pcp2\_P1-P5r* par *XbaI* et *HindIII***

Extrait du logiciel Ape

Le vecteur donneur P1-P5r ne contient pas les sites de restriction des enzymes utilisées, donc la taille de la bande obtenue doit être de 4789 pb.



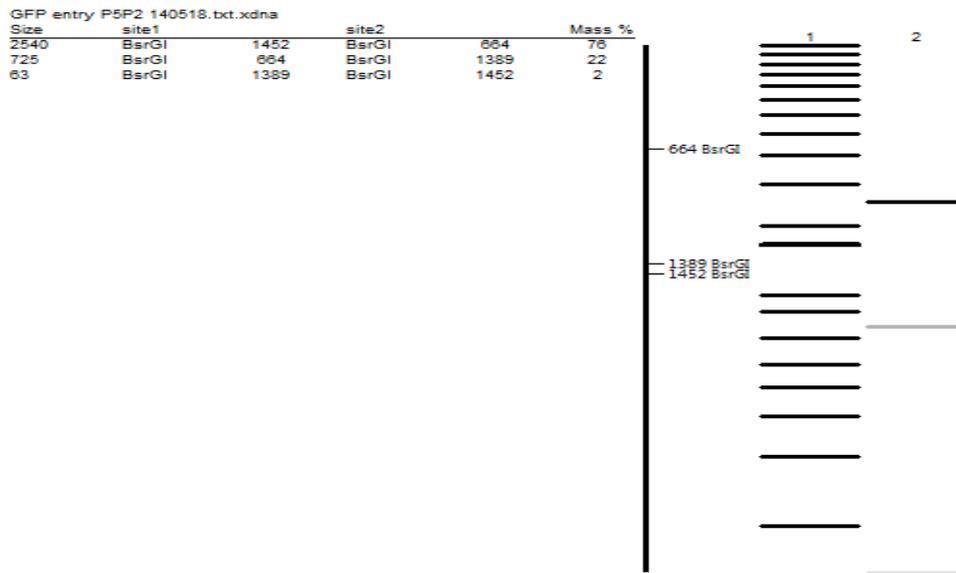
**Figure 39 : Photo du gel de migration du produit de la digestion du vecteur *L7/Pcp2\_P1-P5r***

P1-P5r correspond au contrôle négatif, il s'agit de la digestion du vecteur avant la réaction de BP. Col. : ADN du vecteur *L7/Pcp2\_P1-P5r* extrait d'une colonie.

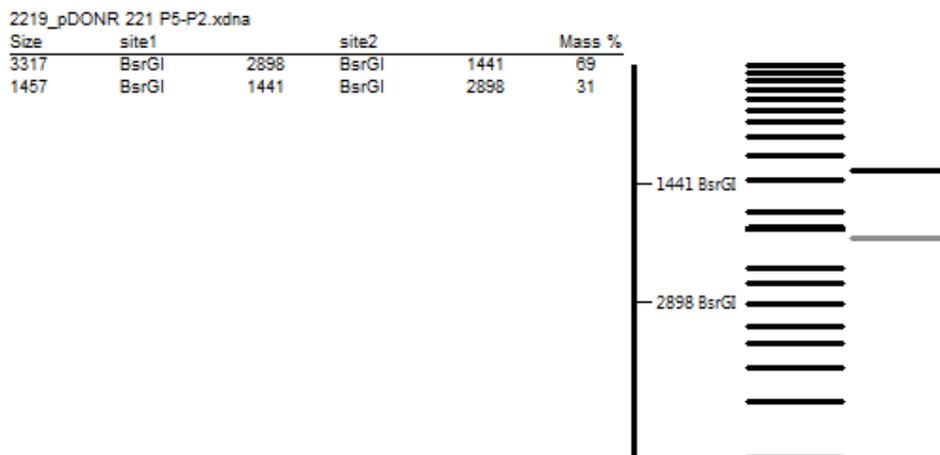
Ces résultats nous indiquent un profil de digestion identique entre l'ADN des trois colonies récupérées de *L7/Pcp2\_P1-P5r* et différent du contrôle ce qui signifie qu'une réaction s'est produite lors de la BP (figure 39). Selon le marqueur de taille, l'unique bande d'ADN observée pour le contrôle négatif a une taille correspondant à celle du vecteur, comme il était attendu. Concernant la migration des produits de la réaction de BP, nous n'observons qu'une seule bande d'ADN dont la taille est comprise entre 2000 et 3000 paires de bases. Cette bande pourrait alors correspondre au fragment le plus lourd (2817 pb) attendu suite à la digestion par XbaI et HindIII. Au regard de la figure 38, nous constatons que la deuxième bande attendue est plus pâle témoignant d'une taille de fragment beaucoup plus petite et d'une concentration en ADN plus faible, donc moins visible. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu observer cette bande de 701 pb.

Ces résultats suggèrent que la réaction de BP pour la recombinaison du fragments attB1-*L7/Pcp2-attB5r* avec le vecteur P1-P5r a bien eu lieu.

## 1.2 GFP\_P5-P2

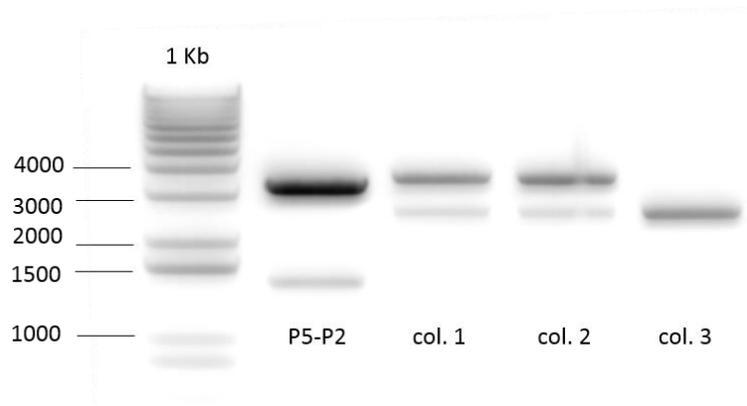


**Figure 40 : résultat théorique de la digestion du vecteur *GFP\_P5-P2* par *BsrGI*** Extrait du logiciel Ape



**Figure 41 : résultat théorique de la digestion du vecteur donneur *P5-P2* par *BsrGI***

Extrait du logiciel Ape

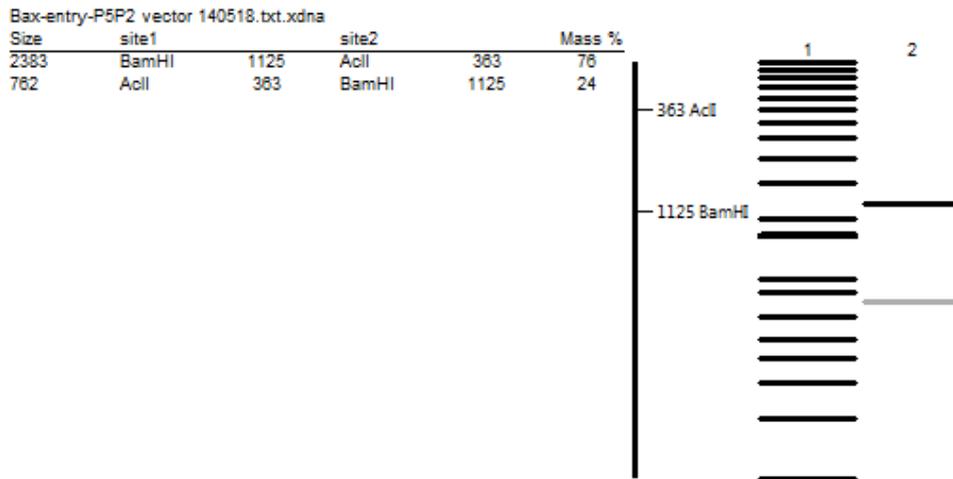


**Figure 42 : photo du gel de migration du produit de la digestion du vecteur *GFP\_P5-P2***

P5-P2 correspond au contrôle négatif, il s'agit de la digestion du vecteur avant la réaction de BP. Col. : ADN du vecteur *GFP\_P5-P2* extrait d'une colonie.

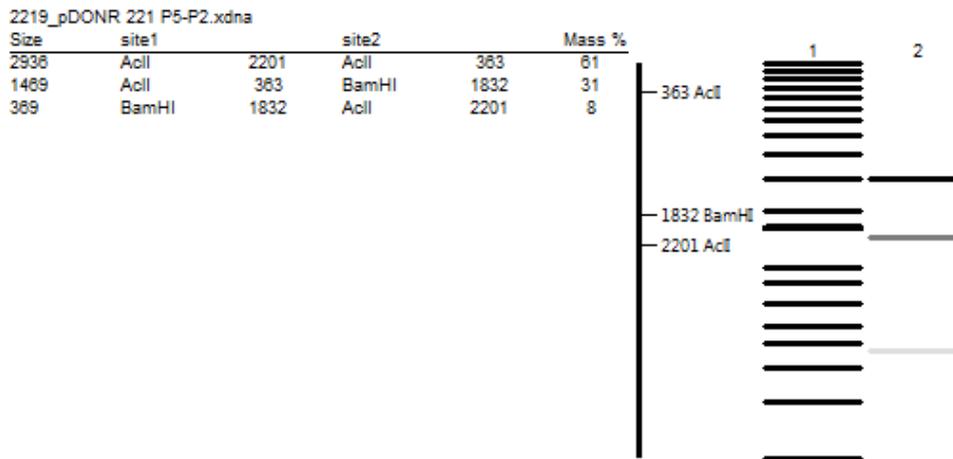
Les deux bandes associées au contrôle négatif (P5-P2 sur la figure 42) ont une taille correspondant à celle prédite par la simulation à l'aide du logiciel Ape (figure 41). La migration de l'ADN issu des colonies 1 et 2 (col.1 ; col.2) du vecteur *GFP\_P5-P2* a donné pour chacun deux bandes observables dont la plus basse, inférieure à 3000pb, correspondrait au plus long fragment attendu, de 2540 pb (figure 40). Ainsi la bande constatée d'une taille comprise entre 3000 et 4000 pb pourrait être l'ADN du vecteur *GFP\_P5-P2* mais n'ayant pas été digéré car sa taille est de 3328 pb. Les deux autres bandes attendues de 725 et 63 pb n'ont pas pu être observées. Concernant l'ADN de la colonie 3, seule la bande correspondant au fragment de 2540 pb est visible. Malgré l'absence des deux fragments de plus petite taille, ces résultats suggèrent que la réaction de recombinaison BP s'est produite et que le fragment attB5-*GPF*-attB2 s'est intégré au vecteur donneur P5-P2.

### 1.3 BAX\_P5-P2



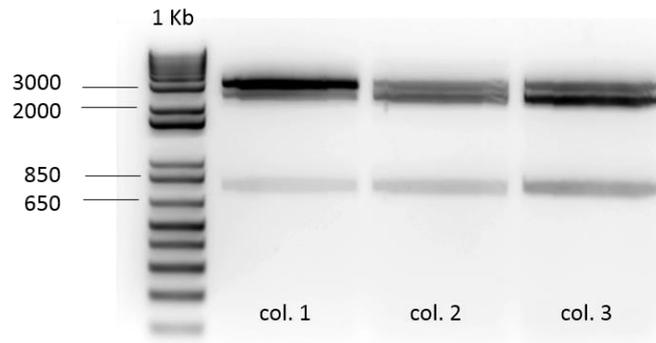
**Figure 43 : résultat théorique de la digestion du vecteur *BAX\_P5-P2* par AclI et BamHI**

Extrait du logiciel Ape



**Figure 44 : résultat théorique de la digestion du vecteur donneur P5-P2 par AclI et BamHI**

Extrait du logiciel Ape



**Figure 45 : photo du gel de migration du produit de la digestion du vecteur *BAX\_P5-P2***

Col. : ADN du vecteur *BAX\_P5-P2* extrait d'une colonie.

Le profil de migration pour les 3 colonies est identique (figure 45). Nous pouvons observer trois bandes : une légèrement supérieure à 3000 pb, une entre 2000 et 3000 pb et une dernière entre 650 et 850 pb. Les deux bandes les moins lourdes pourraient alors correspondre aux bandes attendues de 2383 et de 762 pb (figure 43) et le fragment le plus long correspondrait au vecteur après la réaction de BP mais non digéré par les enzymes, puisque sa taille est de 3145 pb. Le plasmide P5-P2 seul n'a pas été digéré par ces enzymes dans cette expérience, cependant, aucune bande sur le gel ne correspondrait à sa digestion selon le profil fourni par le logiciel Ape (Figure 44).

## 2) Réaction de recombinaison LR

Après plusieurs tentatives, nous n'avons pu obtenir que quelques colonies. En revanche, après vérification par digestion enzymatique et migration sur gel, nous n'avons pas obtenu les fragments de taille attendue. Quelques colonies pouvaient cependant se rapprocher du profil de migration théorique. Nous avons alors envoyé nos échantillons pour être séquencés. Le

séquençage du vecteur Pcp2-*BAX* n'a pas fonctionné et celui de Pcp2-*GFP* a montré que *GFP* était bien intégré.

## DISCUSSION / CONCLUSION

Nous avons rencontré plusieurs fois des difficultés dans l'encadrement de nos fragments d'ADN par les séquences attB adéquates pour la recombinaison. Il nous a été impossible d'opter pour un changement de la séquence des amorces. En effet, en fonction de la séquence des extrémités 5' et 3' des fragments d'ADN à intégrer et afin de respecter un pourcentage en nucléotides GC (~40%) et une température d'hybridation similaire entre les amorces d'un même couple, nous avons été contraints de changer la séquence initiale des fragments par digestion du plasmide avec des enzymes de restriction différentes. Cependant, un choix très limité d'enzymes nous permettait avec certitude de récupérer sur gel les fragments d'intérêt en fonction de leur taille. Suite à des difficultés de récupération des fragments à partir du plasmide *L7/Pcp2-GFP* puis d'encadrement par PCR, nous avons décidé de commander directement les fragments d'ADN du promoteur *L7/Pcp2* et du gène *GFP* avec les séquences attB à leurs extrémités. La réaction de recombinaison BP du fragment attB1-*L7/Pcp2*-attB5r pour son intégration dans le vecteur pDONR P1-P5r n'a pas fonctionné. En revanche, le fragment attB5-*GFP*-attB2 s'est très bien intégré à son vecteur donneur P5-P2. Il est possible que l'échec de la réaction BP avec le promoteur provienne de sa forme linéaire et non plasmidique comme pour attB5-*GFP*-attB2. Ainsi, des mutations au niveau des extrémités ont pu avoir lieu, empêchant alors la recombinaison de se produire. Nous avons finalement repris le plasmide initial avec de nouvelles enzymes de restriction et amorces et la réaction BP a pu se produire. Concernant le plasmide contenant le gène *BAX*, nous n'avons rencontré aucun problème au cours des différentes étapes.

En revanche, plusieurs tentatives ont été nécessaires avant d'obtenir des colonies après transformation bactérienne des produits de réaction de recombinaison LR. Cependant, les résultats de la digestion des plasmides de destination des deux réactions ne nous ont pas permis de valider l'efficacité de la réaction et de nous assurer de l'obtention des vecteurs souhaités dans leur intégrité. Les résultats reçus suite au séquençage sont prometteurs. Il n'était probablement pas judicieux d'utiliser le couple d'amorces universelles M13 pour séquencer ce produit de réaction LR, qui est en fait préconisé pour le séquençage après la réaction BP. De nouvelles amorces plus adaptées à nos produits vont être conçues et une autre demande de séquençage des produits de la LR va être effectuée. Les produits de la BP seront également vérifiés afin de s'assurer de la validité de cette réaction.

Il aurait été intéressant de pouvoir transfecter des cellules en culture exprimant le gène *L7/pcp2* avec le plasmide *L7/pcp2-GFP* afin de confirmer l'expression de la GFP par ces cellules. Mais, nous ne disposons pas au laboratoire de cultures primaires de PC ni de neurones bipolaires rétiniens.

# **Partie 3 : Discussion générale et perspectives**



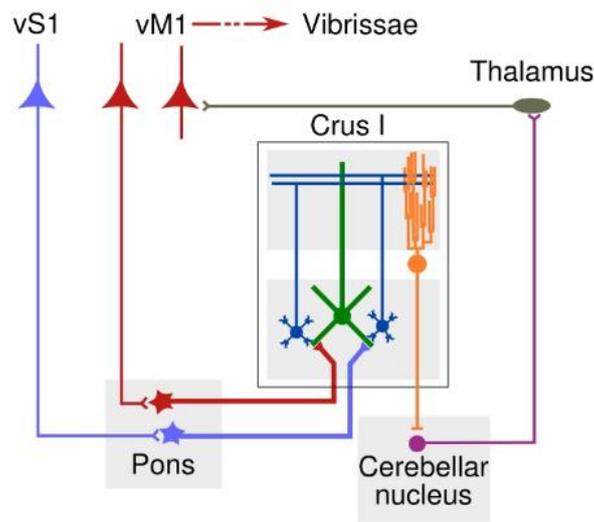
# I. Discussion générale

## ROLE DE CRUS I

De nombreuses études par imagerie ont identifié le cervelet comme la région cérébrale dont l'atteinte est la plus couramment associée aux TSA. Des analyses d'histologie en *post-mortem* ont par ailleurs démontré une diminution du nombre de PC (Bailey et al., 1998; Wegiel et al., 2014). Que ce soit chez l'Homme ou chez des modèles animaux, rares sont les études qui se sont intéressées à la distribution de cette perte neuronale au sein des différents lobules (Shi et al., 2009; Skefos et al., 2014). Ceci est d'importance car les lobules se distinguent aussi bien morphologiquement que fonctionnellement. Ainsi, la diminution du nombre de PC pourrait avoir une distribution hétérogène dans le cortex cérébelleux. De plus, la méthode de comptage des cellules en elle-même peut entraîner un biais dans les résultats comme par exemple le double comptage d'une même cellule lors d'un comptage manuel. Dans notre étude, nous avons opté pour une méthode de comptage par stéréologie (fractionnement optique), reconnue comme étant objective et sans biais dû à l'expérimentateur (West et al., 1991). Nous avons procédé à une exploration distinguant tous les sous-lobules des lobules VI et VII afin d'obtenir des résultats précis sur la répartition de la perte des PC, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant chez des modèles animaux. De plus, nous avons identifié les PC sur la base de critères morphologiques et structurels après coloration au crésyl violet, plutôt que d'utiliser un marqueur immunohistochimique tel que la calbindine dont la diminution d'expression après exposition au VPA a été démontrée (Main and Kulesza, 2017). En effet, leur corps cellulaire arrondi et le plus large des cellules du cervelet ainsi que leur organisation en monocouche entre la couche moléculaire et granulaire rendent les PC facilement distinguables.

Au cours de ces travaux nous avons montré notamment une réduction du nombre de PC dans Crus I chez les mâles exposés *in utero* au VPA. D'après Skefos et al. la perte des PC serait en effet plus importante dans les hémisphères du lobule VII (Crus I et Crus II) (Skefos et al., 2014). Il faut rappeler que ces régions sont impliquées dans plusieurs fonctions cognitives, motrices et affectives telles que la communication sociale, le langage, l'attention, la programmation du mouvement, la gestion des émotions (Ellerman et al., 1994; Schmahmann and Sherman, 1998; Strata, 2015; D'Mello and Stoodley, 2015).

Notre étude corrélatrice suggère qu'une altération de Crus I pourrait alors être impliquée dans la physiopathologie des TSA puisqu'elle indique des relations entre la diminution du nombre de PC dans Crus I et certains troubles du comportement observés chez ces souris : déficits des interactions sociales, irrégularités de la marche et problèmes de coordination des mouvements. Parallèlement, notre étude corrélatrice a montré également des relations entre le nombre de neurones dans le cortex moteur de ces mêmes souris et des déficits moteurs et sociaux. Nos résultats indiquent donc un lien entre la perte neuronale et les déficits. De façon intéressante, des analyses électrophysiologiques chez la souris ont démontré l'existence d'une boucle cortico-cérébelleuse entre Crus I et le cortex moteur primaire (Proville et al., 2014) (figure 46). Cette boucle serait impliquée dans la réaction motrice suite à une perception sensorielle des vibrisses et les deux structures participeraient alors au contrôle des mouvements volontaires fins. Ceci suggère que la perte neuronale dans Crus I et le cortex moteur chez les souris mâles exposés prénatalement au VPA pourrait être à l'origine de leurs déficits moteurs.



**Figure 46 : Crus I et le cortex moteur primaire sont impliqués dans la même boucle cortico-cérébelleuse.**

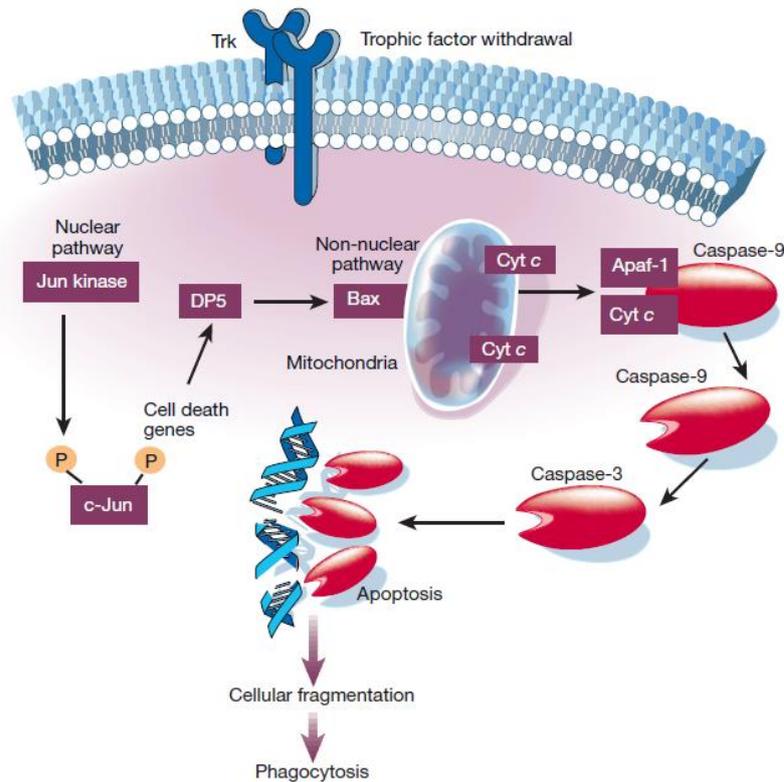
Efférences du cortex sensoriel primaire (vS1) en bleu et du cortex moteur primaire (vM1) en rouge formant deux voies différentes dans les noyaux du pont. Les projections sensorimotrices provenant du pont convergent dans le cortex cérébelleux vers la même cellule de Golgi (vert) et vers les cellules granulaires (bleu foncé) qui projettent vers les cellules de Purkinje (orange). La voie de sortie du cortex cérébelleux passe par les noyaux profonds du cervelet (violet) qui innervent le thalamus (gris). Les fibres du thalamus projettent ensuite dans le cortex moteur et forme ainsi la boucle cerebello-thalamo-corticale. (Proville et al., 2014)

Il est important de préciser que l'observation d'une diminution du nombre de neurones dans le cortex moteur est démontrée pour la première fois par nos travaux. Dans la littérature, seule l'étude de Snow et de ses collaborateurs a montré des modifications de morphologie des neurones pyramidaux de la couche II du cortex moteur primaire, avec une arborisation plus développée au niveau apical chez des rats exposés *in utero* au VPA, mâles et femelles regroupés (Snow et al., 2008). Toutefois, il faut remarquer que lorsque les mâles et les femelles sont séparés dans l'analyse, cette différence n'est plus significative. Ces travaux ne présentent en revanche aucun résultat de comptage neuronal. Une altération du cortex moteur serait responsable de troubles de l'apprentissage moteur mais ne serait en aucun cas responsable de perturbations dans l'exécution des mouvements automatiques (Grillner, 2015). Effectivement,

une lésion du cortex moteur chez des rats après un entraînement à la réalisation d'une série de mouvements d'appui des pattes, n'entraînerait pas de difficultés de reproduction alors que des rats non-entraînés avant la lésion, bien que capables d'effectuer les mouvements, présentent des difficultés d'apprentissage de ce paradigme (Kawai et al., 2015).

Afin d'étudier l'importance de la boucle cérébello-thalamo-corticale et de mieux identifier son rôle dans l'apparition des troubles moteurs et sociaux, nous avons émis l'hypothèse qu'une altération de Crus I pourrait être responsable autant des symptômes moteurs que sociaux chez des souris. En effet, une étude récente de la neuromodulation de Crus I a montré que son inhibition chez la souris engendrait des troubles de la sociabilité, des mouvements répétés et stéréotypés et des difficultés d'apprentissage (Stoodley et al., 2017). De plus, une suractivation de cette région chez un modèle génétique de TSA (*TSCI*<sup>-/-</sup>) serait capable de restaurer les déficits. Ceci appuie donc notre hypothèse de l'implication de Crus I dans les symptômes autistiques.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons projeté d'induire la mort des PC dans cette région du cervelet à travers la construction d'un virus capable d'induire la mort de manière spécifique dans ces neurones grâce au promoteur du gène *L7* codant pour la protéine Purkinje cell protein 2 (*Pcp2*) retrouvée uniquement dans les PC ou dans les neurones bipolaires rétiniens. Nous avons opté pour l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax afin de perturber l'équilibre des niveaux de protéines pro- et anti-apoptotiques et d'induire la voie intrinsèque de signalisation de la mort programmée (figure 47).



**Figure 47 : Processus d'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque**

Activation de l'apoptose dans des neurones par induction de l'activation de la Jun Kinase suite à la fixation d'un facteur trophique sur le récepteur TrK. Cette protéine phosphoryle c-Jun qui induit à son tour l'expression de DP5, un membre de la famille des Bcl-2. DP5 active Bax qui cause des dommages mitochondriaux ayant pour conséquence le relargage du cytochrome c (cyt c). Le cyt c forme ensuite un complexe avec Apaf-1 et la caspase-9. Ce complexe active alors la caspase-3 provoquant l'apoptose. Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor ; Trk : Tyrosine kinase receptor. (Yuan and Yankner, 2000)

Bax est une protéine impliquée dans les mécanismes de mort développementale programmée (Vekrellis et al., 1997). Elle est retrouvée en concentration élevée lors de la première semaine post-natale, au-delà de laquelle son expression est fortement réduite. Il a été démontré chez des souris déficientes pour le gène *BAX* une absence de la mort neuronale développementale par apoptose dans le cervelet (Jung et al., 2008). La surexpression de *BAX* contre l'effet protecteur des antagonistes Bcl-2, Bcl-x et entraîne la libération du cytochrome c des mitochondries qui va permettre l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3 (Pastorino et al., 1998). L'activation de la caspase-3 a souvent été démontrée dans les processus de mort développementale des PC (de Bilbao et al., 1999; Marín-Teva et al., 2004). Ainsi, l'induction

de la surexpression de *BAX* dans Crus I mimerait les processus de mort développementale et engendrerait la diminution du nombre de PC dans ce sous-lobule. De plus, des taux supérieurs en caspases-3 ont été mesurés dans les cellules mononucléées sanguines périphériques de patients atteints de TSA et leur activation a été démontrée (Siniscalco et al., 2012). Le choix de cette voie apoptotique semble donc être pertinent.

Malheureusement, et malgré nos efforts persistants, nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques qui ont ralenti la construction du vecteur lentiviral. Il reste que le développement de cette approche devrait être particulièrement utile. A titre d'exemple, Crus I et le cortex moteur primaire faisant partie d'une boucle anatomo-fonctionnelle, nous supposons que la perte des PC dans Crus I pourrait être à l'origine de perturbations dans le cortex moteur. Ayant également observé une diminution du nombre de neurones dans le cortex moteur chez les mâles VPA. Il serait alors intéressant d'observer les conséquences de l'induction de la perte des PC spécifiquement dans Crus I sur le nombre de neurones dans le cortex moteur.

L'intérêt du virus *L7/Pcp2-BAX* réside également dans la possibilité d'étudier les effets d'une perte en PC à différents âges. Dans un premier temps, il s'agirait d'induire cette perte à l'âge adulte afin de définir clairement le rôle de Crus I. Ensuite, le virus pourrait être injecté chez des nouveau-nés dans le but d'amplifier le processus de mort développementale des PC et d'étudier les conséquences sur le développement des animaux à différentes échelles d'analyses. Ce projet de développement d'un modèle de dégénérescence précoce des PC dans le cervelet pourrait alors aboutir, après une caractérisation comportementale, à un nouveau modèle des TSA. Ce modèle serait alors facilement inductible, reproductible, peu coûteux et serait capable de mimer davantage la physiopathologie des TSA par rapport aux modèles génétiquement modifiés. De plus, il offrirait de nouvelles données sur l'étiologie de cette pathologie psychiatrique neurodéveloppementale qui viendraient notamment compléter l'identification des réseaux neuronaux impliqués. L'exploration des phénomènes compensatoires éventuellement mis en

place au cours du développement serait pertinente sur ce modèle, suite à une comparaison avec les résultats obtenus lorsque l'injection virale est effectuée au stade adulte.

Enfin, des moyens de restaurer les déficits pourront être testés sur ces modèles de dégénérescence des PC comme par exemple, la stimulation des PC persistantes grâce à l'utilisation de la technique des DREADDS, d'optogénétique ou par stimulation magnétique transcrânienne.

Le virus serait également utile dans la détermination du rôle d'autres lobules, notamment Crus II, dont une perte des PC est observée dans notre étude chez les femelles VPA et les mâles poly I:C. D'après une étude chez le primate, Crus II serait connecté au cortex préfrontal (Kelly and Strick, 2003). De nombreuses études ont rapporté des perturbations anatomiques et fonctionnelles de cette région chez des patients atteints de TSA (Courchesne et al., 2011; Hosokawa et al., 2015; Morgan et al., 2010) ou dans des modèles animaux (Hara et al., 2015).

Le virus *L7/Pcp2-GFP* utilisé pour la condition contrôle dans ce projet pourrait en outre servir d'outil d'identification des PC afin de réaliser un tri cellulaire par cytométrie en flux. Ceci permettrait d'obtenir des échantillons uniquement composés de ces neurones afin de caractériser précisément leur profil moléculaire notamment par analyse transcriptomique.

## **PERTINENCE DU MODELE POLY I:C COMME MODELE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE**

Une infection pendant la grossesse constitue un facteur de haut risque pouvant provoquer une pathologie psychiatrique chez l'enfant. La MIA a très largement été démontrée comme responsable de perturbations neurodéveloppementales pouvant conduire à des TSA ou à la schizophrénie. En effet, Sham et ses collègues ont montré que la prévalence de la schizophrénie était considérablement augmentée suite à une exposition *in utero* au virus influenza au cours du

deuxième trimestre de grossesse (Sham et al., 1992). Une autre étude a confirmé la relation entre une infection par le virus influenza et le risque de développer chez l'enfant une schizophrénie en indiquant que ce risque est 7 fois plus élevé lors d'une infection pendant le premier trimestre (Brown et al., 2004a). Les données de Brown et de ses collaborateurs renforcent le lien entre la MIA et la schizophrénie en révélant des taux élevés en interleukine-8 dans le sérum des mères d'individus atteints de schizophrénie, pendant leur grossesse (Brown et al., 2004b). Il existe ainsi un lien étroit entre l'étiologie des TSA et celle de la schizophrénie. La schizophrénie est également une pathologie complexe, caractérisée par plusieurs symptômes présents ou non et avec une intensité variable selon les individus. Des réflexions sont en cours pour changer l'appellation de schizophrénie afin de proposer le concept de troubles du spectre de la psychose.

Au niveau symptomatique, des comportements similaires sont retrouvés dans les deux pathologies incluant des problèmes de sociabilité, d'expression émotionnelle, un manque d'intérêt et un comportement moteur atypique manifesté par des mouvements répétés et stéréotypés, ainsi qu'une agitation imprévisible. Etant donné cette proximité de manifestations cliniques, il n'est pas surprenant de retrouver une co-occurrence chez des patients. En effet, environ 30% des jeunes diagnostiqués avec une schizophrénie à début précoce présentent également une comorbidité de type TSA (Rapoport et al., 2009). Cependant, certaines subtilités permettent d'attribuer ces symptômes à une pathologie plutôt qu'à l'autre. A titre d'exemple, le retrait social ou le déficit d'expression émotionnelle présentés par les sujets atteints de schizophrénie sont à distinguer des troubles des interactions et de la communication sociale retrouvés dans les TSA (Hommel and Swedo, 2015). De plus, la période d'apparition des symptômes est différente : pour les TSA les premiers signes se manifestent vers 2-3 ans, ils persistent ensuite à l'âge adulte tandis que les symptômes de la schizophrénie apparaissent beaucoup plus tardivement, à partir de l'adolescence.

Le diagnostic de la schizophrénie selon les critères du DSM-5 requiert au moins la présence de deux symptômes parmi les suivants : hallucinations, désillusions, incohérence dans le discours, un comportement catatonique, et/ ou des symptômes dits « négatifs » qui incluent l'asociabilité et un niveau faible d'expression émotionnelle. Hormis, les symptômes négatifs qui peuvent présenter de vraies ressemblances avec certains signes fonctionnels des TSA, les autres symptômes cités précédemment sont spécifiques de la schizophrénie.

Dans les TSA, même s'ils ne sont pas encore intégrés aux critères de diagnostic, les troubles moteurs sont maintenant bien avérés chez les personnes atteintes : problèmes de coordination, irrégularités de la marche, posture anormale et/ou difficultés de dextérité (Kaur et al., 2018). Dans le cas de la schizophrénie, peu d'études se sont intéressées à l'aspect moteur chez les personnes qui sont affectées par cette pathologie. Des troubles du comportement moteur ont cependant pu être identifiés chez de nombreux patients : entre 40% et 66% dans l'étude de Peralta et al. selon la médication des patients (Peralta et al., 2010). Il peut s'agir de mouvements involontaires, de catatonie, de dysharmonie des mouvements, de maniérisme, de stéréotypies (Walther and Strik, 2012). Certaines études ont soulevé également des problèmes de coordination sociale (Varlet et al., 2012) et des troubles de la marche (Putzhammer et al., 2005). Il y aurait donc aussi sur le plan moteur quelques similitudes mais les symptômes sont nettement plus marqués dans les TSA. Cependant, il est difficile dans le cas de la schizophrénie de distinguer si l'origine des troubles moteurs est liée à la pathologie ou aux traitements pharmacologiques car les neuroleptiques sont connus pour induire des dyskinésies tardives et des symptômes dits « extrapyramidaux » (Mathews et al., 2005).

Des études précliniques sur différents modèles animaux visent à identifier les mécanismes impliqués susceptibles de provoquer ces perturbations développementales. La méthode utilisée pour la génération de ces modèles consiste à induire une infection chez la femelle gestante (rat

ou souris) ou à imiter une attaque virale ou bactérienne à l'aide d'agents pathogènes capables d'entraîner une MIA. Ainsi, l'activation du système immunitaire via l'injection de poly I:C est une méthode également utilisée pour développer un modèle de schizophrénie. La question est alors la suivante : « qu'est-ce qui démontre que le modèle utilisé dans notre étude est plus proche des TSA plutôt que de la schizophrénie ? »

Les syndromes associés à l'une ou l'autre des deux pathologies pourraient dépendre de la sévérité de la MIA. D'après plusieurs études précliniques utilisant le poly I:C comme agent pathogène, la dose employée pour induire un modèle de schizophrénie chez le rongeur est nettement plus faible ( $\leq 5$  mg/kg) que celle généralement utilisée pour obtenir un modèle de TSA (20 mg/kg) (Solek et al., 2017). Le choix de la dose de 20 mg/kg dans notre étude était donc judicieux.

Afin de caractériser le comportement social de nos animaux nous avons eu recours au test à trois chambres : test de référence pour caractériser la sociabilité des animaux (Crawley, 2004). Ce test permet en effet de démontrer des déficits d'interactions sociales chez des modèles de TSA lors de la phase de sociabilité (Sato et al., 2013; Yang et al., 2011). Concernant les modèles de schizophrénie, ce test ne montre aucune baisse de la sociabilité mais révèle uniquement une diminution de l'attrait pour un nouveau congénère lors de la phase de préférence pour la nouveauté sociale (O'Tuathaigh et al., 2007; Seillier and Giuffrida, 2016). Ce test permettrait alors de différencier les deux modèles selon les résultats obtenus dans ces deux phases. Nos résultats présentent une diminution des interactions sociales chez les mâles poly I:C et apportent donc un argument supplémentaire à la pertinence de ce modèle utilisé comme modèle des TSA.

Dans la littérature, rares sont les données qui concernent la motricité du modèle poly I:C. Naviaux et al. ont démontré des troubles de la coordination sensorimotrice à l'aide du rotarod chez des souris mâles exposées deux fois *in utero* au poly I:C (3 mg/kg à E12.5 et 1.5 mg/kg à E17) (Naviaux et al., 2013). Dans notre étude, nous montrons une irrégularité de la marche,

mesurée par des paramètres précis, ainsi que des problèmes de coordination des mouvements chez les mâles poly I:C. Malgré le manque de données caractérisant les troubles moteurs dans la schizophrénie, nous supposons que les troubles moteurs associés ne sont pas liés à des problèmes fonctionnels dans la commande exécutive comme dans les TSA. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les désordres manifestés par nos souris sont associés à la pathologie des TSA.

De nombreuses données suggèrent que la schizophrénie peut être associée à des anomalies du cervelet, resserrant donc davantage le lien entre la schizophrénie et les TSA. Des analyses d'imagerie et d'histologie en *post-mortem* chez des patients atteints de schizophrénie ont rapporté une diminution du volume du vermis (Okugawa et al., 2002; Weinberger et al., 1980), une réduction de la taille des PC dans le vermis (Tran et al., 1998) et de leur densité (Maloku et al., 2010). Des résultats qui sont contredits par Andersen et Pakkenberg 2003 qui ne montrent aucun changement de volumes ni du nombre de PC mesuré par stéréologie (Andersen and Pakkenberg, 2003). A l'inverse, les résultats de Levitt et al. suite à des analyses par imagerie à résonance magnétique, démontrent une augmentation du volume du vermis chez les patients atteints de schizophrénie (Levitt et al., 1999). Il semblerait ainsi que la schizophrénie pourrait être associée à des anomalies cérébelleuses localisées dans le vermis (Joyal et al., 2004; Okugawa et al., 2003). Or, chez les patients atteints de TSA, en plus d'une atteinte du vermis, plusieurs études ont également démontré des altérations plus importantes dans les parties latérales du cervelet (Courchesne, 1997b; Courchesne et al., 1994; Murakami et al., 1989; Skefos et al., 2014).

Chez des souris C57Bl6/J mâles exposées prénatalement au poly I:C, deux études nous indiquent une diminution du nombre de PC dans le vermis du lobule VII. Dans la première, les souris gestantes avaient reçu une injection de 20 mg/kg à E12.5 (Shi et al., 2009). Dans la deuxième, les souris gestantes avaient été traitées deux fois avec des doses plus faibles: 3 mg/kg

à E12.5 et 1.5 mg/kg à E17 (Naviaux et al., 2013). Il faut cependant noter que leurs analyses ont été réalisées sur des coupes sagittales au niveau du vermis et ne leur ont donc pas permis une quantification dans les hémisphères de ce lobule. Nos résultats des comptages des PC chez les souris mâles poly I:C sont en adéquation avec ces données précliniques puisque nous avons observé une diminution dans le sous-lobule 7cb qui constitue la partie vermale du lobule VII. Néanmoins, nous montrons également une diminution des PC dans Crus II, une des parties hémisphériques de ce même lobule. Ceci corrobore donc les données cliniques associées aux TSA. Ainsi, l'utilisation de ce modèle de MIA induit par le poly I:C avec la dose de 20 mg/kg serait donc plus pertinent comme modèle des TSA.

Outre les altérations retrouvées dans le cervelet, une étude *post-mortem* sur des cerveaux de patients atteints de schizophrénie a révélé par stéréologie une réduction du nombre de neurones totaux dans le striatum (Kreczmanski et al., 2007). Dans notre étude, nous n'avons pas constaté de changement dans cette région cérébrale en utilisant la même méthode. De plus, aucune perte neuronale n'a été observée chez des personnes atteintes de TSA. Ceci appuie davantage le choix de ce modèle comme modèle des TSA.

Pris dans leur ensemble, nos résultats mettent en évidence d'importantes différences liées au sexe des animaux. L'exposition prénatale au poly I:C a provoqué chez les mâles un phénotype social et moteur associé aux TSA ainsi que des atteintes histologiques similaires à celles observées chez les patients atteints de TSA alors que les femelles ne semblent pas avoir été affectées par le traitement. Ces résultats sont donc en lien avec le ratio de 3 garçons atteints pour une seule fille dans les TSA. En opposition à ces résultats, l'incidence de la schizophrénie est environ égale chez les hommes et chez les femmes, il n'y aurait donc pas d'effet aussi important du sexe dans cette pathologie (Aleman et al., 2003; Haute couverture et al., 2006).

En résumé, il semblerait que les TSA et la schizophrénie partagent un facteur de risque commun : l'activation du système immunitaire maternel. Cependant, la sévérité de cette infection et

l'importance de la réponse inflammatoire corrèle davantage avec le risque de développer des TSA. Ces deux pathologies psychiatriques, bien que partageant de vraies ressemblances symptomatiques, diffèrent principalement sur l'aspect moteur et neuroanatomique. Elles se distinguent également de par la vulnérabilité liée au sexe. Ainsi, les mécanismes impliqués dans ces deux pathologies seraient propres à chacune.

## **IMPLICATION DE LA MICROGLIE**

Les cellules microgliales constituent la population de macrophages résidents du système nerveux central (Kettenmann et al., 2011). Elles proviennent des cellules précurseurs de la lignée myéloïde qui colonisent le cerveau pendant la période embryonnaire. Elles représentent 15 à 20 % des cellules totales du cerveau (Carson et al., 2006). Lors du développement, elles ont une morphologie de type amiboïde, facilitant ainsi leur migration et leur prolifération. Lorsqu'elles deviennent matures, pendant la période post-natale, elles acquièrent un phénotype ramifié caractérisant leur état de quiescence. En cas d'activation, elles retrouvent une forme amiboïde améliorant leur motilité pour atteindre le site lésé et leur pouvoir de phagocytose. Ainsi, la microglie permet l'élimination de débris cellulaires ou d'agents pathogènes bactériens et viraux potentiellement toxiques au fonctionnement cérébral (Hanisch and Kettenmann, 2007).

La microglie ne joue pas seulement un rôle en conditions pathologiques, elle est également essentielle au contrôle de l'homéostasie des tissus sains afin d'assurer leur protection (Czeh et al., 2011). De plus, elle est indispensable au cours du développement cérébral car elle intervient dans de nombreux processus. Après une colonisation corticale entre E11.5 et E17.5 chez la souris, les cellules microgliales limitent la production de neurones corticaux en phagocytant les

précurseurs neuronaux dans les zones de prolifération lors de la phase tardive de neurogénèse corticale (Swinnen et al., 2012; Cunningham et al., 2013). Pendant la période post-natale, elles participent au phénomène de mort neuronale développementale (Marín-Teva et al., 2004) et à l'élagage synaptique (figure 48) (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). Chez l'Homme, ces phénomènes se produisent au cours des deux premiers trimestres (Monier et al., 2007).

Des études sur des souris modèles de troubles obsessionnels compulsifs (Chen et al., 2010) et du syndrome de Rett (Derecki et al., 2012), désordres qui présentent des symptômes communs à ceux des TSA, ont rapporté des anomalies dans l'élagage synaptique soit par insuffisance, soit par excès de l'activité microgliale. Dans les deux cas, la balance excitation/inhibition des neurones en était perturbée (Roumier et al., 2008). Cette conséquence a largement été proposée comme mécanisme sous-jacent dans des maladies neurodéveloppementales (TSA, l'épilepsie, le syndrome de Rett, le syndrome du X fragile) (Gatto and Broadie, 2010). Une autre étude effectuée chez des souris mutantes pour le gène *Cx3cr1*, codant pour un récepteur aux chimiokines participant à l'interaction neurone-microglie, a montré qu'une baisse de l'activité microgliale pouvait entraîner des comportements de types TSA : déficits des interactions sociales, augmentation des mouvements répétitifs (Zhan et al., 2014). Ainsi, parce qu'elle intervient de façon déterminante tout au long du développement du cerveau, une perturbation du fonctionnement microglial, que ce soit l'inhibition ou la stimulation de son activité par des facteurs externes, pourrait entraîner des troubles neurodéveloppementaux. La microglie est donc susceptible d'être impliquée dans l'étiologie des TSA.

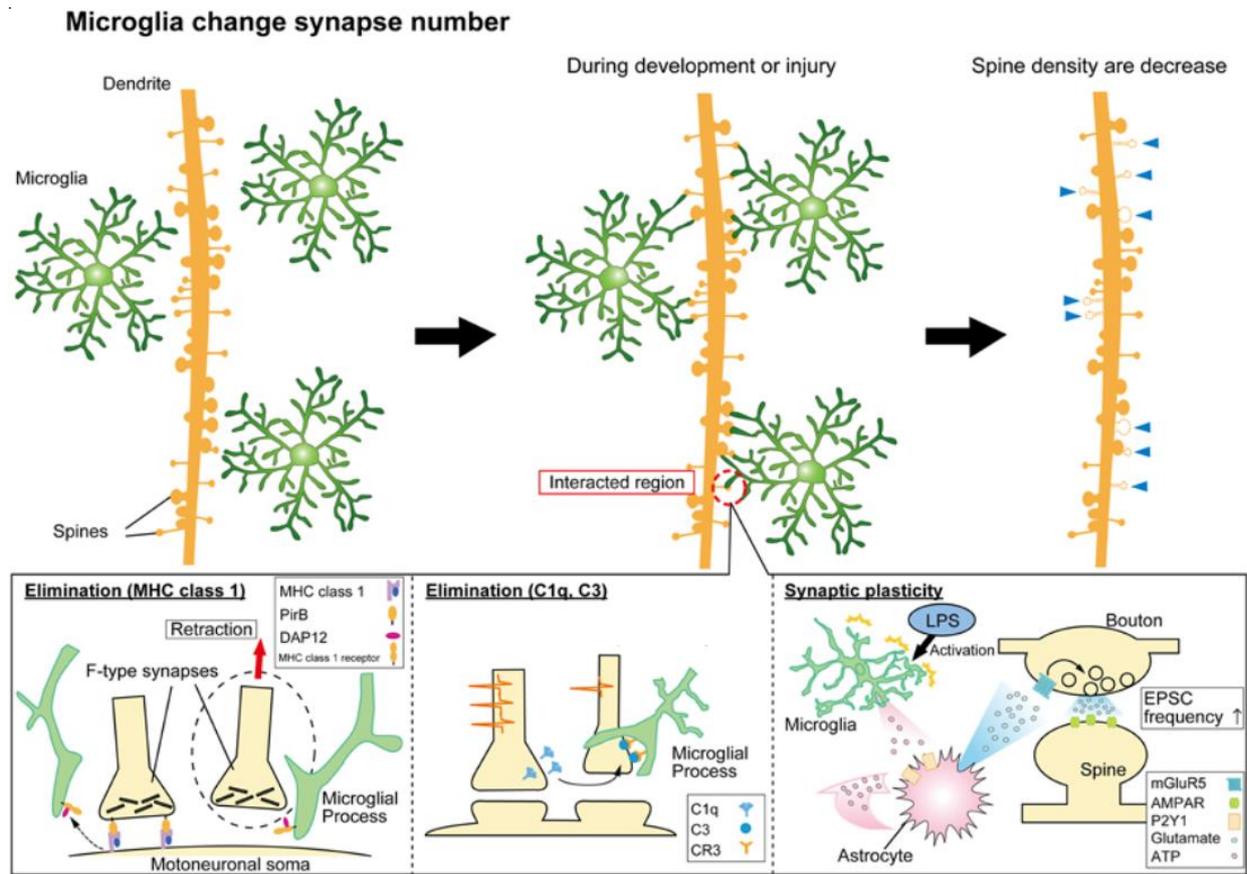
Des études *post-mortem* sur des cerveaux humains ont démontré une activation microgliale anormale dans le cas de TSA, constatée dans le cervelet (Suzuki et al., 2013; Vargas et al., 2005), dans le cortex (Tetreault et al., 2012; Vargas et al., 2005), dans le cortex préfrontal dorsolatéral (Morgan et al., 2010) suite à des analyses de la morphologie et de la densité des cellules microgliales. En outre, Knuesel et ses collaborateurs font le lien entre une MIA et la

persistance d'une activation microgliale chez la descendance induisant une réponse inflammatoire post-natale et pouvant être responsable de la pathogénèse des TSA (Knuesel et al., 2014).

Suite à ces données, nous avons exploré l'activation microgliale dans le cerveau des souris modèles de la MIA et plus particulièrement dans le cervelet afin de faire le lien entre l'activation microgliale et la diminution du nombre de PC. De plus, une étude a démontré que la microglie reconnaît les agents viraux via l'activation des récepteurs TLR3 (Town et al., 2006). Elle active ensuite la voie des MAP kinases et induit la production de cytokines pro-inflammatoires pour un effet neurotoxique. Le poly I:C étant reconnu par ces récepteurs grâce à sa structure d'ARN double brin, nous nous attendions alors à l'observation d'une activation microgliale dans le cervelet des souris poly I:C, d'autant plus que la date d'injection du poly I:C correspond à une période cruciale de l'implication de la microglie sur le développement cérébral du fœtus puisqu'il s'agit de la colonisation des cellules microgliales dans le cortex (Swinnen et al., 2012). Ainsi, en réponse à une réaction inflammatoire provoquée par la MIA, la microglie dans le cerveau en développement pourrait avoir une activité de phagocytose des précurseurs neuronaux plus importante ce qui conduirait à une diminution du nombre de neurones. Cependant, nous n'avons constaté aucun changement de la morphologie des cellules suite à un marquage de la protéine spécifique Iba1 à P45. Il est possible qu'à cet âge, la microglie ne soit plus active ce qui pourrait expliquer nos résultats. Cependant, une étude réalisée chez des sujets dont l'âge pouvait atteindre 55 ans a montré une activité de la microglie plus importante dans le cervelet des patients atteints de TSA, quel que soit l'âge (Vargas et al., 2005). En revanche, nos résultats sont en adéquation avec deux études effectuées sur des cerveaux de souris poly I:C à l'âge de 3 mois, dont l'une concerne également le cervelet (Corradini et al., 2018; Hui et al., 2018). Toutefois, il faut considérer que dans ces deux études, la dose de poly I:C injectée aux femelles gestantes était moindre (2-5 mg/kg) par rapport à celle utilisée dans notre étude et

avec une date de traitement précoce (E9-9.5). Il serait intéressant de procéder à des analyses lors des deux premières semaines post-natales chez les souris de notre étude. En plus d'une analyse de la morphologie, une quantification de ces cellules pourrait apporter des informations complémentaires.

Au regard des rôles multiples de la microglie dans la maturation du cerveau, il semblerait que la perturbation de son fonctionnement soit impliquée dans les processus menant aux TSA. Deux hypothèses sont à explorer, il peut s'agir soit : 1) d'une diminution de l'activité microgliale lors des phases de régulation des précurseurs neuronaux et d'élagage synaptique ; 2) d'une activation excessive, en réponse par exemple à une réaction inflammatoire pendant le développement.



**Figure 48 : Rôle développemental de la microglie dans l'élagage synaptique**

La microglie peut phagocyter les épines dendritiques les plus faibles (haut de la figure). Le bas de la figure indique les mécanismes régissant l'interaction microglie-synapse. Les protéines intervenant dans ce processus sont le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC de class 1) (à gauche) et la protéine du complément C3 (au centre) pour leur contribution à la phagocytose des synapses par la microglie. Les cellules microgliales activées peuvent aussi modifier la fonctionnalité de la transmission via les voies de signalisation de l'ATP, des astrocytes et des récepteurs au glutamate comme indiqué en bas à droite. (Miyamoto et al., 2013)

## COMPARAISON DES DEUX MODELES D'EXPOSITION PRENATALE

traitement	sexe	région											
		VI	cervelet				cortex moteur	striatum	SNc	comportement			
			Crus I	Crus II	PM	7cb				sociabilité	mvt répétés	exploration	motricité
VPA	♂	=	↓↓	=	=	=	↓↓	=	=	↓↓	↑	↓	↓↓
	♀	=	=	↓↓	=	=	=	=	=	=	↑	↓	↓↓
Poly IC	♂	=	=	↓↓	=	↓↓	↓	=	=	↓	=	↓	↓
	♀	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	=

**Table 8 : Résumé des résultats comportementaux et histologiques obtenus dans notre étude chez les modèles VPA et poly I:C, mâles et femelles.**

Au regard des résultats obtenus suite aux tests de comportement préalablement effectués au laboratoire et suite aux analyses histologiques présentées dans cette thèse, nous constatons de nombreuses différences entre le modèle VPA et le modèle poly I:C (table 8). Par conséquent, le phénotype des souris peut varier en fonction des causes induisant les TSA. En effet, certains symptômes de la maladie ne sont pas forcément retrouvés chez les deux modèles comme par exemple les mouvements répétés de toilettage présentés par les souris VPA mais absents chez les poly I:C. De plus, les analyses indiquent une intensité des déficits sociaux et moteurs moins importante chez les poly I:C. Cela suggère que ce modèle se rapprocherait d'un syndrome de TSA plus léger. Ces deux modèles sont intéressants et utiles pour des études sur l'étiologie des TSA parce qu'ils sont issus de facteurs de risque provoquant cette pathologie chez l'Homme et sont donc susceptibles de partager des mécanismes sous-jacents communs, si ce n'est la même physiopathologie que celle des patients. D'autre part, leur comparaison reflète l'hétérogénéité des TSA traduite par le concept de spectre que ce soit dans la variabilité des symptômes présents ou non selon les différents syndromes, ou que ce soit également en fonction de leur degré de sévérité.

Concernant les observations neuroanatomiques, les pertes neuronales sont moindres chez les poly I:C par région et ne sont pas localisées forcément dans les mêmes sous-lobules du lobule

VII dans le cervelet. En effet, la réduction du nombre de PC n'atteint pas les mêmes sous-lobules dans les hémisphères chez les mâles : Crus II chez les poly I:C, Crus I chez les VPA. Or, nous avons observé une diminution du nombre des PC dans Crus II également chez les femelles VPA. De plus, nous avons constaté un nombre de PC significativement inférieur dans le vermis des poly I:C mais pas dans celui des VPA. Dans cette thèse, j'ai effectué une analyse précise et non biaisée du nombre de PC dans chaque sous-lobule des lobules VI et VII chez deux modèles animaux en distinguant les mâles et les femelles. Malheureusement, de très rares études ont procédé à une quantification des PC dans le cervelet en fonction des sous-lobules (Shi et al., 2009; Skefos et al., 2014) et encore moins ont été réalisées en distinguant le sexe (Naviaux et al., 2013). Il est donc difficile de comparer nos résultats avec les données cliniques et de déterminer si la localisation des pertes neuronales est dépendante de la cause des TSA et du sexe. Une étude corrélative chez le modèle poly I:C n'a pas montré de relation entre le comportement et l'histologie ni chez les mâles ni chez les femelles. Ces données n'ont pas été présentées dans cette thèse. Des analyses supplémentaires seront nécessaires afin de caractériser davantage ce modèle et de proposer des hypothèses quant aux conséquences neuroanatomiques sur le comportement.

En outre, ces deux modèles illustrent également la différence du nombre de garçons diagnostiqués par rapport aux filles (3:1). En effet, au regard du modèle VPA, les femelles ne présentent pas de déficits sociaux. Pourtant, ce symptôme est caractéristique des TSA et fait souvent acte de diagnostic lorsqu'il est accompagné d'autres signes. Hormis cet aspect social non altéré, elles témoignent toutefois des mouvements répétés, des troubles moteurs et présentent une diminution du nombre de neurones. Elles seraient donc affectées par l'exposition *in utero* au VPA mais ne rempliraient probablement pas les conditions pour être diagnostiquées comme étant atteintes de TSA. Il faut considérer que cela pourrait potentiellement éclaircir un problème de diagnostic chez certaines femmes. En effet, il semblerait que les femmes atteintes

de TSA soient plus difficiles à diagnostiquer voire même seraient sous-diagnostiquées en raison de leur capacité à s'adapter socialement, par exemple par imitation (Tierney et al., 2016). Elles réussissent alors à intégrer un groupe social à l'aide de stratégies diverses qu'elles mettent en place tout au long de leur vie. Une analyse de leurs performances motrices pourrait donc être d'un intérêt majeur pour dépister des troubles neurodéveloppementaux.

A l'inverse, les souris femelles exposées *in utero* au poly I:C ne présentent quasiment pas de déficits sur le plan comportemental, il s'agit seulement d'une baisse de l'exploration et de légers retards dans le développement moteur. En revanche, aucune perte cellulaire n'a été montrée. Les femelles semblent être protégées face à l'exposition prénatale à la MIA. Des facteurs hormonaux pourraient ainsi être impliqués dans ces différences liées au sexe des animaux.

## CONTRIBUTION HORMONALE

Les niveaux de testostérone ont été la cible de plusieurs études qui ont démontré des corrélations entre des taux élevés et des comportements de type autistique : déficits des interactions sociales, du contact visuel, des compétences relationnelles, de l'interprétation émotionnelle d'images inanimées (Knickmeyer et al., 2005; Auyeung et al., 2009). Une autre étude indique de plus, une corrélation inverse avec l'empathie des garçons contrairement à celle des filles (Chapman et al., 2006). Au niveau neuroanatomique, une étude corrélatrice a montré que l'augmentation des taux de testostérone fœtale était associée à une augmentation du volume de la substance grise dans certaines régions du cerveau morphologiquement dépendantes des hormones sexuelles (Lombardo et al., 2012) : la jonction tempo-pariétale droite impliquée dans des processus cognitifs tels que l'attention, la mémoire, le langage et la cognition sociale (Cabeza et al., 2012; Carter and Huettel, 2013), les cortex somatosensoriel, moteur et prémoteur en bilatéral ainsi qu'une petite région ventro-latérale de l'amygdale gauche. A l'inverse, cette

étude a également révélé une corrélation inverse entre la testostérone et le volume du cortex orbito-frontal postéro-latéral et de l'insula antérieure. Ces résultats montrent qu'une augmentation des taux fœtaux de testostérone influence la différenciation du cerveau dans le sens de la théorie de Baron-Cohen (Baron-Cohen et al., 2003, 2005) qui suggère un phénotype hypermasculinisé dans les TSA. La testostérone aurait donc sa part de responsabilité lors du développement cérébral et ainsi dans les mécanismes induisant les TSA. Ces niveaux élevés de testostérone ou de ses métabolites seraient également retrouvés à l'âge adulte chez la majorité des cas de TSA (Geier and Geier, 2007; Ruta et al., 2011), notamment chez des femmes diagnostiquées avec un syndrome d'Asperger (Schwarz et al., 2011). Cependant, une étude a démontré qu'il n'y aurait pas de taux plus élevés de testostérone chez des hommes d'une vingtaine d'années atteints de TSA (Tan et al., 2018). Pris dans leur ensemble ces études suggèrent qu'une hyperandrogénie pourrait être un facteur de risque significatif de développer des TSA.

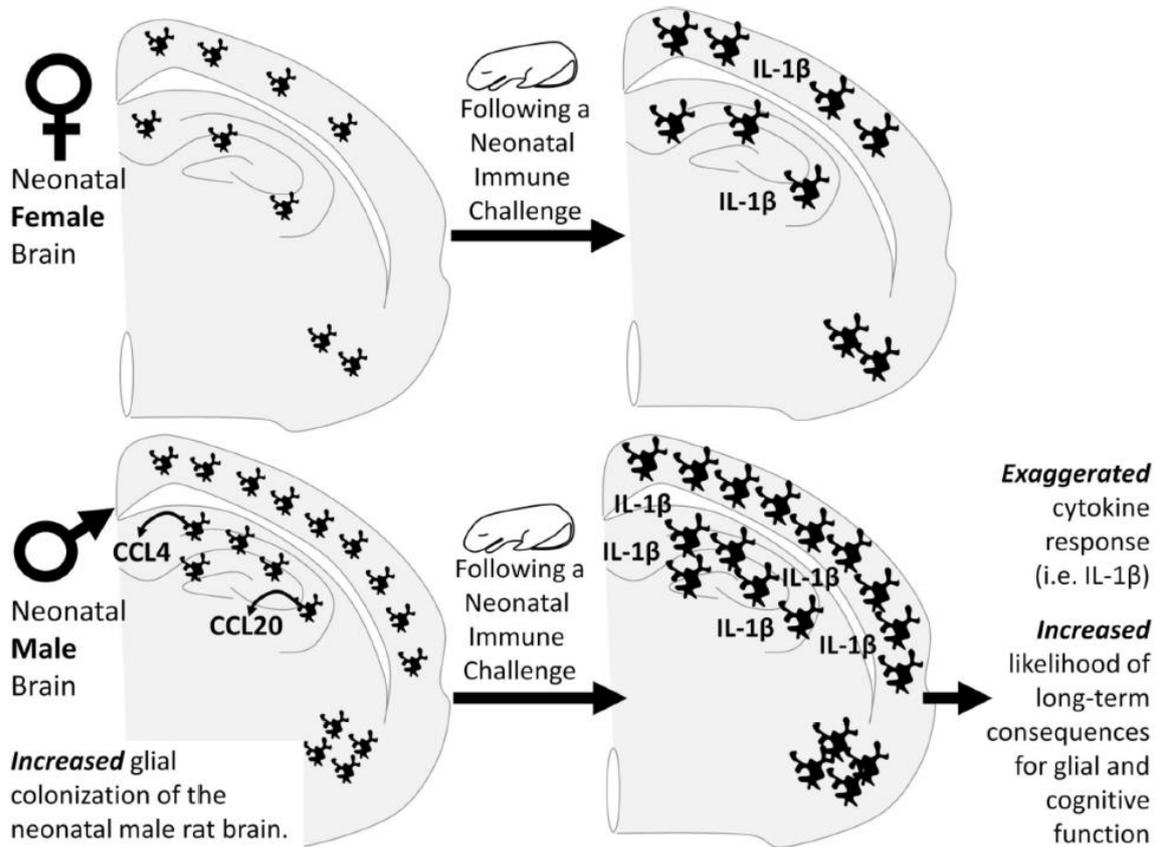
L'une des voies potentielles qui pourrait conduire à des taux élevés de testostérone est celle du gène *RORα* dont l'expression est réduite chez des patients atteints de TSA (Nguyen et al., 2010; Sarachana et al., 2011). *RORα* régule l'aromatase, une enzyme qui convertit les androgènes en œstrogènes, qui est réciproquement activée par l'œstradiol et inhibée par la testostérone (Sarachana et al., 2011). Par conséquent, cette boucle de régulation amplifie l'inhibition de *RORα* dans les TSA et les niveaux d'aromatase s'en retrouvent diminués davantage. Ceci provoque alors une accumulation de ses substrats, donc de la testostérone, et une réduction de ses produits, dont l'œstradiol. Une étude menée sur des souris mutantes pour le gène de l'aromatase (*ArKO*) montre que ces animaux présentaient un phénotype comportemental différent selon leur sexe. Les mâles manifestent des comportements compulsifs et répétés (Hill et al., 2007), tandis que les femelles sont caractérisées par un état dépressif (Dalla et al., 2004). Les stéroïdes sexuels influencent également un grand nombre de processus cellulaires, comme

par exemple la croissance dendritique, la spinogénèse et la synaptogénèse par les oestrogènes (Sasahara et al., 2007; Sakamoto et al., 2003), et ont également un effet épigénétique sur le dimorphisme sexuel du développement cérébral (McCarthy et al., 2009). Ainsi, un déséquilibre de la balance androgènes/oestrogènes pourrait être un risque élevé de générer les TSA.

Les rôles de *RORα* sont multiples car il régule la transcription de gènes variés dans différents tissus. Des souris mutantes pour ce gène (*staggerer*) manifestent des troubles de la coordination motrice, de préhension et d'équilibre témoignant d'une dysfonction cérébelleuse. En effet, *RORα* intervient dans le développement du cervelet et des PC. Il tient de plus un rôle neuroprotecteur face au stress oxydatif (Chauhan and Chauhan, 2006) et face à une inflammation (Delerive et al., 2001). Les souris *staggerer* présentent une dysfonction de leur système immunitaire avec notamment une augmentation excessive des niveaux des ARNm codants pour les IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 suite à une exposition au LPS ou au TNF $\alpha$  (Kopmels et al., 1992; Delerive et al., 2001). Il est important de rappeler ici qu'une concentration plus élevée de ces interleukines est retrouvée chez les patients atteints de TSA (Ashwood et al., 2011) ce qui vient soutenir l'hypothèse que *RORα* est un gène candidat à cette pathologie. A l'inverse, Delerive et ses collaborateurs ont démontré qu'une surexpression de l'isoforme *RORα1* limite la sécrétion des IL-6, IL-8 et COX2, des marqueurs importants de la réponse inflammatoire (Delerive et al., 2001). Dans cette même étude, les auteurs ont également mis en évidence que *RORα1* inhibe la réponse inflammatoire en produisant I $\kappa$ B $\alpha$ , l'inhibiteur majoritaire de la voie de signalisation de NF $\kappa$ -B qui produit ces trois cytokines.

De plus, *RORα* serait potentiellement impliqué dans des fonctions gliales car les oestradiols dont il permet la synthèse modulerait l'activité des astrocytes (McCarthy et al., 2003). Schwartz et ses collaborateurs ont également démontré que la colonisation microgiale variait selon le sexe chez le rat, avec un nombre de cellules microgiales matures supérieur chez les

mâles à P4 (Schwarz et al., 2012). Ceci suggère une plus grande vulnérabilité à une infection lors de la période néonatale chez les mâles (figure 49).



**Figure 49 : Dimorphisme sexuel de la colonisation microgliale rendant les mâles plus vulnérables à une infection néonatale**

Dans l'hippocampe et le cortex, les mâles expriment 200 et 50 fois plus des chémokines CCL20 et CCL4, respectivement. Les différences d'expression de ces chémokines selon le sexe peut conduire aux différences de colonisation microgliale entre les nouveau-nés mâles et femelles. Les mâles ont significativement plus de cellules microgliales dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale à P4 que les femelles. Cette différence du nombre de cellules microgliales selon le sexe rend les mâles plus vulnérables en cas d'infection lors de la période néonatale, puisqu'elle entraînerait une expression excessive de cytokines. Cette augmentation en cytokines pendant le développement causerait des changements à long terme dans la fonction gliale et induirait un risque de provoquer des déficits cognitifs à un âge plus avancé. (Schwarz and Bilbo, 2012)

Une importante étude de Hu et ses collaborateurs indique que les taux d'aromatase sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes dans le cortex (ratio=1.61) (Hu et al., 2015). En revanche, ils n'ont constaté aucune différence dans le cervelet. Ainsi, l'impact d'une baisse de

l'expression de *RORα* ou de l'aromatase dans les TSA serait plus important chez les hommes par rapport aux femmes pour lesquelles cette marge de niveau protéique pourrait compenser, atténuer certains déficits.

Suite à notre quantification de l'expression de l'aromatase, nos résultats ne nous permettent pas de conclure du fait du nombre trop faible d'échantillons de souris poly I:C. Des futures analyses viendront prochainement confirmer ou infirmer la tendance observée d'une diminution chez les mâles poly I:C. Nous supposons qu'une diminution dans ce modèle suggérerait une réduction de l'expression de *RORα* et signifierait que l'infection virale, provoquée par le poly I:C, enclencherait des mécanismes de régulation génétique pour ce gène. Ceci témoignerait alors de son implication dans l'étiologie des TSA. En revanche, si nous ne constatons aucune différence, nous proposerons l'hypothèse que selon les formes de TSA, le gène *RORα* n'est pas toujours engagé dans les mécanismes physiopathologiques menant à cette pathologie neurodéveloppementale.

Cependant, notre étude indique une sensibilité plus importante des mâles au poly I:C qui présentent des comportements de types TSA ainsi qu'une perte neuronale, alors que les femelles n'ont été que très peu affectées par cette exposition *in utero* et qu'elles ne manifestent pas de phénotype autistique. Une revue consacrée aux effets des hormones sexuelles sur le système immunitaire chez l'Homme a mis en évidence un dimorphisme sexuel dans la réponse immunitaire (Bouman et al., 2005). Les niveaux d'expression des protéines pro-inflammatoires sont différents selon le sexe et les femmes seraient plus résistantes à une infection bactérienne, virale ou parasitaire car leur réponse inflammatoire serait plus efficace.

D'après une étude, *RORα* serait vulnérable aux modifications épigénétiques (Nguyen et al., 2010). En effet, une hyper méthylation au niveau de la terminaison 5' de l'isoforme *RORα1* a été mise en évidence. Le VPA ayant un effet sur les HDAC, il serait possible qu'il ait une influence sur l'expression de ce *RORα*. Une autre étude a montré des différences d'expression

des récepteurs aux androgènes sur les PC de rats VPA (600 mg/kg à E12) dépendantes du sexe des animaux et des lobules du cervelet à P7 et à P14 (Perez-Pouchoulen et al., 2016). Le VPA aurait ainsi des effets épigénétiques sur les gènes de régulation stéroïdienne. Il serait alors intéressant de procéder à une analyse de l'expression de *RORα* et de l'aromatase également chez les souris exposées *in utero* au VPA.

## II. Conclusion et perspectives

Notre étude a porté sur deux modèles d'exposition prénatale couramment utilisés pour des études sur les TSA. Ils répondent aux critères définis par Nestler et Hyman qui proposent à tout modèle pertinent des désordres neuropsychiatriques de respecter une validité de construction, une validité apparente et une validité prédictive (Nestler and Hyman, 2010).

Nos analyses comportementales et neuroanatomiques ont permis d'apporter des résultats sans précédent sur les perturbations de la motricité fine dans deux modèles pertinents des TSA et pour les deux sexes. Nos données montrent que le comportement moteur est un paramètre d'intérêt dans les TSA et suggèrent que les troubles de la motricité pourraient être utilisés comme marqueurs biologiques de sévérité de la pathologie. Corrélés avec les déficits sociaux chez les mâles VPA et partageant possiblement des substrats neuronaux communs, une thérapie visant à restaurer les désordres moteurs pourraient potentiellement être bénéfique sur les déficits sociaux dans les TSA. De prochaines analyses neuro-fonctionnelles dans les hémisphères cérébelleux (lobule VII) et le cortex moteur devraient apporter des informations complémentaires sur l'activité de la boucle cérébello-thalamo-corticale par exemple et permettraient d'identifier des mécanismes altérés responsables des déficits moteurs et sociaux. C'est l'objectif du projet d'induction de la mort neuronale dans Crus I par injection de virus exprimant une protéine pro-apoptotique spécifiquement dans les PC. Des analyses génétiques et biochimiques sont également en cours afin d'explorer l'expression de gènes codants pour des protéines synaptiques afin de caractériser les systèmes GABAergique et glutamatergique dans ces régions.

Nous avons montré une coordination des mouvements perturbée chez les souris femelles VPA qui présentaient également une perte neuronale mais qui pourtant n'avait aucune baisse de leur

sociabilité. Ainsi, les déficits moteurs seraient également nécessaires pour le diagnostic des femmes qui seraient atteintes de TSA mais sous-diagnostiquées en raison de leurs importantes capacités d'adaptation sociale. Au regard des nombreuses différences entre les mâles et les femelles du modèle VPA mais aussi, et surtout, du modèle poly I:C, nous projetons également de déterminer les différences de vulnérabilité selon le sexe des animaux sur ces deux modèles. Nous nous intéresserons à différentes voies mises en jeu par le gène *RORα* en ciblant la régulation stéroïdienne, inflammatoire et épigénétique.

Cette thèse s'inscrit dans une étude plus large des TSA constituée de plusieurs projets au laboratoire. L'un concerne l'étude de l'activité électrique des interneurons exprimant la parvalbumine dans le striatum car ils pourraient être responsables des comportements répétés et stéréotypés chez le modèle VPA. Un autre projet sur ce même modèle vise à explorer, par une approche électrophysiologique également, la capacité des neurones du cortex moteur primaire à traiter les informations sensorielles reçues par le cortex sensoriel primaire après stimulation et à relayer la commande motrice au striatum. De plus, une étude sur un modèle transgénique des TSA est en cours dans le but d'étudier les effets d'une mutation du gène *SHANK3* sur la motricité fine et l'anatomie du cervelet et du cortex moteur. Enfin, ma thèse fait partie d'un projet de recherche faisant intervenir deux autres laboratoires d'expertise différente, l'Institut Pprime de Poitiers, CNRS UPR 3346 (axe Robotique, BioMécanique, Sport, Santé) et le CeRCA de Poitiers, CNRS UMR 7295 (équipe EXSECO : exercice, sensorimotricité, cognition) pour des études sur les troubles de la marche et la dextérité manuelle fine chez des enfants atteints de TSA. Ces approches transversales et translationnelles ont pour objectif de modéliser la motricité de ces enfants afin d'identifier des mouvements caractéristiques qui pourraient servir au diagnostic.



# Partie 4 : Références



# A

Alarcón, M., Abrahams, B.S., Stone, J.L., Duvall, J.A., Perederiy, J.V., Bomar, J.M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C.L., Ledbetter, D.H., et al. (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 150–159.

Aldinger, K.A., Lehmann, O.J., Hudgins, L., Chizhikov, V.V., Bassuk, A.G., Ades, L.C., Krantz, I.D., Dobyns, W.B., and Millen, K.J. (2009). FOXC1 is required for normal cerebellar development and is a major contributor to chromosome 6p25.3 Dandy-Walker malformation. *Nat. Genet.* *41*, 1037–1042.

Aleman, A., Kahn, R.S., and Selten, J.-P. (2003). Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* *60*, 565–571.

Alexander, G.E. (2004). Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin. Neurosci.* *6*, 259–280.

American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)* (American Psychiatric Pub).

Andersen, B.B., and Pakkenberg, B. (2003). Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* *182*, 354–361.

Ango, F., Wu, C., Want, J.J.V. der, Wu, P., Schachner, M., and Huang, Z.J. (2008). Bergmann Glia and the Recognition Molecule CHL1 Organize GABAergic Axons and Direct Innervation of Purkinje Cell Dendrites. *PLOS Biol.* *6*, e103.

Arking, D.E., Cutler, D.J., Brune, C.W., Teslovich, T.M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E.H., et al. (2008). A Common Genetic Variant in the Neurexin Superfamily Member CNTNAP2 Increases Familial Risk of Autism. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 160–164.

Ashwood, P., Wills, S., and Van de Water, J. (2006). The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1–15.

Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., and Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain. Behav. Immun.* *25*, 40–45.

Asperger H (1944). [Die “Autistischen Psychopathen”im Kindesalter]. *117*: 76–136.

Atladóttir, H.O., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D.E., Lemcke, S., Abdallah, M., and Parner, E.T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *40*, 1423–1430.

Auyeung, B., Baron-Cohen, S., Chapman, E., Knickmeyer, R., Taylor, K., and Hackett, G. (2006). Foetal testosterone and the child systemizing quotient. *Eur. J. Endocrinol.* *155*, S123–S130.

Auyeung, B., Baron-Cohen, S., Ashwin, E., Knickmeyer, R., Taylor, K., and Hackett, G. (2009). Fetal testosterone and autistic traits. *Br. J. Psychol. Lond. Engl.* *100*, 1–22.

Azcoitia, I., Yague, J.G., and Garcia-Segura, L.M. (2011). Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* *191*, 139–147.

# B

- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., and Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* *25*, 63–77.
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., and Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain J. Neurol.* *121* ( Pt 5), 889–905.
- Baron-Cohen, S., Richler, J., Bisarya, D., Gurunathan, N., and Wheelwright, S. (2003). The systemizing quotient: an investigation of adults with Asperger syndrome or high-functioning autism, and normal sex differences. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 361–374.
- Baron-Cohen, S., Knickmeyer, R.C., and Belmonte, M.K. (2005). Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science* *310*, 819–823.
- Baronio, D., Castro, K., Gonchoroski, T., de Melo, G.M., Nunes, G.D.F., Bambini-Junior, V., Gottfried, C., and Riesgo, R. (2015). Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PloS One* *10*, e0116363.
- Bauer, A.Z., and Kriebel, D. (2013). Prenatal and perinatal analgesic exposure and autism: an ecological link. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *12*, 41.
- Bauman, M., and Kemper, T.L. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology* *35*, 866–874.
- Bennetto, L., Kuschner, E.S., and Hyman, S.L. (2007). Olfaction and taste processing in autism. *Biol. Psychiatry* *62*, 1015–1021.
- Bernier, R., Steinman, K.J., Reilly, B., Wallace, A.S., Sherr, E.H., Pojman, N., Mefford, H.C., Gerdts, J., Earl, R., Hanson, E., et al. (2016). Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genet. Med.* *18*, 341–349.
- Biamonte, F., Assenza, G., Marino, R., D’Amelio, M., Panteri, R., Caruso, D., Scurati, S., Yague, J.G., Garcia-Segura, L.M., Cesa, R., et al. (2009). Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiol. Dis.* *36*, 103–115.
- de Bilbao, F., Guarin, E., Nef, P., Vallet, P., Giannakopoulos, P., and Dubois-Dauphin, M. (1999). Postnatal distribution of cyp32/caspase 3 mRNA in the mouse central nervous system: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* *409*, 339–357.
- Bilbo, S.D., and Schwarz, J.M. (2009). Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front. Behav. Neurosci.* *3*, 14.
- Bilbo, S.D., and Schwarz, J.M. (2012). The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* *33*, 267–286.
- Bishop, D.V.M., Jacobs, P.A., Lachlan, K., Wellesley, D., Barnicoat, A., Boyd, P.A., Fryer, A., Middlemiss, P., Smithson, S., Metcalfe, K., et al. (2011). Autism, language and communication in children with sex chromosome trisomies. *Arch. Dis. Child.* *96*, 954–959.
- Bittker, S.S., and Bell, K.R. (2018). Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: an epidemiological study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* *14*, 1399–1414.

- Bohm, H.V., and Stewart, M.G. (2009). Brief report: on the concordance percentages for Autistic Spectrum Disorder of twins. *J. Autism Dev. Disord.* *39*, 806–808.
- Born, G., Grayton, H.M., Langhorst, H., Dudanova, I., Rohlmann, A., Woodward, B.W., Collier, D.A., Fernandes, C., and Missler, M. (2015). Genetic targeting of NRXN2 in mice unveils role in excitatory cortical synapse function and social behaviors. *Front. Synaptic Neurosci.* *7*, 3.
- Bostan, A.C., Dum, R.P., and Strick, P.L. (2010). The basal ganglia communicate with the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8452–8456.
- Boukhtouche, F., Janmaat, S., Vodjdani, G., Gautheron, V., Mallet, J., Dusart, I., and Mariani, J. (2006). Retinoid-Related Orphan Receptor  $\alpha$  Controls the Early Steps of Purkinje Cell Dendritic Differentiation. *J. Neurosci.* *26*, 1531–1538.
- Bouman, A., Heineman, M.J., and Faas, M.M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update* *11*, 411–423.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 551–563.
- Boyle, M.P., Bernard, A., Thompson, C.L., Ng, L., Boe, A., Mortrud, M., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., Hevner, R.F., and Lein, E.S. (2011). Cell-type-specific consequences of Reelin deficiency in the mouse neocortex, hippocampus, and amygdala. *J. Comp. Neurol.* *519*, 2061–2089.
- Brown, A.S., Begg, M.D., Gravenstein, S., Schaefer, C.A., Wyatt, R.J., Bresnahan, M., Babulas, V.P., and Susser, E.S. (2004a). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* *61*, 774–780.
- Brown, A.S., Hooton, J., Schaefer, C.A., Zhang, H., Petkova, E., Babulas, V., Perrin, M., Gorman, J.M., and Susser, E.S. (2004b). Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am. J. Psychiatry* *161*, 889–895.
- Bruining, H., Swaab, H., Kas, M., and Engeland, H. van (2009). Psychiatric Characteristics in a Self-Selected Sample of Boys With Klinefelter Syndrome. *Pediatrics* *123*, e865–e870.

## C

- Cabeza, R., Ciaramelli, E., and Moscovitch, M. (2012). Cognitive contributions of the ventral parietal cortex: an integrative theoretical account. *Trends Cogn. Sci.* *16*, 338–352.
- Cannell, J.J. (2017). Vitamin D and autism, what's new? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *18*, 183–193.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., and Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol.* *28*, 203–209.
- Carletti, B., and Rossi, F. (2008). Neurogenesis in the Cerebellum. *The Neuroscientist* *14*, 91–100.
- Carson, M.J., Thrash, J.C., and Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin. Neurosci. Res.* *6*, 237–245.

- Carter, C.J., and Blizard, R.A. (2016). Autism genes are selectively targeted by environmental pollutants including pesticides, heavy metals, bisphenol A, phthalates and many others in food, cosmetics or household products. *Neurochem. Int.* *101*, 83–109.
- Carter, R.M., and Huettel, S.A. (2013). A Nexus Model of the Temporal-Parietal Junction. *Trends Cogn. Sci.* *17*, 328–336.
- Chapman, E., Baron-Cohen, S., Auyeung, B., Knickmeyer, R., Taylor, K., and 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.
- Chauhan, A., and Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* *13*, 171–181.
- Cheh, M.A., Millonig, J.H., Roselli, L.M., Ming, X., Jacobsen, E., Kamdar, S., and Wagner, G.C. (2006). En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res.* *1116*, 166–176.
- Chen, C.H., Fremont, R., Arteaga-Bracho, E.E., and Khodakhah, K. (2014). Short latency cerebellar modulation of the basal ganglia. *Nat. Neurosci.* *17*, 1767–1775.
- Chen, S.-K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., and Capecchi, M.R. (2010). Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* *141*, 775–785.
- Chen, X.R., Heck, N., Lohof, A.M., Rochefort, C., Morel, M.-P., Wehrlé, R., Doulazmi, M., Marty, S., Cannaya, V., Avci, H.X., et al. (2013). Mature Purkinje cells require the retinoic acid-related orphan receptor- $\alpha$  (ROR $\alpha$ ) to maintain climbing fiber mono-innervation and other adult characteristics. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 9546–9562.
- Christensen, D.L. (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill. Summ.* *65*.
- Christensen, J., Grønberg, T.K., Sørensen, M.J., Schendel, D., Parner, E.T., Pedersen, L.H., and Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* *309*, 1696–1703.
- Christianson, A.L., Chesler, N., and Kromberg, J.G. (1994). Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Dev. Med. Child Neurol.* *36*, 361–369.
- Clower, D.M., Dum, R.P., and Strick, P.L. (2005). Basal ganglia and cerebellar inputs to “AIP.” *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *15*, 913–920.
- Corradini, I., Focchi, E., Rasile, M., Morini, R., Desiato, G., Tomasoni, R., Lizier, M., Ghirardini, E., Fesce, R., Morone, D., et al. (2018). Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biol. Psychiatry* *83*, 680–691.
- Corrales, J.D., Rocco, G.L., Blaess, S., Guo, Q., and Joyner, A.L. (2004). Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 5581–5590.
- Corrales, J.D., Blaess, S., Mahoney, E.M., and Joyner, A.L. (2006). The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* *133*, 1811–1821.
- Courchesne, E. (1997a). Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 269–278.

Courchesne, E. (1997b). Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 269–278.

Courchesne, E., Saitoh, O., Yeung-Courchesne, R., Press, G.A., Lincoln, A.J., Haas, R.H., and Schreibman, L. (1994). Abnormality of cerebellar vermal lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hypoplastic and hyperplastic subgroups with MR imaging. *AJR Am. J. Roentgenol.* 162, 123–130.

Courchesne, E., Mouton, P.R., Calhoun, M.E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M.J., Barnes, C.C., and Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA* 306, 2001–2010.

Crawley, J.N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 10, 248–258.

Crepel, F., Mariani, J., and Delhaye-Bouchaud, N. (1976). Evidence for a multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the immature rat cerebellum. *J. Neurobiol.* 7, 567–578.

Creswell, C.S., and Skuse, D.H. (1999). Autism in association with Turner syndrome: Genetic implications for male vulnerability to pervasive developmental disorders. *Neurocase* 5, 511–518.

Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2015). More than a gut feeling: the microbiota regulates neurodevelopment and behavior. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 40, 241–242.

Cunningham, C.L., Martínez-Cerdeño, V., and Noctor, S.C. (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 4216–4233.

Cutuli, D. (2017). Functional and Structural Benefits Induced by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids During Aging. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 534–542.

Czeh, M., Gressens, P., and Kaindl, A.M. (2011). The yin and yang of microglia. *Dev. Neurosci.* 33, 199–209.

## D

Dachtler, J., Glasper, J., Cohen, R.N., Ivorra, J.L., Swiffen, D.J., Jackson, A.J., Harte, M.K., Rodgers, R.J., and Clapcote, S.J. (2014). Deletion of  $\alpha$ -neurexin II results in autism-related behaviors in mice. *Transl. Psychiatry* 4, e484.

Dalla, C., Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Balthazart, J., and Bakker, J. (2004). Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology. *Eur. J. Neurosci.* 20, 217–228.

Dastjerdi, F.V., Consalez, G.G., and Hawkes, R. (2012). Pattern formation during development of the embryonic cerebellum. *Front. Neuroanat.* 6, 10.

De Angelis, M., Francavilla, R., Piccolo, M., De Giacomo, A., and Gobbetti, M. (2015). Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* 6, 207–213.

- De Smet, H.J., Paquier, P., Verhoeven, J., and Mariën, P. (2013). The cerebellum: Its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain Lang.* *127*, 334–342.
- Dean, C., and Dresbach, T. (2006). Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci.* *29*, 21–29.
- Deckelbaum, R.J., Worgall, T.S., and Seo, T. (2006). n-3 fatty acids and gene expression. *Am. J. Clin. Nutr.* *83*, 1520S-1525S.
- Delerive, P., Monté, D., Dubois, G., Trottein, F., Fruchart-Najib, J., Mariani, J., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2001). The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* *2*, 42–48.
- DeLong, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* *13*, 281–285.
- DeLorey, T.M., Sahbaie, P., Hashemi, E., Homanics, G.E., and Clark, J.D. (2008). *Gabrb3* gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* *187*, 207–220.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S.B.G., Guyenet, P.G., and Kipnis, J. (2012). Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* *484*, 105–109.
- Deth, R., Muratore, C., Benzecry, J., Power-Charnitsky, V.-A., and Waly, M. (2008). How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology* *29*, 190–201.
- D'Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., Cardi, E., and Giardini, O. (1996). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* *1992* *85*, 1076–1079.
- Deverman, B.E., and Patterson, P.H. (2009). Cytokines and CNS development. *Neuron* *64*, 61–78.
- Dickerson, D.D., and Bilkey, D.K. (2013). Aberrant neural synchrony in the maternal immune activation model: using translatable measures to explore targeted interventions. *Front. Behav. Neurosci.* *7*, 217.
- D'Mello, A.M., and Stoodley, C.J. (2015). Cerebro-cerebellar circuits in autism spectrum disorder. *Front. Neurosci.* *9*.
- Dölen, G., Osterweil, E., Rao, B.S.S., Smith, G.B., Auerbach, B.D., Chattarji, S., and Bear, M.F. (2007). Correction of Fragile X Syndrome in Mice. *Neuron* *56*, 955–962.
- Duffney, L.J., Zhong, P., Wei, J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., Ma, K., Dietz, D.M., Kajiwara, Y., Buxbaum, J.D., et al. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep.* *11*, 1400–1413.
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsäter, H., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* *39*, 25–27.
- Durkin, M.S., Maenner, M.J., Newschaffer, C.J., Lee, L.-C., Cunniff, C.M., Daniels, J.L., Kirby, R.S., Leavitt, L., Miller, L., Zahorodny, W., et al. (2008). Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. *Am. J. Epidemiol.* *168*, 1268–1276.

Durkin, M.S., Maenner, M.J., Meaney, F.J., Levy, S.E., DiGuseppi, C., Nicholas, J.S., Kirby, R.S., Pinto-Martin, J.A., and Schieve, L.A. (2010). Socioeconomic inequality in the prevalence of autism spectrum disorder: evidence from a U.S. cross-sectional study. *PLoS One* 5, e11551.

## E

Ellerman, J.M., Flament, D., Kim, S.G., Fu, Q.G., Merkle, H., Ebner, T.J., and Uğurbil, K. (1994). Spatial patterns of functional activation of the cerebellum investigated using high field (4 T) MRI. *NMR Biomed.* 7, 63–68.

Erny, D., Hrabě de Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahoi, T., Jakobshagen, K., Buch, T., et al. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.* 18, 965–977.

de Esch, C.E.F., van den Berg, W.E., Buijsen, R. a. M., Jaafar, I.A., Nieuwenhuizen-Bakker, I.M., Gasparini, F., Kushner, S.A., and Willemsen, R. (2015). Fragile X mice have robust mGluR5-dependent alterations of social behaviour in the Automated Tube Test. *Neurobiol. Dis.* 75, 31–39.

Espinosa, J.S., and Luo, L. (2008). Timing Neurogenesis and Differentiation: Insights from Quantitative Clonal Analyses of Cerebellar Granule Cells. *J. Neurosci.* 28, 2301–2312.

Estes, A., Shaw, D.W.W., Sparks, B.F., Friedman, S., Giedd, J.N., Dawson, G., Bryan, M., and Dager, S.R. (2011). Basal ganglia morphometry and repetitive behavior in young children with autism spectrum disorder. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* 4, 212–220.

Etherton, M.R., Blaiss, C.A., Powell, C.M., and Südhof, T.C. (2009). Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17998–18003.

## F

Fahrion, J.K., Komuro, Y., Li, Y., Ohno, N., Littner, Y., Raoult, E., Galas, L., Vaudry, D., and Komuro, H. (2012). Rescue of neuronal migration deficits in a mouse model of fetal Minamata disease by increasing neuronal Ca<sup>2+</sup> spike frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5057–5062.

Fan, H., Favero, M., and Vogel, M.W. (2001). Elimination of bax expression in mice increases cerebellar purkinje cell numbers but not the number of granule cells. *J. Comp. Neurol.* 436, 82–91.

Farber, N.B., Jiang, X.-P., Heinkel, C., and Nemmers, B. (2002). Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage-gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol. Psychiatry* 7, 726–733.

Fatemi, S.H., Snow, A.V., Stary, J.M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T.J., Lee, S., Brooks, A.I., and Pearce, D.A. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biol. Psychiatry* 57, 777–787.

Fatemi, S.H., Reutiman, T.J., Folsom, T.D., Huang, H., Oishi, K., Mori, S., Smee, D.F., Pearce, D.A., Winter, C., Sohr, R., et al. (2008). Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain

atrophy in mouse offspring: Implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr. Res.* 99, 56–70.

Felten D, Shetty A (2009). *Netter's Atlas of Neuroscience - 2nd Edition*.

Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook, E.H., Skinner, C., Schwartz, C.E., and Sommer, S.S. (2006). High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci. Lett.* 409, 10–13.

Fernandez, T., Morgan, T., Davis, N., Klin, A., Morris, A., Farhi, A., Lifton, R.P., and State, M.W. (2004). Disruption of contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1286–1293.

Fombonne, E. (2003). Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J. Autism Dev. Disord.* 33, 365–382.

Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr. Res.* 65, 591–598.

Frings, M., Dimitrova, A., Schorn, C.F., Elles, H.-G., Hein-Kropp, C., Gizewski, E.R., Diener, H.C., and Timmann, D. (2006). Cerebellar involvement in verb generation: an fMRI study. *Neurosci. Lett.* 409, 19–23.

## G

Gandal, M.J., Edgar, J.C., Ehrlichman, R.S., Mehta, M., Roberts, T.P.L., and Siegel, S.J. (2010). Validating  $\gamma$  oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol. Psychiatry* 68, 1100–1106.

Gardener, H., Spiegelman, D., and Buka, S.L. (2009). Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 195, 7–14.

Gatto, C.L., and Broadie, K. (2010). Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 4.

Geier, D.A., and Geier, M.R. (2007). A prospective assessment of androgen levels in patients with autistic spectrum disorders: biochemical underpinnings and suggested therapies. 9.

Gerfen, C.R. (1988). Synaptic organization of the striatum. *J. Electron Microsc. Tech.* 10, 265–281.

Ghanizadeh, A. (2012). Co-morbidity and factor analysis on attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder DSM-IV-derived items. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 17, 368–372.

Gharani, N., Benayed, R., Mancuso, V., Brzustowicz, L.M., and Millonig, J.H. (2004). Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* 9, 474–484.

Ghaziuddin, M., and Butler, E. (1998). Clumsiness in autism and Asperger syndrome: a further report. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* 42 ( Pt 1), 43–48.

Glessner, J.T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C.E., Wood, S., Zhang, H., Estes, A., Brune, C.W., Bradfield, J.P., et al. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459, 569–573.

Goines, P.E., and Ashwood, P. (2013). Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. *Neurotoxicol. Teratol.* 36, 67–81.

Goldman, S.E., Surdyka, K., Cuevas, R., Adkins, K., Wang, L., and Malow, B.A. (2009). Defining the Sleep Phenotype in Children with Autism. *Dev. Neuropsychol.* 34, 560–573.

Goswami, J., Martin, L.A., Goldowitz, D., Beitz, A.J., and Feddersen, R.M. (2005). Enhanced Purkinje cell survival but compromised cerebellar function in targeted anti-apoptotic protein transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 202–221.

Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20, 6969–6978.

Grillner, S. (2015). Action: the role of motor cortex challenged. *Curr. Biol.* CB 25, R508-511.

Groves, N.J., McGrath, J.J., and Burne, T.H.J. (2014). Vitamin D as a neurosteroid affecting the developing and adult brain. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 117–141.

Gurvich, N., Tsygankova, O.M., Meinkoth, J.L., and Klein, P.S. (2004). Histone Deacetylase Is a Target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation. *Cancer Res.* 64, 1079–1086.

## H

Haggarty, P. (2004). Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 1559–1570.

Haldipur, P., Gillies, G.S., Janson, O.K., Chizhikov, V.V., Mithal, D.S., Miller, R.J., and Millen, K.J. (2014). *Foxc1* dependent mesenchymal signalling drives embryonic cerebellar growth. *ELife* 3.

Haldipur, P., Dang, D., Aldinger, K.A., Janson, O.K., Guimiot, F., Adle-Biasette, H., Dobyns, W.B., Siebert, J.R., Russo, R., and Millen, K.J. (2017). Phenotypic outcomes in Mouse and Human *Foxc1* dependent Dandy-Walker cerebellar malformation suggest shared mechanisms. *ELife* 6.

Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.

Hara, Y., Takuma, K., Takano, E., Katashiba, K., Taruta, A., Higashino, K., Hashimoto, H., Ago, Y., and Matsuda, T. (2015). Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. *Behav. Brain Res.* 289, 39–47.

Hashimoto, K., and Kano, M. (2013). Synapse elimination in the developing cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 4667–4680.

Hashimoto, K., Yoshida, T., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, M., and Kano, M. (2009). Influence of parallel fiber–Purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber–Purkinje cell synapses in the cerebellum. *Neuroscience* 162, 601–611.

- Hautecouverture, S., Limosin, F., and Rouillon, F. (2006). Épidémiologie des troubles schizophréniques. *Presse Médicale* 35, 461–468.
- Heimer, L., and Van Hoesen, G.W. (2006). The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 126–147.
- Herbert, M.R. (2010). Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 103–110.
- Hill, R.A., McInnes, K.J., Gong, E.C.H., Jones, M.E.E., Simpson, E.R., and Boon, W.C. (2007). Estrogen deficient male mice develop compulsive behavior. *Biol. Psychiatry* 61, 359–366.
- Hilton, C., Wentz, L., LaVesser, P., Ito, M., Reed, C., and Herzberg, G. (2007). Relationship between motor skill impairment and severity in children with Asperger syndrome. *Res. Autism Spectr. Disord.* 1, 339–349.
- Hirvikoski, T., Mittendorfer-Rutz, E., Boman, M., Larsson, H., Lichtenstein, P., and Bölte, S. (2016). Premature mortality in autism spectrum disorder. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 208, 232–238.
- Ho, A.K., Sahakian, B.J., Brown, R.G., Barker, R.A., Hodges, J.R., Ané, M.-N., Snowden, J., Thompson, J., Esmonde, T., Gentry, R., et al. (2003). Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology* 61, 1702–1706.
- Hofvander, B., Delorme, R., Chaste, P., Nydén, A., Wentz, E., Ståhlberg, O., Herbrecht, E., Stopin, A., Anckarsäter, H., Gillberg, C., et al. (2009). Psychiatric and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. *BMC Psychiatry* 9, 35.
- Hogart, A., Nagarajan, R.P., Patzel, K.A., Yasui, D.H., and LaSalle, J.M. (2007). 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.* 16, 691–703.
- Homanics, G.E., DeLorey, T.M., Firestone, L.L., Quinlan, J.J., Handforth, A., Harrison, N.L., Krasowski, M.D., Rick, C.E., Korpi, E.R., Mäkelä, R., et al. (1997). Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4143–4148.
- Hommer, R.E., and Swedo, S.E. (2015). Schizophrenia and autism-related disorders. *Schizophr. Bull.* 41, 313–314.
- Hoshi, E., Tremblay, L., Féger, J., Carras, P.L., and Strick, P.L. (2005). The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat. Neurosci.* 8, 1491–1493.
- Hosokawa, M., Nakadoi, Y., Watanabe, Y., Sumitani, S., and Ohmori, T. (2015). Association of autism tendency and hemodynamic changes in the prefrontal cortex during facial expression stimuli measured by multi-channel near-infrared spectroscopy. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 69, 145–152.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., et al. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451–1463.
- Hu, V.W., Sarachana, T., Sherrard, R.M., and Kocher, K.M. (2015). Investigation of sex differences in the expression of RORA and its transcriptional targets in the brain as a potential contributor to the sex bias in autism. *Mol. Autism* 6.

Huang, T.-N., Chuang, H.-C., Chou, W.-H., Chen, C.-Y., Wang, H.-F., Chou, S.-J., and Hsueh, Y.-P. (2014). *Tbr1* haploinsufficiency impairs amygdalar axonal projections and results in cognitive abnormality. *Nat. Neurosci.* *17*, 240–247.

Huguet, G., Ey, E., and Bourgeron, T. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *14*, 191–213.

Hui, C.W., St-Pierre, A., El Hajj, H., Remy, Y., Hébert, S.S., Luheshi, G.N., Srivastava, L.K., and Tremblay, M.-È. (2018). Prenatal Immune Challenge in Mice Leads to Partly Sex-Dependent Behavioral, Microglial, and Molecular Abnormalities Associated with Schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.* *11*.

## I

Ichinohe, N., Mori, F., and Shoumura, K. (2000). A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat. *Brain Res.* *880*, 191–197.

Igelström, K.M., Webb, T.W., and Graziano, M.S.A. (2017). Functional Connectivity Between the Temporoparietal Cortex and Cerebellum in Autism Spectrum Disorder. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *27*, 2617–2627.

## J

Jack, A., and Morris, J.P. (2014). Neocerebellar contributions to social perception in adolescents with autism spectrum disorder. *Dev. Cogn. Neurosci.* *10*, 77–92.

Jahanshahi, M., Obeso, I., Rothwell, J.C., and Obeso, J.A. (2015). A fronto–striato–subthalamic–pallidal network for goal-directed and habitual inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 719–732.

Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Söderström, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., et al. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* *34*, 27–29.

Jankowski, J., Miething, A., Schilling, K., and Baader, S.L. (2009). Physiological Purkinje Cell Death Is Spatiotemporally Organized in the Developing Mouse Cerebellum. *The Cerebellum* *8*, 277–290.

Jeong, E.J., Yu, W.-J., Kim, C.-Y., and Chung, M.-K. (2010). Placenta transfer and toxicokinetics of valproic Acid in pregnant cynomolgus monkeys. *Toxicol. Res.* *26*, 275–283.

Joyal, C.C., Pennanen, C., Tiihonen, E., Laakso, M.P., Tiihonen, J., and Aronen, H.J. (2004). MRI volumetry of the vermis and the cerebellar hemispheres in men with schizophrenia. *Psychiatry Res.* *131*, 115–124.

Jung, A.-R., Kim, T.W., Rhyu, I.J., Kim, H., Lee, Y.D., Vinsant, S., Oppenheim, R.W., and Sun, W. (2008). Misplacement of Purkinje cells during postnatal development in *Bax* knock-out mice: a novel role for programmed cell death in the nervous system? *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 2941–2948.

# K

- Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet* 386, 896–912.
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr.* 35, 100–136.
- Kaur, K., Chauhan, V., Gu, F., and Chauhan, A. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. *Free Radic. Biol. Med.* 76, 25–33.
- Kaur, M., M Srinivasan, S., and N Bhat, A. (2018). Comparing motor performance, praxis, coordination, and interpersonal synchrony between children with and without Autism Spectrum Disorder (ASD). *Res. Dev. Disabil.* 72, 79–95.
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 4908–4923.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., and Emson, P.C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 10, 3421–3438.
- Kawai, R., Markman, T., Poddar, R., Ko, R., Fantana, A.L., Dhawale, A.K., Kampff, A.R., and Ölveczky, B.P. (2015). Motor Cortex Is Required for Learning but Not for Executing a Motor Skill. *Neuron* 86, 800–812.
- Kelly, R.M., and Strick, P.L. (2003). Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8432–8444.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Khan, A.J., Nair, A., Keown, C.L., Datko, M.C., Lincoln, A.J., and Müller, R.-A. (2015). Cerebro-cerebellar resting state functional connectivity in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Biol. Psychiatry* 78, 625–634.
- Kim, J.-W., Seung, H., Kwon, K.J., Ko, M.J., Lee, E.J., Oh, H.A., Choi, C.S., Kim, K.C., Gonzales, E.L., You, J.S., et al. (2014a). Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PLoS One* 9, e104927.
- Kim, K.C., Lee, D.-K., Go, H.S., Kim, P., Choi, C.S., Kim, J.-W., Jeon, S.J., Song, M.-R., and Shin, C.Y. (2014b). Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring. *Mol. Neurobiol.* 49, 512–528.
- Kim, Y.S., Leventhal, B.L., Koh, Y.-J., Fombonne, E., Laska, E., Lim, E.-C., Cheon, K.-A., Kim, S.-J., Kim, Y.-K., Lee, H., et al. (2011). Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am. J. Psychiatry* 168, 904–912.
- King, B.H., Hollander, E., Sikich, L., McCracken, J.T., Scahill, L., Bregman, J.D., Donnelly, C.L., Anagnostou, E., Dukes, K., Sullivan, L., et al. (2009). Lack of Efficacy of Citalopram in Children With Autism Spectrum Disorders and High Levels of Repetitive Behavior: Citalopram Ineffective in Children With Autism. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 583–590.

Kirsten, T.B., Lippi, L.L., Bevilacqua, E., and Bernardi, M.M. (2013). LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One* 8, e82244.

Knickmeyer, R., Baron-Cohen, S., Raggatt, P., and Taylor, K. (2005). Foetal testosterone, social relationships, and restricted interests in children. *J. Child Psychol. Psychiatry* 46, 198–210.

Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S.A., Bodmer, M., Hellings, J.A., Toovey, S., and Prinssen, E.P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 643–660.

Kopmels, B., Mariani, J., Delhaye-Bouchaud, N., Audibert, F., Fradelizi, D., and Wollman, E.E. (1992). Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J. Neurochem.* 58, 192–199.

Kreczmanski, P., Heinsen, H., Mantua, V., Woltersdorf, F., Masson, T., Ulfing, N., Schmidt-Kastner, R., Korr, H., Steinbusch, H.W.M., Hof, P.R., et al. (2007). Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia. *Brain* 130, 678–692.

Kreitzer, A.C. (2009). Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 127–147.

Kumar, R.A., Sudi, J., Babatz, T.D., Brune, C.W., Oswald, D., Yen, M., Nowak, N.J., Cook, E.H., Christian, S.L., and Dobyns, W.B. (2010). A de novo 1p34.2 microdeletion identifies the synaptic vesicle gene RIMS3 as a novel candidate for autism. *J. Med. Genet.* 47, 81–90.

## L

La Malfa, G., Lassi, S., Bertelli, M., Salvini, R., and Placidi, G.F. (2004). Autism and intellectual disability: a study of prevalence on a sample of the Italian population. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* 48, 262–267.

Labrousse, V.F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Grégoire, S., Bretillon, L., and Layé, S. (2012). Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 7, e36861.

Laforce, R., and Doyon, J. (2001). Distinct contribution of the striatum and cerebellum to motor learning. *Brain Cogn.* 45, 189–211.

Laforce, R., and Doyon, J. (2002). Differential role for the striatum and cerebellum in response to novel movements using a motor learning paradigm. *Neuropsychologia* 40, 512–517.

Lampi, K.M., Lehtonen, L., Tran, P.L., Suominen, A., Lehti, V., Banerjee, P.N., Gissler, M., Brown, A.S., and Sourander, A. (2012). Risk of Autism Spectrum Disorders in Low Birth Weight and Small for Gestational Age Infants. *J. Pediatr.* 161, 830–836.

Langen, M., Bos, D., Noordermeer, S.D.S., Nederveen, H., van Engeland, H., and Durston, S. (2014). Changes in the development of striatum are involved in repetitive behavior in autism. *Biol. Psychiatry* 76, 405–411.

- Layé, S. (2010). Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 82, 295–303.
- Levitt, J.J., McCarley, R.W., Nestor, P.G., Petrescu, C., Donnino, R., Hirayasu, Y., Kikinis, R., Jolesz, F.A., and Shenton, M.E. (1999). Quantitative volumetric MRI study of the cerebellum and vermis in schizophrenia: clinical and cognitive correlates. *Am. J. Psychiatry* 156, 1105–1107.
- Liang, J.-S., Shimojima, K., Ohno, K., Sugiura, C., Une, Y., Ohno, K., and Yamamoto, T. (2009). A newly recognised microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behaviour, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2 Mb deletion. *J. Med. Genet.* 46, 645–647.
- Liu, W.S., Pesold, C., Rodriguez, M.A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Larson, J., Condie, B.G., Guidotti, A., and Costa, E. (2001). Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3477–3482.
- Liu, X., Malenfant, P., Reesor, C., Lee, A., Hudson, M.L., Harvard, C., Qiao, Y., Persico, A.M., Cohen, I.L., Chudley, A.E., et al. (2011). 2p15-p16.1 microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 19, 1264–1270.
- Ljungberg, M.C., Sunnen, C.N., Lugo, J.N., Anderson, A.E., and D’Arcangelo, G. (2009). Rapamycin suppresses seizures and neuronal hypertrophy in a mouse model of cortical dysplasia. *Dis. Model. Mech.* 2, 389–398.
- Lombardo, M.V., Ashwin, E., Auyeung, B., Chakrabarti, B., Taylor, K., Hackett, G., Bullmore, E.T., and Baron-Cohen, S. (2012). Fetal Testosterone Influences Sexually Dimorphic Gray Matter in the Human Brain. *J. Neurosci.* 32, 674–680.
- Loomes, R., Hull, L., and Mandy, W.P.L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 56, 466–474.
- Löscher, W. (1989). Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra. *Brain Res.* 501, 198–203.
- Löscher, W. (1999). The discovery of valproate. In *Valproate*, W. Löscher, ed. (Basel: Birkhäuser Basel), pp. 1–3.
- Löscher, W., Böhme, G., Schäfer, H., and Kochen, W. (1981). Effect of metabolites of valproic acid on the metabolism of GABA in brain and brain nerve endings. *Neuropharmacology* 20, 1187–1192.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Lyall, K., Munger, K.L., O’Reilly, É.J., Santangelo, S.L., and Ascherio, A. (2013). Maternal dietary fat intake in association with autism spectrum disorders. *Am. J. Epidemiol.* 178, 209–220.

# M

- Ma, K., Qin, L., Matas, E., Duffney, L.J., Liu, A., and Yan, Z. (2018). Histone deacetylase inhibitor MS-275 restores social and synaptic function in a Shank3-deficient mouse model of autism. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*
- Mabunga, D.F.N., Gonzales, E.L.T., Kim, J., Kim, K.C., and Shin, C.Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp. Neurobiol.* *24*, 285.
- Macrì, S., Biamonte, F., Romano, E., Marino, R., Keller, F., and Laviola, G. (2010). Perseverative responding and neuroanatomical alterations in adult heterozygous reeler mice are mitigated by neonatal estrogen administration. *Psychoneuroendocrinology* *35*, 1374–1387.
- Maenner, M.J., Rice, C.E., Arneson, C.L., Cunniff, C., Schieve, L.A., Carpenter, L.A., Van Naarden Braun, K., Kirby, R.S., Bakian, A.V., and Durkin, M.S. (2014). Potential impact of DSM-5 criteria on autism spectrum disorder prevalence estimates. *JAMA Psychiatry* *71*, 292–300.
- de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Frolli, A., Iardino, P., Carteni, M., De Rosa, M., Francavilla, R., Riegler, G., et al. (2010). Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *51*, 418–424.
- Magnuson, K.M., and Constantino, J.N. (2011). Characterization of Depression in Children with Autism Spectrum Disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* *32*, 332–340.
- Main, S.L., and Kulesza, R.J. (2017). Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience* *340*, 34–47.
- Maloku, E., Covelo, I.R., Hanbauer, I., Guidotti, A., Kadriu, B., Hu, Q., Davis, J.M., and Costa, E. (2010). Lower number of cerebellar Purkinje neurons in psychosis is associated with reduced reelin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4407–4411.
- Mankad, D., Dupuis, A., Smile, S., Roberts, W., Brian, J., Lui, T., Genore, L., Zaghoul, D., Iaboni, A., Marcon, P.M.A., et al. (2015). A randomized, placebo controlled trial of omega-3 fatty acids in the treatment of young children with autism. *Mol. Autism* *6*.
- Mariani, J., Crepel, F., Mikoshiba, K., Changeux, J.P., and Sotelo, C. (1977). Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *281*, 1–28.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., Rooijen, N. van, and Mallat, M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron* *41*, 535–547.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 793–807.
- Marshall, C.R., Noor, A., Vincent, J.B., Lionel, A.C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., et al. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 477–488.
- Mathews, M., Gratz, S., Adetunji, B., George, V., Mathews, M., and Basil, B. (2005). Antipsychotic-induced movement disorders: evaluation and treatment. *Psychiatry Edgmont Pa Townsh.* *2*, 36–41.

- Mazina, V., Gerds, J., Trinh, S., Ankenman, K., Ward, T., Dennis, M.Y., Girirajan, S., Eichler, E.E., and Bernier, R. (2015). Interactive effects of copy number variation and maternal infection on autism impairment. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* 36, 61.
- McCarthy, M.M. (2016). Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 361–372.
- McCarthy, M.M., Todd, B.J., and Amateau, S.K. (2003). Estradiol modulation of astrocytes and the establishment of sex differences in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 283–297.
- McCarthy, M.M., Auger, A.P., Bale, T.L., De Vries, G.J., Dunn, G.A., Forger, N.G., Murray, E.K., Nugent, B.M., Schwarz, J.M., and Wilson, M.E. (2009). The Epigenetics of Sex Differences in the Brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 12815–12823.
- McElhanon, B.O., McCracken, C., Karpen, S., and Sharp, W.G. (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics* 133, 872–883.
- McGeorge, A.J., and Faull, R.L.M. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29, 503–537.
- Medina, J.F., Christopher Repa, J., Mauk, M.D., and LeDoux, J.E. (2002). Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 122–131.
- Meyer, U. (2014). Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol. Psychiatry* 75, 307–315.
- Meyer, U., Feldon, J., and Fatemi, S.H. (2009). In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 1061–1079.
- Meyer, U., Knuesel, I., Nyffeler, M., and Feldon, J. (2010). Chronic clozapine treatment improves prenatal infection-induced working memory deficits without influencing adult hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology (Berl.)* 208, 531–543.
- Meyer, U., Feldon, J., and Dammann, O. (2011). Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr. Res.* 69, 26R–33R.
- Middleton, F.A., and Strick, P.L. (2001). Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 700–712.
- Millen, K.J., Wurst, W., Herrup, K., and Joyner, A.L. (1994). Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 120, 695–706.
- Miller, D.T., Shen, Y., Weiss, L.A., Korn, J., Anselm, I., Bridgemohan, C., Cox, G.F., Dickinson, H., Gentile, J., Harris, D.J., et al. (2009). Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet.* 46, 242–248.
- Ming, X., Brimacombe, M., and Wagner, G.C. (2007). Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain Dev.* 29, 565–570.
- Mink, J.W. (1996). THE BASAL GANGLIA: FOCUSED SELECTION AND INHIBITION OF COMPETING MOTOR PROGRAMS. *Prog. Neurobiol.* 50, 381–425.
- Miyamoto, A., Wake, H., Moorhouse, A.J., and Nabekura, J. (2013). Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front. Cell. Neurosci.* 7.

Moessner, R., Marshall, C.R., Sutcliffe, J.S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B., Roberts, W., Szatmari, P., et al. (2007). Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 1289–1297.

Moldrich, R.X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N., and Reutens, D.C. (2013). Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav. Brain Res.* *257*, 253–264.

Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A.-L., Evrard, P., Gressens, P., and Verney, C. (2007). Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *66*, 372–382.

Monti, B., Polazzi, E., and Contestabile, A. (2009). Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr. Mol. Pharmacol.* *2*, 95–109.

Moore, S.J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D.J., Montgomery, T., and Dean, J.C. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J. Med. Genet.* *37*, 489–497.

Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., and Everall, I.P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol. Psychiatry* *68*, 368–376.

Mostofsky, S.H., Powell, S.K., Simmonds, D.J., Goldberg, M.C., Caffo, B., and Pekar, J.J. (2009). Decreased connectivity and cerebellar activity in autism during motor task performance. *Brain J. Neurol.* *132*, 2413–2425.

Moulton, E.A., Elman, I., Pendse, G., Schmahmann, J., Becerra, L., and Borsook, D. (2011). Aversion-related Circuitry in the Cerebellum: Responses to Noxious Heat and Unpleasant Images. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 3795–3804.

Mugnaini, E. (1970). The relation between cytogenesis and the formation of different types of synaptic contact. *Brain Res.* *17*, 169–179.

Muhle, R., Trentacoste, S.V., and Rapin, I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics* *113*, e472-486.

Murakami, J.W., Courchesne, E., Press, G.A., Yeung-Courchesne, R., and Hesselink, J.R. (1989). Reduced cerebellar hemisphere size and its relationship to vermal hypoplasia in autism. *Arch. Neurol.* *46*, 689–694.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., Veer, C. van't, Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., et al. (2000). Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *J. Immunol.* *164*, 5998–6004.

## N

Na, J., Kakei, S., and Shinoda, Y. (1997). Cerebellar input to corticothalamic neurons in layers V and VI in the motor cortex. *Neurosci. Res.* *28*, 77–91.

Nakayama, H., Miyazaki, T., Kitamura, K., Hashimoto, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Sakimura, K., Watanabe, M., and Kano, M. (2012). GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384–396.

Napoli, E., Hung, C., Wong, S., and Giulivi, C. (2013). Toxicity of the flame-retardant BDE-49 on brain mitochondria and neuronal progenitor striatal cells enhanced by a PTEN-deficient background. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 132, 196–210.

Naviaux, R.K., Zolkipli, Z., Wang, L., Nakayama, T., Naviaux, J.C., Le, T.P., Schuchbauer, M.A., Rogac, M., Tang, Q., Dugan, L.L., et al. (2013). Antipurinergic Therapy Corrects the Autism-Like Features in the Poly(IC) Mouse Model. *PLoS ONE* 8.

Nebel, M.B., Joel, S.E., Muschelli, J., Barber, A.D., Caffo, B.S., Pekar, J.J., and Mostofsky, S.H. (2014). Disruption of Functional Organization Within the Primary Motor Cortex in Children With Autism. *Hum. Brain Mapp.* 35, 567–580.

Nemirovsky, S.I., Córdoba, M., Zaiat, J.J., Completa, S.P., Vega, P.A., González-Morón, D., Medina, N.M., Fabbro, M., Romero, S., Brun, B., et al. (2015). Whole genome sequencing reveals a de novo SHANK3 mutation in familial autism spectrum disorder. *PloS One* 10, e0116358.

Nestler, E.J., and Hyman, S.E. (2010). Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Nat. Neurosci.* 13, 1161–1169.

Nguyen, A., Rauch, T.A., Pfeifer, G.P., and Hu, V.W. (2010). Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain. *FASEB J.* 24, 3036–3051.

Nickols, H.H., and Conn, P.J. (2014). Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol. Dis.* 61.

## O

Oberdick, J., Smeyne, R., Mann, Zackson, S., and Morgan, J. (1990). A promoter that drives transgene expression in cerebellar Purkinje and retinal bipolar neurons. *Science* 248, 223–226.

Offenbacher, S., Riché, E.L., Barros, S.P., Bobetsis, Y.A., Lin, D., and Beck, J.D. (2005). Effects of maternal *Campylobacter rectus* infection on murine placenta, fetal and neonatal survival, and brain development. *J. Periodontol.* 76, 2133–2143.

Okugawa, G., Sedvall, G., Nordström, M., Andreasen, N., Pierson, R., Magnotta, V., and Agartz, I. (2002). Selective reduction of the posterior superior vermis in men with chronic schizophrenia. *Schizophr. Res.* 55, 61–67.

Okugawa, G., Sedvall, G.C., and Agartz, I. (2003). Smaller cerebellar vermis but not hemisphere volumes in patients with chronic schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 160, 1614–1617.

Ooi, Y.P., Weng, S.-J., Jang, L.Y., Low, L., Seah, J., Teo, S., Ang, R.P., Lim, C.G., Liew, A., Fung, D.S., et al. (2015). Omega-3 fatty acids in the management of autism spectrum disorders: findings from an open-label pilot study in Singapore. *Eur. J. Clin. Nutr.* 69, 969–971.

Ornoy, A. (2009). Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 28, 1–10.

O’Tuathaigh, C.M.P., Babovic, D., O’Sullivan, G.J., Clifford, J.J., Tighe, O., Croke, D.T., Harvey, R., and Waddington, J.L. (2007). Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with ‘knockout’ of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. *Neuroscience* 147, 18–27.

Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H., and Iyo, M. (2006). Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 59, 546–554.

## P

Pagnamenta, A.T., Wing, K., Sadighi Akha, E., Knight, S.J.L., Bölte, S., Schmötzer, G., Duketis, E., Poustka, F., Klauck, S.M., Poustka, A., et al. (2009). A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17, 687–692.

Palay, S.L., and Chan-Palay, V. (1974). *Cerebellar Cortex: Cytology and Organization* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458.

Papaioannou, V.E. (2014). The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Dev. Camb. Engl.* 141, 3819–3833.

Parent, A., and Hazrati, L.-N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* 20, 91–127.

Pastorino, J.G., Chen, S.-T., Tafani, M., Snyder, J.W., and Farber, J.L. (1998). The Overexpression of Bax Produces Cell Death upon Induction of the Mitochondrial Permeability Transition. *J. Biol. Chem.* 273, 7770–7775.

Patterson, P.H. (2009). Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. *Behav. Brain Res.* 204, 313–321.

Patterson, P.H. (2011). MATERNAL INFECTION AND IMMUNE INVOLVEMENT IN AUTISM. *Trends Mol. Med.* 17, 389.

Peça, J., Ting, J., and Feng, G. (2011). SnapShot: Autism and the synapse. *Cell* 147, 706, 706.e1.

Peralta, V., Campos, M.S., De Jalón, E.G., and Cuesta, M.J. (2010). Motor behavior abnormalities in drug-naïve patients with schizophrenia spectrum disorders. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 25, 1068–1076.

Perera, F., and Herbstman, J. (2011). Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 31, 363–373.

Perez-Pouchoulen, M., Miquel, M., Saft, P., Brug, B., Toledo, R., Hernandez, M.E., and Manzo, J. (2016). Prenatal exposure to sodium valproate alters androgen receptor expression in the developing

cerebellum in a region and age specific manner in male and female rats. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 53, 46–52.

Persico, A.M., and Napolioni, V. (2013). Autism genetics. *Behav. Brain Res.* 251, 95–112.

Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., and Klein, P.S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741.

Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S., et al. (2010). Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. *Nature* 466, 368–372.

Politi, P., Cena, H., Comelli, M., Marrone, G., Allegri, C., Emanuele, E., and Ucelli di Nemi, S. (2008). Behavioral effects of omega-3 fatty acid supplementation in young adults with severe autism: an open label study. *Arch. Med. Res.* 39, 682–685.

Pop, A.S., Levenga, J., de Esch, C.E.F., Buijsen, R.A.M., Nieuwenhuizen, I.M., Li, T., Isaacs, A., Gasparini, F., Oostra, B.A., and Willemsen, R. (2014). Rescue of dendritic spine phenotype in *Fmr1* KO mice with the mGluR5 antagonist AFQ056/Mavoglurant. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 1227–1235.

Prado, C. (2012). Le coût économique et social de l'autisme. *Droit Déontologie Soins* 13, 46–50.

Provenzano, G., Zunino, G., Genovesi, S., Sgadó, P., and Bozzi, Y. (2012). Mutant mouse models of autism spectrum disorders. *Dis. Markers* 33, 225–239.

Proville, R.D., Spolidoro, M., Guyon, N., Dugué, G.P., Selimi, F., Isope, P., Popa, D., and Léna, C. (2014). Cerebellum involvement in cortical sensorimotor circuits for the control of voluntary movements. *Nat. Neurosci.* 17, 1233–1239.

Provost, B., Lopez, B.R., and Heimerl, S. (2007). A Comparison of Motor Delays in Young Children: Autism Spectrum Disorder, Developmental Delay, and Developmental Concerns. *J. Autism Dev. Disord.* 37, 321–328.

Putzhammer, A., Perfahl, M., Pfeiff, L., and Hajak, G. (2005). Gait disturbances in patients with schizophrenia and adaptation to treadmill walking. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 59, 303–310.



Qiu, A., Adler, M., Crocetti, D., Miller, M.I., and Mostofsky, S.H. (2010). Basal Ganglia Shapes Predict Social, Communication, and Motor Dysfunctions in Boys With Autism Spectrum Disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 49, 539–551.e4.

## R

- Rajcan-Separovic, E., Harvard, C., Liu, X., McGillivray, B., Hall, J.G., Qiao, Y., Hurlburt, J., Hildebrand, J., Mickelson, E.C.R., Holden, J.J.A., et al. (2007). Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. *J. Med. Genet.* *44*, 269–276.
- Rapoport, J., Chavez, A., Greenstein, D., Addington, A., and Gogtay, N. (2009). Autism spectrum disorders and childhood-onset schizophrenia: clinical and biological contributions to a relation revisited. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *48*, 10–18.
- Rasalam, A.D., Hailey, H., Williams, J.H.G., Moore, S.J., Turnpenny, P.D., Lloyd, D.J., and Dean, J.C.S. (2005). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* *47*, 551–555.
- Reichow, B. (2012). Overview of meta-analyses on early intensive behavioral intervention for young children with autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *42*, 512–520.
- Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., and Pollak, D.D. (2015). The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol. Ther.* *149*, 213–226.
- Reiss, A.L., and Hall, S.S. (2007). Fragile X syndrome: assessment and treatment implications. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* *16*, 663–675.
- Roohi, J., Montagna, C., Tegay, D.H., Palmer, L.E., DeVincent, C., Pomeroy, J.C., Christian, S.L., Nowak, N., and Hatchwell, E. (2009). Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J. Med. Genet.* *46*, 176–182.
- Rosen, N.J., Yoshida, C.K., and Croen, L.A. (2007). Infection in the First 2 Years of Life and Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics* *119*, e61–e69.
- Rossignol, D.A., and Frye, R.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* *17*, 290–314.
- Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Poncer, J.-C., Réal, E., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One* *3*, e2595.
- Ruta, L., Ingudomnukul, E., Taylor, K., Chakrabarti, B., and Baron-Cohen, S. (2011). Increased serum androstenedione in adults with autism spectrum conditions. *Psychoneuroendocrinology* *36*, 1154–1163.

## S

- Sabers, A., and Tomson, T. (2009). Managing antiepileptic drugs during pregnancy and lactation. *Curr. Opin. Neurol.* *22*, 157.

- Sakamoto, H., Mezaki, Y., Shikimi, H., Ukena, K., and Tsutsui, K. (2003). Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* *144*, 4466–4477.
- Salinger, W.L., Ladrow, P., and Wheeler, C. (2003). Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation. *Behav. Neurosci.* *117*, 1257–1275.
- Sanders, S.J., Ercan-Sencicek, A.G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M.T., Moreno-De-Luca, D., Chu, S.H., Moreau, M.P., Gupta, A.R., Thomson, S.A., et al. (2011). Multiple recurrent de novo copy number variations (CNVs), including duplications of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* *70*, 863–885.
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C.M., and Reichenberg, A. (2014). THE FAMILIAL RISK OF AUTISM. *JAMA* *311*, 1770–1777.
- Sarachana, T., Xu, M., Wu, R.-C., and Hu, V.W. (2011). Sex Hormones in Autism: Androgens and Estrogens Differentially and Reciprocally Regulate RORA, a Novel Candidate Gene for Autism. *PLOS ONE* *6*, e17116.
- Sasahara, K., Shikimi, H., Haraguchi, S., Sakamoto, H., Honda, S., Harada, N., and Tsutsui, K. (2007). Mode of Action and Functional Significance of Estrogen-Inducing Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis in the Developing Purkinje Cell. *J. Neurosci.* *27*, 7408–7417.
- Sato, A., Mizuguchi, M., and Ikeda, K. (2013). Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits.
- Sato, D., Lionel, A.C., Leblond, C.S., Prasad, A., Pinto, D., Walker, S., O'Connor, I., Russell, C., Drmic, I.E., Hamdan, F.F., et al. (2012). SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 879–887.
- Scheuer, M.L., and Pedley, T.A. (1990). The evaluation and treatment of seizures. *N. Engl. J. Med.* *323*, 1468–1474.
- Schmahmann, J.D. (1997). The cerebellum and cognition. *Neurosci. Lett.*
- Schmahmann, J.D. (2018). The cerebellum and cognition. *Neurosci. Lett.*
- Schmahmann, J.D., and Sherman, J.C. (1998). The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain J. Neurol.* *121* ( Pt 4), 561–579.
- Schneider, T., and Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *30*, 80–89.
- Schneider, T., Turczak, J., and Przewłocki, R. (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *31*, 36–46.
- Schwartz, J.J., Careaga, M., Onore, C.E., Rushakoff, J.A., Berman, R.F., and Ashwood, P. (2013). Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. *Transl. Psychiatry* *3*, e240.
- Schwarz, J.M., and Bilbo, S.D. (2012). Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Horm. Behav.* *62*, 243–253.

- Schwarz, E., Guest, P.C., Rahmoune, H., Wang, L., Levin, Y., Ingudomnukul, E., Ruta, L., Kent, L., Spain, M., Baron-Cohen, S., et al. (2011). Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome. *Mol. Psychiatry* 16, 1213–1220.
- Schwarz, J.M., Sholar, P.W., and Bilbo, S.D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J. Neurochem.* 120, 948–963.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., et al. (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445–449.
- Seillier, A., and Giuffrida, A. (2016). Disruption of social cognition in the sub-chronic PCP rat model of schizophrenia: Possible involvement of the endocannabinoid system. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, 298–309.
- Sewell, M.J., Chiu, Y.E., and Drolet, B.A. (2015). Neural tube dysraphism: review of cutaneous markers and imaging. *Pediatr. Dermatol.* 32, 161–170.
- Shafritz, K.M., Dichter, G.S., Baranek, G.T., and Belger, A. (2008). The Neural Circuitry Mediating Shifts in Behavioral Response and Cognitive Set in Autism. *Biol. Psychiatry* 63, 974–980.
- Sham, P.C., O'Callaghan, E., Takei, N., Murray, G.K., Hare, E.H., and Murray, R.M. (1992). Schizophrenia following pre-natal exposure to influenza epidemics between 1939 and 1960. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 160, 461–466.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Shi, L., Smith, S.E.P., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., and Patterson, P.H. (2009). Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain. Behav. Immun.* 23, 116–123.
- Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., and Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 47, 921–929.
- Siniscalco, D., Sapone, A., Giordano, C., Cirillo, A., de Novellis, V., de Magistris, L., Rossi, F., Fasano, A., Maione, S., and Antonucci, N. (2012). The expression of caspases is enhanced in peripheral blood mononuclear cells of autism spectrum disorder patients. *J. Autism Dev. Disord.* 42, 1403–1410.
- Skefos, J., Cummings, C., Enzer, K., Holiday, J., Weed, K., Levy, E., Yuce, T., Kemper, T., and Bauman, M. (2014). Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PloS One* 9, e81255.
- Skuse, D.H., James, R.S., Bishop, D.V., Coppin, B., Dalton, P., Aamodt-Leeper, G., Bacarese-Hamilton, M., Creswell, C., McGurk, R., and Jacobs, P.A. (1997). Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 387, 705–708.
- Smith, S.E.P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., and Patterson, P.H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10695.
- Snow, W.M., Hartle, K., and Ivanko, T.L. (2008). Altered morphology of motor cortex neurons in the VPA rat model of autism. *Dev. Psychobiol.* 50, 633–639.

- Solek, C.M., Farooqi, N., Verly, M., Lim, T.K., and Ruthazer, E.S. (2017). Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*
- Sotelo, C., and Changeux, J.-P. (1974). Transsynaptic degeneration ‘en cascade’ in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice. *Brain Res.* *67*, 519–526.
- Stephan, K.E., Friston, K.J., and Frith, C.D. (2009). Dysconnection in schizophrenia: from abnormal synaptic plasticity to failures of self-monitoring. *Schizophr. Bull.* *35*, 509–527.
- Stoodley, C.J., and Schmahmann, J.D. (2009). Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *NeuroImage* *44*, 489–501.
- Stoodley, C.J., Valera, E.M., and Schmahmann, J.D. (2012). Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. *NeuroImage* *59*, 1560–1570.
- Stoodley, C.J., D’Mello, A.M., Ellegood, J., Jakkamsetti, V., Liu, P., Nebel, M.B., Gibson, J.M., Kelly, E., Meng, F., Cano, C.A., et al. (2017). Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nat. Neurosci.* *20*, 1744–1751.
- Strata, P. (2015). The Emotional Cerebellum. *The Cerebellum* *14*, 570–577.
- Sugihara, I. (2017). Crus I in the Rodent Cerebellum: Its Homology to Crus I and II in the Primate Cerebellum and Its Anatomical Uniqueness Among Neighboring Lobules. *The Cerebellum* 1–7.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K.J., et al. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry* *70*, 49–58.
- Suzuki, Y., Critchley, H.D., Rowe, A., Howlin, P., and Murphy, D.G.M. (2003). Impaired olfactory identification in Asperger’s syndrome. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *15*, 105–107.
- Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brône, B., Legendre, P., and Rigo, J.-M. (2012). Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* *61*, 150–163.

## T

- Tan, D.W., Maybery, M.T., Clarke, M.W., Lorenzo, R.D., Evans, M.O., Mancinone, M., Panos, C., and Whitehouse, A.J.O. (2018). No relationship between autistic traits and salivary testosterone concentrations in men from the general population. *PLOS ONE* *13*, e0198779.
- Tartaglia, N., Cordeiro, L., Howell, S., Wilson, R., and Janusz, J. (2010). The Spectrum of the Behavioral Phenotype in Boys and Adolescents 47,XXY (Klinefelter Syndrome). *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* *8*, 151–159.
- Teitelbaum, P., Teitelbaum, O., Nye, J., Fryman, J., and Maurer, R.G. (1998). Movement analysis in infancy may be useful for early diagnosis of autism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 13982–13987.
- Tetreault, N.A., Hakeem, A.Y., Jiang, S., Williams, B.A., Allman, E., Wold, B.J., and Allman, J.M. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *J. Autism Dev. Disord.* *42*, 2569–2584.

Tierney, S., Burns, J., and Kilbey, E. (2016). Looking behind the mask: Social coping strategies of girls on the autistic spectrum. *Res. Autism Spectr. Disord.* *23*, 73–83.

Town, T., Jeng, D., Alexopoulou, L., Tan, J., and Flavell, R.A. (2006). Microglia Recognize Double-Stranded RNA via TLR3. *J. Immunol.* *176*, 3804–3812.

Tran, K.D., Smutzer, G.S., Doty, R.L., and Arnold, S.E. (1998). Reduced Purkinje cell size in the cerebellar vermis of elderly patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* *155*, 1288–1290.

Tuchman, R., Cuccaro, M., and Alessandri, M. (2010). Autism and epilepsy: Historical perspective. *Brain Dev.* *32*, 709–718.

Turner, K.C., Frost, L., Linsenbardt, D., McIlroy, J.R., and Müller, R.-A. (2006). Atypically diffuse functional connectivity between caudate nuclei and cerebral cortex in autism. *Behav. Brain Funct.* *BBF* *2*, 34.

## U

Uemura, T., Lee, S.-J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., and Mishina, M. (2010). Trans-Synaptic Interaction of GluR $\delta$ 2 and Neurexin through Cbln1 Mediates Synapse Formation in the Cerebellum. *Cell* *141*, 1068–1079.

Unichenko, P., Yang, J.-W., Kirischuk, S., Kolbaev, S., Kilb, W., Hammer, M., Krueger-Burg, D., Brose, N., and Luhmann, H.J. (2018). Autism Related Neuroligin-4 Knockout Impairs Intracortical Processing but not Sensory Inputs in Mouse Barrel Cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *28*, 2873–2886.

## V

Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* *12*, 1161–1208.

Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., and Pardo, C.A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* *57*, 67–81.

Varlet, M., Marin, L., Raffard, S., Schmidt, R.C., Capdevielle, D., Boulenger, J.-P., Del-Monte, J., and Bardy, B.G. (2012). Impairments of Social Motor Coordination in Schizophrenia. *PLoS ONE* *7*.

Vekrellis, K., McCarthy, M.J., Watson, A., Whitfield, J., Rubin, L.L., and Ham, J. (1997). Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 1239–1249.

Vilensky, J.A., Damasio, A.R., and Maurer, R.G. (1981). Gait disturbances in patients with autistic behavior: a preliminary study. *Arch. Neurol.* *38*, 646–649.

Voorn, P., Vanderschuren, L.J.M.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W., and Pennartz, C.M.A. (2004). Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* *27*, 468–474.

Vorstman, J.A.S., Spooren, W., Persico, A.M., Collier, D.A., Aigner, S., Jagasia, R., Glennon, J.C., and Buitelaar, J.K. (2014). Using genetic findings in autism for the development of new pharmaceutical compounds. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 1063–1078.

de Vrij, F.M.S., Levença, J., van der Linde, H.C., Koekkoek, S.K., De Zeeuw, C.I., Nelson, D.L., Oostra, B.A., and Willemsen, R. (2008). Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in *Fmr1* KO mice. *Neurobiol. Dis.* 31, 127–132.

Vuillier, F., Medeiros de Bustos, É., and Tatu, L. (2011). Organisation fonctionnelle du cervelet : approche neuro-anatomique. *Rev. Neurol. (Paris)* 167, 361–369.



Walther, S., and Strik, W. (2012). Motor symptoms and schizophrenia. *Neuropsychobiology* 66, 77–92.

Wang, L., Jia, M., Yue, W., Tang, F., Qu, M., Ruan, Y., Lu, T., Zhang, H., Yan, H., Liu, J., et al. (2008). Association of the ENGRAILED 2 (*EN2*) gene with autism in Chinese Han population. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 147B, 434–438.

Watanabe, M., and Kano, M. (2011). Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1697–1710.

Wegiel, J., Flory, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Ma, S.Y., Imaki, H., Wegiel, J., Cohen, I.L., London, E., Wisniewski, T., et al. (2014). Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol. Commun.* 2.

Wei, H., Alberts, I., and Li, X. (2013). Brain IL-6 and autism. *Neuroscience* 252, 320–325.

Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., Luchins, D.J., Bigelow, L.B., and Wyatt, R.J. (1980). Cerebellar pathology in schizophrenia: a controlled postmortem study. *Am. J. Psychiatry* 137, 359–361.

Weisenfeld, N.I., Peters, J.M., Tsai, P.T., Prabhu, S.P., Dies, K.A., Sahin, M., and Warfield, S.K. (2013). An MRI Study of Cerebellar Volume in Tuberous Sclerosis Complex. *Pediatr. Neurol.* 48, 105–110.

Weiser, M.J., Mucha, B., Denheyer, H., Atkinson, D., Schanz, N., Vassiliou, E., and Benno, R.H. (2016). Dietary docosahexaenoic acid alleviates autistic-like behaviors resulting from maternal immune activation in mice. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 106, 27–37.

Weiss, L.A., Shen, Y., Korn, J.M., Arking, D.E., Miller, D.T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M.A.R., Green, T., et al. (2008). Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N. Engl. J. Med.* 358, 667–675.

Werling, D.M., and Geschwind, D.H. (2013). Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 146–153.

West, M.J., Slomianka, L., and Gundersen, H.J. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497.

White, S.W., Oswald, D., Ollendick, T., and Scahill, L. (2009). Anxiety in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders. *Clin. Psychol. Rev.* 29, 216–229.

Whitney, E.R., Kemper, T.L., Bauman, M.L., Rosene, D.L., and Blatt, G.J. (2008). Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains: a stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum Lond. Engl.* 7, 406–416.

## X

Xi, Y., Chen, W.J., Deng, J.X., Cui, Z.J., Liu, H.L., Yan, M.C., Deng, J.B., and Wu, P. (2015). Vasculature-guided neural migration in mouse cerebellum. *Ital. J. Zool.* 82, 15–24.

Xuan, I.C.Y., and Hampson, D.R. (2014). Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. *PloS One* 9, e104433.

## Y

Yang, M., Silverman, J.L., and Crawley, J.N. (2011). Automated Three-Chambered Social Approach Task for Mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley AI *CHAPTER 8*, Unit-8.26.

Yassa, H.A. (2014). Autism: A form of lead and mercury toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38, 1016–1024.

Yin, J., and Schaaf, C.P. (2017). Autism genetics - an overview. *Prenat. Diagn.* 37, 14–30.

Yin, H.H., Knowlton, B.J., and Balleine, B.W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur. J. Neurosci.* 19, 181–189.

Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., and Balleine, B.W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 22, 513–523.

Yin, H.H., Mulcare, S.P., Hilário, M.R.F., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M.I., Hansson, A.C., Lovinger, D.M., and Costa, R.M. (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat. Neurosci.* 12, 333–341.

Yip, B.H.K., Leonard, H., Stock, S., Stoltenberg, C., Francis, R.W., Gissler, M., Gross, R., Schendel, D., and Sandin, S. (2017). Caesarean section and risk of autism across gestational age: a multi-national cohort study of 5 million births. *Int. J. Epidemiol.* 46, 429–439.

Yoo, H. (2015). Genetics of Autism Spectrum Disorder: Current Status and Possible Clinical Applications. *Exp. Neurobiol.* 24, 257–272.

Yopak, K.E., Lisney, T.J., Collin, S.P., and Montgomery, J.C. (2007). Variation in brain organization and cerebellar foliation in chondrichthyan sharks and holocephalans. *Brain. Behav. Evol.* 69, 280–300.

Yu, M., and Levine, S.J. (2011). Toll-like Receptor 3, RIG-I-like Receptors and the NLRP3 Inflammasome: Key Modulators of Innate Immune Responses to Double-stranded RNA Viruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 63–72.

Yuan, J., and Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802–809.

## Z

Zanjani, H.S., Vogel, M.W., Delhaye-Bouchaud, N., Martinou, J.C., and Mariani, J. (1996). Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human Bcl-2 transgene. *J. Comp. Neurol.* 374, 332–341.

Zerbo, O., Leong, A., Barcellos, L., Bernal, P., Fireman, B., and Croen, L.A. (2015). Immune mediated conditions in autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* 46, 232–236.

Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406.

Zhang, C., Milunsky, J.M., Newton, S., Ko, J., Zhao, G., Maher, T.A., Tager-Flusberg, H., Bolliger, M.F., Carter, A.S., Boucard, A.A., et al. (2009). A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10843–10854.

Zhang, X., Lv, C.-C., Tian, J., Miao, R.-J., Xi, W., Hertz-Picciotto, I., and Qi, L. (2010a). Prenatal and Perinatal Risk Factors for Autism in China. *J. Autism Dev. Disord.* 40, 1311–1321.

Zhang, Y., Niu, B., Yu, D., Cheng, X., Liu, B., and Deng, J. (2010b). Radial glial cells and the lamination of the cerebellar cortex. *Brain Struct. Funct.* 215, 115–122.

Zhou, H., Wu, W., Zhang, Y., He, H., Yuan, Z., Zhu, Z., and Zhao, Z. (2017). Selective preservation of cholinergic MeCP2 rescues specific Rett-syndrome-like phenotypes in MeCP2stop mice. *Behav. Brain Res.* 322, 51–59.