HAL
open science

Autisme et cervelet : le gradient des ions chlorures en question

Sébastien Roux

To cite this version:

Sébastien Roux. Autisme et cervelet : le gradient des ions chlorures en question. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ030 . tel-02116164

HAL Id: tel-02116164

https://theses.hal.science/tel-02116164v1

Submitted on 30 Apr 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE (ED 414)

Institut de Neurosciences Cellulaires Intégrées

THÈSE présentée par :

Sébastien ROUX

soutenue le : **10 avril 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Autisme et cervelet : le gradient des ions chlorures en question

THÈSE dirigée par :

M. BOSSU Jean-Louis	Directeur de Recherche, Université de Strasbourg
M. BECKER Jérôme	Chargé de Recherche, Université François Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme Davidovic Laëtitia	Chargée de Recherche, Université de Nice Sophia Antipolis
M. Ago Fabrice	Directeur de Recherche, Université de Montpellier

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Shröder Carmen	PUPH, Université de Strasbourg
M. Schlichter Rémy	Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Avant toute chose, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je voudrais ensuite remercier le Dr Philippe Isope ainsi que toute l'équipe « Physiologie des réseaux neuronaux » pour m'avoir accueilli, conseillé, et supporté tout au long de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement Jean-Louis Bossu, avec qui est né ce projet, pour m'avoir accueillis dans son équipe et confié ce projet. Merci aussi pour tout ce que tu m'as appris et pour m'avoir transmis la passion des courbes qu'elles soient éléctrophysiologiques ou non.

Je remercie également Julie Le Merrer et Jérôme Becker pour leur accueil à Tours, pour leur temps et pour m'avoir permis de découvrir la science autrement. Je remercie aussi toute l'équipe DRUGS pour les super moments passés chez vous, c'était une vraie chance pour moi de travailler ensemble.

Je veux également dire merci au Dr Yannick Bailly pour avoir pris le temps de me conseiller tout au long de ma thèse. Merci également à Anne-Marie Haeberlé pour ses conseils et son aide, tant pratique que théorique.

Je remercie tout le personnel de l'animalerie et tout particulièrement Nicolas pour le temps et l'implication qu'il a mis dans les reproductions des VPA.

Je remercie aussi mes parents pour leur soutien sans faille et sans lequel je n'aurais jamais pu arriver jusqu'ici.

Et je remercie Amélie pour m'avoir soutenu, supporté et avoir traversé tout ça à mes cotés

Sommaire

Introduction générale et objectifs de la thèse _____ **1**

Partie 1 : Contexte scientifique _____ ***4***

Chapitre 1 : L'autisme _____ **4**

1 - Présentation générale selon le DSM5 _____ 5

2 - Etiologies _____ 6

3 - Théories sur l'origine des TSA _____ 7

4 - Neuropathologies de l'autisme _____ 8

5 - Autisme, thérapie et prise en charge _____ 10

Chapitre 2 : Le cervelet _____ **13**

1 - Anatomie descriptive _____ 13

2 - Histologie (cortex cérébelleux) _____ 14

3 - Rôles multiples du cervelet _____ 15

The Purkinje cell : as an integrative machine _____ 19

Chapitre 3 : Autisme et cervelet _____ **31**

Le cervelet, des troubles moteurs à l'autisme _____ 34

Chapitre 4 : Les modèles animaux d'étude de l'autisme _____ **46**

1 - Les modèles transgéniques _____ 46

2 - Les modèles d'atteinte environnementale _____ 47

Valproic acid and autism spectrum disorder: from clinical observations to animal studies _____ 50

Chapitre 5 : Le gradient des ions chlorures _____ **60**

1 Le GABA : effets excitateurs et inhibiteurs. _____ 60

2 - Cotransporteur et développement du gradient _____ 61

3 - Le gradient aux ions chlorures dans un contexte pathologique _____ 63

4 - Gradient des ions chlorures et autisme _____ 64

Partie 2 : Contributions expérimentales _____ ***66***

Caractérisation phénotypique des comportements du modèle des souris valproate _____ **66**

Article 1 : Maturation of GABAergic transmission in cerebellar Purkinje cells is sex dependent and altered in autism. _____ **78**

Article 2 : Regional and sex dependent alterations in Purkinje cell density in the valproate mouse model of autism **123**

Etude comportementale de l'influence pharmacologique d'un composé modulant le gradient des ions chlorures. **143**

Matériels et méthodes 143

Résultats 144

Conclusion 151

Partie 3 : Discussion générale et perspectives ***152***

La différence mâle/femelle dans l'autisme 152

Différence dans le gradient aux ions chlorures 153

Perspectives 156

Bibliographie ***158***

Liste des Abréviations

AAP : Association Americaine de Psychiatrie

ABA : Applied Behavior Analysis

AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque

ARNm : acide ribonucléique messager

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

CIM : classification internationale des maladies

CP : cellule(s) de Purkinje

DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

Fmr1 : fragile mental retardation

GABA : acide gamma-aminobutyrique

IGF-1 : insulin-like growth factor-1

Abréviations

IRM : imagerie par résonance magnétique

MecP2 : methyl CpG binding protein 2

NLGN : neurolignine

Opmr1 : Opioid Receptor Mu 1

PCDH10 : protocadherine 10

PFC : cortex préfrontal

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

TED : troubles envahissants du développement

TSA : troubles du spectre de l'autisme

TSC : Tuberous Sclerosis

VPA : acide valproïque

Introduction générale et objectifs de la thèse

Introduction générale et objectifs de la thèse

L'autisme, ou troubles du spectre autistique, est un ensemble de désordres neuro-développementaux complexes caractérisés par des troubles de la communication et des interactions sociales ainsi que par des centres d'intérêts restreints et répétitifs et des stéréotypies. On recense chez les patients autistes une mosaïque de symptômes regroupés sous le terme de troubles du spectre autistique.

Sa prévalence est estimée à une personne atteinte sur cent et semble être en augmentation. Si son étiologie est aujourd'hui mal comprise, elle inclut cependant des facteurs génétiques et environnementaux et différentes théories existent pour tenter d'expliquer la survenue de cette pathologie. Certaines de ces théories se basent sur des hypothèses psychologiques comme la théorie de l'esprit ou la théorie de la faiblesse de la cohérence centrale, tandis que d'autres se concentrent sur une base physiologique, comme la théorie de l'altération de la balance excitation/inhibition ou de l'hyper-connectivité dans certaines structures du système nerveux central.

Des atteintes dans de nombreuses structures cérébrales, comme le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe, le noyau accumbens et le cervelet, ont étés mises en évidence chez les sujets autistes, chacune d'entre elles pouvant expliquer une partie des signes cliniques observés.

Parmi ces structures, le cervelet est celle dont les modifications anatomiques ont été le plus souvent rapportées dans les études post-mortem. Le cervelet, ou petit cerveau, est depuis longtemps connu pour son implication dans les processus moteurs (coordination des mouvements, équilibre, apprentissage moteur…) mais a plus récemment été mis en avant pour son rôle dans des processus cognitifs, tel que la gestion des émotions ou encore la perception de l'environnement. Depuis lors, l'étude des altérations du cervelet chez les patients autistes et dans des modèles animaux de l'autisme est devenue un axe de recherche primordial pour améliorer notre compréhension des troubles du spectre autistique. A ce sujet, nous avons compilé différentes informations recensant l'implication du cervelet dans les troubles autistiques.

Introduction générale et objectifs de la thèse

Le cervelet reçoit, en provenance de nombreuses zones cérébrales, une multitude d'informations qui convergent toutes vers les cellules de Purkinje qui constituent l'unique voie de sortie du cortex cérébelleux. De façon intéressante, c'est cette cellule qui a une position centrale dans le circuit cérébelleux qui est généralement impactée dans la pathologie de l'autisme.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à la théorie cellulaire d'un déséquilibre de la balance excitation inhibition comme origine des TSA. J'ai étudié, d'une part, la mise en place de cette balance dans les cellules de Purkinje, qui se fait dépendamment du développement du gradient extra/intra cellulaire en ions chlorures. Ce gradient détermine l'effet du GABA qui est considéré comme le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. D'autre part, j'ai étudié l'effet d'un composé X, modulant le gradient aux ions chlorures, sur les comportements autistiques.

Afin de mener à bien mon premier projet, j'ai choisi un modèle murin de l'autisme. Différents modèles murins de l'autisme existent : ils sont construits soit sur des mutations de gènes connus pour leur implication dans l'autisme (shank3, Fmr1, Oprm1...) soit sur des expositions environnementales prénatales à des agents tératogènes (métaux lourd, parabène, pesticides...). Parmi les modèles environnementaux, nous avons choisi celui pour la souris d'une exposition prénatale au valproate de sodium (VPA = acide valproïque: un antiépileptique largement prescrit) connu pour engendrer chez la descendance des comportements autistiques, ainsi que des altérations cérébelleuses. Ce modèle est appelé souris-VPA. Dans le cadre de l'étude pharmacologique j'ai travaillé avec les modèles génétiques KO FMR1 (modèle de l'X fragile) et KO Oprm1 (modèle d'un déficit de récompense sociale).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de démontrer d'une part que la régulation du gradient aux ions chlorures, qui contrôle l'inhibition GABAergique, présente un dimorphisme sexuel et est altérée chez les souris VPA et d'autre part, bien que les souris VPA présentent plus de cellules de Purkinje chez les animaux jeunes (P13), les souris adultes mâles (P40) ont elles perdu des cellules de Purkinje de façon régionalisée. Enfin, j'ai réalisé un

phénotypage des comportements autistiques chez les souris VPA et montré la présence de ces comportements chez les deux sexes et ce malgré les différences observées précédemment.

Partie 1 : Contexte scientifique

Chapitre 1 : L’autisme

Les premières descriptions cliniques de l'autisme datent de plus de 70 ans. En effet, en 1943 Léo Kanner (Kanner 1943) étudie les comportements de 11 enfants qu'il décrit comme atteints de « troubles autistiques du contact affectif ». A l'époque, Kanner ne définit pas de critères diagnostiques mais il note néanmoins deux symptômes centraux aux troubles observés chez les enfants qu'il nomme « aloneness » et que l'on définit maintenant comme troubles socio-communicatifs et « sameneness » que l'on appelle : comportement et intérêts restreints et répétitifs.

Cependant, les courants de pensées prédominants dans les années 50-60 ont conduit à considérer l'autisme comme un trouble correspondant à un retrait actif de l'enfant en réponse à une situation relationnelle insupportable et à être confondu avec la schizophrénie infantile. Cette conception de l'autisme sera remise en question dans les années 70-80 notamment en séparant clairement autisme et schizophrénie infantile (Kolvin, 1971) et en démontrant l'implication de facteurs génétiques (Folsein et Rutter, 1977).

La classification moderne de l'autisme apparait en 1979 dans une étude épidémiologique de Wing et Gould portant sur des enfants nés entre 1956 et 1970. Ils ont montré qu'en plus d'enfants présentant des symptômes typiques de l'autisme (4.9/10 000) d'autres (22.5/10 000) partagent avec eux une triade de déficiences caractérisée par des troubles des interactions sociales, de la communication et des comportements et intérêts restreints et stéréotypés. Cette triade de symptômes a servi de base à l'établissement d'un nouveau diagnostic nommé troubles envahissants du développement (TED) afin d'identifier des enfants ne présentant pas l'ensemble des symptômes d'un autisme typique ou qui les présentent avec un moindre degré de sévérité. Cette étude a également conduit à l'introduction du diagnostic du syndrome d'Asperger pour des enfants présentant la triade caractéristique mais, sans retard de langage dans ses aspects formels (phonologie, lexique et syntaxe) et sans un retrait social massif mais présentant des interactions sociales inadaptées (Wing and Gould, 1979).

Enfin, en 2013, apparait la classification des Troubles du Spectre Autistiques (TSA) avec la publication du DSM-5 ("Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" pour "Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux"; (American Psychiatric Association, 2013)).

Cette nouvelle classification explique probablement en partie l'augmentation du nombre de cas diagnostiqués en permettant aux cliniciens de repérer de façon plus fiable des enfants présentant à différents degrés la triade de symptômes. En effet la prévalence des TSA est passée d'environs 5/10 000 il y a 20 ans à 1/100 récemment.

1 - Présentation générale selon le DSM5

Il existe deux grands systèmes de classification des troubles psychiatriques: le CIM (classification internationale des maladies) publié par l'OMS (Organisme Mondiale de la Santé) et le DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) publié par l'AAP (Association Americaine de Psychiatrie). Le DSM en est à sa 5ème version et est le plus utilisé des deux. Le DSM-5 ne fait plus cas que d'une seule catégorie d'autisme : les troubles du spectre autistique (TSA) qui regroupent l'ensemble des catégories du DSM-4 (trouble autistique, trouble désintégratif, syndrome d'Asperger, TED non spécifié) à l'exception du syndrome de Rett.

Le diagnostic de TSA, pour être établit, nécessite la présence de 2 symptômes, à savoir des altérations des comportements socio-communicatifs et la présence de centre d'intérêt et d'activités stéréotypés incluant la présence d'anomalies sensorielles. Un troisième critère est relatif à l'âge d'apparitions des symptômes « *Les symptômes doivent être présents dès la petite enfance mais peuvent ne devenir totalement manifeste que lorsque la demande sociale excède les limites des compétences* ». Enfin, pour atteindre le diagnostique, le trouble doit constituer un réel handicape pour le patient « *Les symptômes limitent et handicapent le fonctionnement quotidien* ».

Le DSM-5 impose également une évaluation de la sévérité des symptômes, en fonction du besoin d'accompagnement, en trois niveau 1) accompagnement nécessaire, 2) nécessite un accompagnement important, 3) nécessite un accompagnement très important. La présence d'une déficience intellectuelle, d'un trouble du langage ou d'un autre trouble associé doit aussi être évaluée ainsi que la présence de facteurs génétiques ou environnementaux connus.

2 - Etiologies

La question de l'étiologie de l'autisme est extrêmement complexe et encore largement incomprise (Varghese et al., 2017). En effet seul 5 à 10% des cas peuvent s'expliquer par une commorbidité avec une autre pathologie telle que la Sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Down ou celui du X fragile (Banerjee et al., 2014). On parle alors d'autisme syndromique. Mais dans la majorité des cas, il n'est pas possible d'identifier clairement l'origine du trouble que l'on qualifiera alors d'autisme idiopathique ou non-syndromique.

L'implication de facteurs génétiques a été démontrée par une étude, portant sur des jumeaux, qui montre une occurrence des TSA de 60 à 90% chez des jumeaux monozygotes(Folstein and Rosen-Sheidley, 2001), soit dix fois l'occurrence retrouvée pour des jumeaux dizygotes (Bourgeron, 2015). Ces facteurs génétiques peuvent être regroupés en huit catégories: (1) les gènes régulant des voies moléculaires et faisant le lien entre des signaux synaptiques et non-synaptiques comme TSC1/2 (Tuberous Sclerosis 1 et 2) ou PTEN (Phosphatase and TENsin homolog); (2) ceux impliqués dans la traduction et la stabilité des protéines avec notamment FMR1 (fragile mental retardation) et UBEA3A; (3) ceux intervenant dans le développement de processus neuronales, incluant les neurolignines (NLGN3 et NLGN4), protocadherine 10 (PCDH10) ou encore SHANK3 (proteine d'ancrage synaptique); (4) les gènes impliqués dans la production et la signalisation de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs comme le transporteur à la sérotonine SLC6A4; (5) ceux régulant la concentration ionique intracellulaire en calcium, sodium mais également chlorure; (6) ceux intervenant dans le métabolisme comme la phenylalanine hydroxylase; (7) ceux régulant l'expression génétique avec MeCP2, RNF8, En2; et (8) ceux dont la fonction n'est pas connue comme AHI1, une des cause du syndrome de Joubert (Rubenstein, 2010; De Rubeis et al., 2014). Cependant, aucun de ces facteurs pris individuellement ne peux expliquer plus 1 à 2% des cas d'autisme.

Si ces causes génétiques semblent difficilement expliquer à elles seules la survenue de l'autisme il semblerait que ce soit une interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux apparaissant précocement dans le développement (pré/périnatale) qui

conduirait à la survenue de la majorité des TSA (Kalkbrenner et al., 2014). Parmi ces facteurs environnementaux on peut citer les métaux lourds, les pesticides, des composés organiques volatiles ou encore la pollution atmosphérique (pour revue voir Kalkbrenner et al., 2014). En plus de ces composés chimiques d'autres éléments pourraient rentrer en ligne de compte tel que le stress maternel, une infection durant la grossesse, l'âge du père. Enfin, certaines substances pharmacologiques comme la thalidomide ou le valproate de sodium prescrites pendant la grossesse sont des facteurs de risque (Gadad et al., 2013).

3 - Théories sur l'origine des TSA

De par la complexité de son étiologie et l'hétérogénéité de sa symptomatologie les TSA forment un ensemble de troubles difficiles à appréhender. Plusieurs théories tentent d'expliquer les causes de la survenue des TSA dont je vais résumer certaines des plus citées.

La "théorie de l'esprit aveugle", développée par Baron-Cohen en 1995, pose que les déficits observés chez les patients autistes seraient dus à une faiblesse de théorie de l'esprit. Cette théorie de l'esprit sous-tend la capacité de comprendre et de prévoir les comportements d'autrui en lui attribuant des états mentaux tels que des croyances, des désirs, des émotions ou des intentions (Baron-Cohen, 1995). Des études d'imagerie fonctionnelle ont pu montrer, qu'en plus d'une sous performance dans les tests cognitifs relatifs à la théorie de l'esprit, il existait chez les patients une sous activation et une connectivité fonctionnelle réduite dans les zones cérébrales activées pendant les tests (Kana et al., 2015).

La théorie du "cerveau extrêmement masculin" (Baron-Cohen, 2002) postule quant à elle l'existence de plusieurs types de cerveaux, dont le "cerveau féminin" fonctionnant plus sur l'empathie et un "cerveau masculin" fonctionnant plus sur la systématisation. Selon cette théorie, les TSA résulteraient d'un cerveau fonctionnant comme celui d'un "cerveau masculin" mais de façon « exagéré » du faite d'une trop forte exposition à la testostérone pendant le développement embryonnaire. On retrouve effectivement dans plusieurs études des rapports de dérégulations hormonales, comme des taux élevés de testostérone ou encore une

augmentation du nombre de polymorphismes aux niveaux des gènes régulant le métabolisme des androgènes (Schmidtova et al., 2010).

L'une des théories les plus connues sur l'autisme est celle du "monde trop intense" de Markram. Le cœur du phénomène serait ici partagé entre un manque de connexion à distance entre les différentes aires cérébrales qui impacterait la capacité à intégrer des informations cognitives et sensorielles et une sur-connectivité locale qui mènerait à une hyperspécialisation des processus sensoriels (Markram et al., 2007; Markram and Markram, 2010).

Les TSA pourraient également être du à un déficit dans le système de récompense selon la théorie de la récompense sociale. En effet, plusieurs études ont révélé des déficits dans la perception d'une récompense suite à une interaction sociale positive chez les patients TSA. De plus, une diminution de l'activité neuronale a été rapportée dans des zones clés pour l'anticipation et le traitement de la récompense, tel que les noyaux accumbens et le caudé-putamen chez des patients TSA (Pellissier et al., 2017).

Enfin, la dernière théorie que je souhaiterais évoquer et celle d'un déséquilibre de la balance entre l'excitation et l'inhibition dans des systèmes neuronaux clés (sensoriel, mnésique, social et émotionnel) tel que proposée par Rubenstein et Merzenich en 2003. Des déséquilibres de cette balance seraient à l'origine de la prévalence d'environ 30% de sujets épileptiques parmi la population autistique, ainsi que de la présence d'activités anormales révélées par un EEG chez 50 à 70% des sujets autistes. Les différents facteurs génétiques et environnementaux, cités précédemment, contribueraient à augmenter l'activité glutamatergique ou à diminuer l'activité GABAergique conduisant à une augmentation du ratio excitation/inhibition. L'augmentation de ce ratio créerait un "bruit de fond" perturbant le développement normal du système nerveux (Rubenstein and Merzenich, 2003).

4 - Neuropathologies de l'autisme

Le paramètre ayant été le plus souvent évalué chez des patients autistes est la taille du cerveau, déterminée par une mesure de la circonférence de la boite crânienne. Ce paramètre a permis de

mettre en évidence des anomalies du développement cérébral chez les autistes. Si la taille du cerveau semble ne pas différer entre autistes et contrôles à la naissance, elle est supérieure d'environ 10% chez les sujets autistes à l'âge de 3-4 ans. Cependant, à l'âge adulte, une taille cérébrale égale, voire inferieure aux contrôles, est rapportée chez les patients autistes (DiCicco-Bloom et al., 2006). Un grand nombre d'études ont porté sur la taille cérébrale des patients autistes et même si toutes ne s'accordent pas, une méta-analyse de ces données a pu confirmer l'existence d'une différence de la taille cérébrale moyenne entre population contrôle et autiste. Cette différence apparait de manière dépendante de l'âge avec une taille plus importante dans l'enfance (Sacco et al., 2015).

Si la taille globale du cerveau semble affectée chez les autistes, on retrouve également des modifications localisées dans certaines structures : cortex préfrontal, gyrus fusiforme, cortex cingulaire et frontoinsulaire, l'hippocampe, l'amygdale, le striatum et le cervelet (pour revue voir Varghese et al., 2017).

Le cortex préfrontal (PFC) est connu pour coordonner la mémorisation, la planification et l'activité de différentes autre zones cérébrales (Miller and Cohen, 2001). Le PFC est plus développé chez les jeunes sujets autistes où une augmentation de 67% du nombre de neurones a même été montrée. Cependant, la taille des neurones pyramidaux y est réduite et l'activité des micro-colonnes corticales est perturbée avec un déficit de l'inhibition entre chaque colonne.

Le gyrus fusiforme est impliqué dans la reconnaissance faciale et joue donc un rôle central dans les interactions sociales. Plusieurs études ont montrées une activité moins importante dans cette structure chez les patients TSA, de l'adolescence à l'âge adulte, ainsi qu'une diminution du nombre de neurones dans certaines couches de cette aire corticale chez l'adulte. Ces résultats suggèrent une connectivité diminuée, entre les aires analysant visuellement les visages et le gyrus fusiforme, et entre le gyrus et les aires évaluant les expressions faciales.

Les cortex cingulaire et frontoinsulaire présentent une population spécifique de neurones : les neurones de Von Economo, dont la distribution dans ces aires corticales suggère qu'ils sont impliqués dans la cognition sociale et le sens de soi (Allman et al., 2010). Des études ont montré

une augmentation du nombre et de la densité de ces neurones chez des sujets autistes ainsi que des anomalies de leurs distributions. Des altérations de patron d'activité ainsi que des anomalies de la stratification ont également été montrées dans le cortex cingulaire.

L'hippocampe, impliqué entre autres dans la mémorisation (intégration et récupération des souvenir) et la navigation spatiale (Eichenbaum et al., 1999; Burgess et al., 2002), montre une diminution de la taille des neurones, une augmentation de leurs nombres (notamment des interneurones GABAergiques) ainsi qu'une diminution de la complexité de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux chez les patients TSA.

L'amygdale contrôle l'apprentissage émotionnel (Cahill et al., 1995) et plusieurs études ont montré une diminution globale du nombre de neurones dans cette structure uniquement chez les autistes adultes.

Des altérations de la taille du striatum ont étés rapportées chez les enfants et les adultes avec TSA. Des études IRM (imagerie par résonance magnétique) ont montré une activité moindre dans le striatum de patients TSA lors d'un paradigme testant le traitement d'une récompense sociale. Des anomalies striatales sont également rapportées dans différents modèle d'autisme, comme une altération de la plasticité ou des modifications structurales au niveau synaptique, ainsi qu'une diminution de l'excitation neuronale (Fuccillo, 2016).

Le cervelet est connu pour réguler la coordination motrice, mais il est apparu qu'il jouait également un rôle dans des processus cognitifs comme la régulation des émotions (Reeber et al., 2013; Strata, 2015). De nombreuses études ont montré des différences en termes de volume du cervelet entre sujets sains et autistes ainsi qu'une diminution du nombre de cellules de Purkinje (CP). Les atteintes cérébelleuses liées au TSA seront traitées plus en détail dans le chapitre 3.

5 - Autisme, thérapie et prise en charge

Aujourd'hui, il n'existe pas de thérapie pour traiter l'autisme. Cependant, il existe différentes prises en charges qui permettent de soulager les symptômes et améliorent la qualité de vie des

patients et de leurs proches. Ces prises en charge se regroupent principalement en deux catégories : les traitements pharmacologiques et les thérapies comportementales.

Récemment, des études ont été menées sur les effets de la bumétanide (un antidiurétique) qui semble montrer des résultats encourageants (Lemonnier et al., 2012). Les laboratoires Roches viennent de recevoir le statut de "percée thérapeutique" pour le Balovaptan, un antagoniste des récepteurs à la vasopressine ayant montré des résultats positifs en phase 2 (Roche, 2018).

L'ocytocine est connue pour son rôle dans la cognition et les interactions sociales (Yamasue et al., 2012). Sa prise chez l'humain induit, entre autres, une plus grande confiance sociale, de l'altruisme et une meilleure capacité à inférer les émotions d'autrui à partir d'expressions faciales. Les patients autistes ayant pris de l'ocytocine répondent plus facilement aux autres, sont plus coopératifs, répondent mieux dans des tests de reconnaissances d'émotions et augmentent leurs contacts visuels (Benner and Yamasue, 2017).

Même si des résultats encourageant sont trouvé notamment avec le Balovaptan, aucune piste n'a pour l'instant permis de fournir un traitement ayant passé toutes les phases d'essais cliniques et ayant prouvé une amélioration significative. Il existe cependant des méthodes alternatives ayant fait leurs preuves et qui proposent de réelles améliorations : les thérapies comportementales.

Il existe différentes thérapies comportementales pour les TSA et ce sont généralement tous des programmes intensifs, ayant pour but d'induire des progrès globaux et durables chez les patients. Parmi ces programmes, ABA pour Applied Behavior Analysis (Analyse appliquée du comportement) est certainement le plus connu et le plus utilisé. Il met l'accent sur des compétences liées à l'autonomie, au langage réceptif, à l'imitation verbale et non-verbale et permet d'établir les bases pour le jeu. Il existe deux types d'enseignement : l'enseignement structuré et l'enseignement dit secondaire. L'enseignement structuré se déroule en petites séances répétées, en succession rapide, jusqu'à ce que l'enfant soit capable de répondre de lui-même sans aide. Chaque séance se concentre sur une demande ou une directive donnée à l'enfant afin qu'il effectue une action, le comportement ou la réponse attendu et enfin la

réaction de l'intervenant. Ici, chaque réponse ou ébauche de réponse est récompensée (compliment, félicitations) tandis que tout autre comportement que celui attendu est ignoré ou corrigé de façon neutre. L'enseignement dit secondaire s'applique à tout endroit et tout moment et a pour but de guider l'enfant. Cela peut s'appliquer dans le cadre de jeux pour le guider dans l'expérimentation et la découverte de son environnement, lors de moment d'autonomie personnelle comme les repas ou la toilette ou encore dans des moments d'intégration sociale comme des repas en groupe, des sorties en société... Là encore, chaque comportement jugé comme approprié sera récompensé.

Cependant, ces thérapies comportent également leurs limites notamment du fait de leurs coûts de mise en place tant au niveau financier qu'humain. L'efficacité de ces thérapies est difficile à évaluer et il n'existe de validation officielle pour aucune d'entre elles. La méthode ABA à été sujette à controverse (Shea, 2009). La mise au point d'une thérapie semble être une nécessitée et la clé résiderait dans un équilibre entre thérapie comportementale et traitement pharmacologique. Cependant, la complexité des TSA et la grande diversité de leur éthologie rendent très difficile la mise au point d'un traitement "universel" qui pourrait convenir à tous les patients.

L'autisme est un trouble neuro-développemental complexe que l'on connait depuis de nombreuses années mais dont la compréhension est en permanente évolution. Son étiologie repose sur de nombreux facteurs de risques, tant génétiques qu'environnementaux, dont beaucoup ont été identifiés mais dont les interactions restent méconnues. Si de multiples théories existent pour expliquer l'autisme et la diversité des atteintes qui y sont liées, aucune n'a, à ce jour, amené à une compréhension suffisamment fine de ce trouble pour pouvoir le traiter. Lors de ma thèse, je me suis concentré sur l'étude d'une structure dont l'implication dans les TSA a été de plus en plus mise en avant ces dernières années : le cervelet.

Chapitre 2 : Le cervelet

Le cervelet est une structure du système nerveux central située sous les hémisphères cérébraux et à l'arrière du tronc cérébral. Il pèse en moyenne 140 g chez l'homme adulte, ce qui ne représente que 10 % du poids du cerveau. Sa structure anatomo-fonctionnelle se met en place essentiellement pendant la période postnatale. Avec plus de 50 milliards de neurones, le cervelet contient plus de 50 % des neurones de l'encéphale.

1 - Anatomie descriptive

Schématiquement (*figure 1A)*, en vue dorsale, le cervelet présente deux hémisphères flanquant le vermis central. La masse du cervelet est constituée de trois lobes (antérieur, postérieur et floculonodulaire) séparés par deux fissures transversales profondes et subdivisée par des fissures moins profondes en dix lobules numérotés de I à X dans le vermis. Le cervelet, ou "petit cerveau", se compose, à l'instar du télencéphale, d'un cortex externe autour de substance blanche englobant les noyaux cérébelleux profonds (dentelé, emboliforme, globuleux et fastigial).

D'un point de vue fonctionnel, le cervelet peut-être subdivisé en trois régions apparues successivement au cours de l'évolution (Manto and Habas, 2013).

Le vestibulo-cervelet, partie phylogénétiquement la plus ancienne, est composé des lobes floculo-nodulaires. Il est impliqué dans les réflexes occulomoteurs et dans le maintien de l'équilibre, il traite des informations vestibulaires, proprioceptives et cutanées. Il projette ses efférences vers les noyaux vestibulaires.

Le spino-cervelet correspond aux régions vermales et paravermales du lobe antérieur. Il est impliqué dans les réflexes de maintien et d'adaptation de la posture. Ses afférences sont somesthésiques, vestibulaires, sensorielles mais aussi proprioceptives. Il projette vers les noyaux profonds et vestibulaires.

Enfin, le cérébro-cervelet correspond aux hémisphères ainsi qu'à la zone centrale et postérieure du vermis. Ses afférences sont principalement corticales et il est impliqué dans la planification et la régulation de mouvement fin ainsi que dans différentes taches cognitives, comme nous le verrons dans la partie III.

2 - Histologie (cortex cérébelleux)

Le cortex cérébelleux est composé d'un circuit neuronal canonique (*figure 1C*) et s'organise en trois couches regroupant sept types cellulaires.

La couche moléculaire est la plus externe, elle contient des interneurones inhibiteurs (cellules étoilées et cellules en panier) ainsi que l'arborisation dendritique des CP et les collatérales des axones des cellules granulaires.

La couche granulaire est, elle, la plus interne du cortex cérébelleux et contient, comme son nom l'indique, les corps cellulaires des cellules granulaires mais aussi les cellules de Golgi, les cellules de Lugaro et les cellules unipolaires en brosse.

Enfin la couche intermédiaire est celle des CP. Ces cellules constituent une population centrale dans le cervelet, recevant toutes les informations à différents niveaux de leur arborisation dendritique. Elles intègrent l'information de différentes modalités sensorielles et envoient un message inhibiteur aux noyaux profonds cérébelleux qui véhiculent l'information sortant du cervelet. Les CP reçoivent une innervation excitatrice directe très particulière par les fibres grimpantes issues de l'olive inférieure (une CP est innervée par une seule fibre grimpante chez l'adulte) et une innervation indirecte par les fibres moussues, *via* un réseau dont le premier élément est les cellules granulaires. Les fibres moussues proviennent de nombreux noyaux spinaux et centraux. Les interneurones inhibiteurs de la couche moléculaire modulent l'effet des innervations excitatrices qui convergent sur la CP. De plus, il existe un rétrocontrôle excitateur entre les noyaux cérébelleux et les cellules granulaires (boucle nucléo-corticale) et un rétrocontrôle inhibiteur entre les noyaux cérébelleux et l'olive inférieure (boucle olivo-cortico-nucléaire). Ce circuit serait capable d'adapter les signaux moteurs et pourrait moduler des comportements non moteurs. Cependant, les CP diffèrent de par leur taille, leurs propriétés électriques et l'expression de certaines protéines (Cerminara, 2016). Elles sont regroupées en sous-populations constituant des modules qui traitent des informations sensorielles différentes.

L'interconnexion de ces modules permettrait leur communication en réponse à des stimulations sensorielles multiples qui restent encore à explorer (Voogd, 2014; Cerminara, 2016).

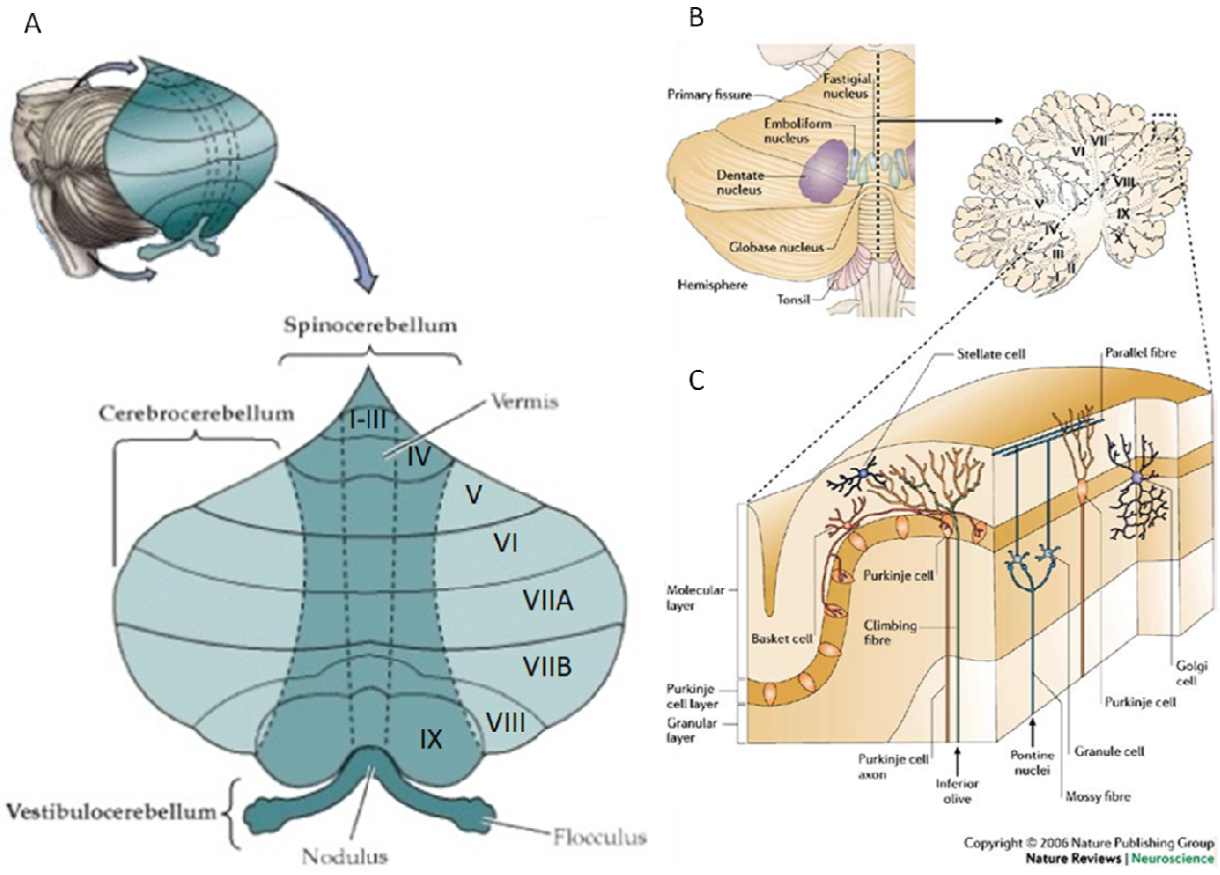


Figure 1: Anatomie du cervelet et organisation cellulaire du cortex cérébelleux.
A. Vue dorsale et organisation lobulaire. **B**. Coupe horizontale : les noyaux cérébelleux.
C. Organisation cellulaire du cortex cérébelleux.

3 - Rôles multiples du cervelet

Le cervelet est depuis longtemps connu pour son rôle dans le contrôle de la motricité (Ito, 2002). Lors de l'initiation d'un mouvement volontaire, le cervelet reçoit d'une part, une copie de l'ordre moteur en provenance du cortex moteur ainsi que des informations vestibulaires, somato-sensorielles directes ou indirectes par l'intermédiaire du néocortex et, d'autre part, une copie du programme d'exécution de l'ordre moteur de la part de la moelle épinière. Le cervelet module la genèse du mouvement et le contrôle au niveau du cortex moteur primaire par l'intermédiaire du thalamus. Il confère ainsi aux programmes moteurs du mouvement une organisation chronologique, somatotopique et spatio-temporelle (figure 2A). Dans ce contexte,

le rôle du cervelet serait de générer un modèle interne de l'appareil moteur et de l'environnement en utilisant les informations sensorielles (Therrien and Bastian, 2015). Le cervelet participe également à l'apprentissage moteur tel que l'adaptation du réflexe vestibulo-oculaire. Il nous permettrait également d'anticiper le futur par une adaptation prédictive du mouvement en relation avec les informations sensorielles (Bastian, 2006; Schlerf et al., 2012).

L'atteinte du circuit cérébelleux conduit à un déficit moteur se traduisant par des gestes maladroits et une difficulté pour le patient à exécuter des gestes fins et précis. Son écriture est irrégulière dans le sens horizontal et vertical. On observe une dysmétrie accompagnée d'une hypermétrie, une asynergie (mauvaise coordination motrice, le mouvement n'est plus lié mais décomposé) et une mauvaise répartition du tonus dans les muscles antigravitaires. Un retard à la mise en route et à l'arrêt du mouvement (dyschronométrie), l'impossibilité de faire des mouvements associés rapides (adiadococinésie) et des tremblements sont également observés. On parle d'ataxie cérébelleuse en référence à la mauvaise coordination des mouvements. Les lésions du cervelet causent également des déficits oculomoteurs comme des saccades dysmétriques et un nystagmus qui peuvent indirectement affecter la perception visuelle. On pense que le cervelet recalibre la perception visuelle de la dynamique des stimulations visuelles (Therrien and Bastian, 2015).

Des études récentes menées sur les connections afférentes et efférentes du cervelet (figure 2B), utilisant des virus neurotropes comme traceurs transneuronaux ainsi que des approches éléctrophysiologiques (Bostan et al., 2013) ont participé à modifier cette vision purement motrice de la fonction du cervelet et l'impliquent à présent dans des fonctions plus complexes, telles que les processus perceptuels (Baumann et al., 2015). En effet, les noyaux cérébelleux projettent sur de nombreuses régions du néocortex, tels que les cortex prémoteur, préfrontal, et pariétal postérieur par l'intermédiaire de multiples noyaux thalamiques.

Le cervelet est également connecté aux ganglions de la base qui jouent non seulement un rôle dans la programmation et le contrôle des mouvements, mais également dans la motivation des comportements, le traitement de processus cognitifs et la régulation de l'humeur (Manto and Habas, 2013). Le cervelet est connecté au système limbique et notamment à l'hippocampe au

niveau duquel il pourrait influencer la navigation spatiale (Rochefort et al., 2013). Le cervelet serait nécessaire à la construction de la représentation spatiale par l'hippocampe du fait de sa participation au traitement de l'information du mouvement propre de l'individu (Lefort et al., 2015). Finalement, le cervelet est connecté à l'amygdale, structure essentielle pour l'attribution d'une valence émotionnelle aux stimuli sensoriels, tels que les indices sociaux-affectifs faciaux (Murray et al., 2014). Les bases neuro-anatomiques de l'implication du cervelet dans les processus cognitifs ont ainsi été établies.

Des études récentes en imagerie démontrent que certaines zones du cervelet sont activées lors de la réalisation de tâches cognitives. Il est intéressant de noter que les lobules qui s'activent lors de tâches cognitives et émotionnelles sont différents des lobules qui s'activent lors de tâches motrices. Par exemple, le lobule VI, VII (Crus I, CrusII, VIIB) et le lobule VII médian, connectés aux régions associatives du cortex cérébral, sont fortement activés lors de tâches cognitives et émotionnelles (Bostan et al., 2013). De ce fait, les effets moteurs et non-moteurs des lésions cérébelleuses vont dépendre de leur localisation. Par exemple, des lésions des parties postérieures du cervelet perturbent les fonctions exécutives (planification, raisonnement abstrait, mémoire de travail), la cognition spatiale (organisation visuo-spatiale, mémoire spatiale), le langage (agrammatisme, dysprosodie) et provoquent des changements de personnalité que l'on appelle plus généralement syndrome cérébelleux affectif et cognitif (problèmes affectifs, comportements inappropriés, irritabilité, isolement social) (Schmahmann and Sherman, 1998). Des lésions des parties antérieures induisent des déficits moteurs sans troubles cognitifs (Schmahmann and Sherman, 1998; Schmahmann, 2004; Siuda et al., 2014). Les troubles moteurs chez les patients cérébelleux peuvent être aussi associés à des déficits de perception visuelle et de proprioception (Therrien and Bastian, 2015). L'atteinte du cervelet pourrait sous-tendre des pathologies complexes telles que certaines formes de dystonie, qui se traduisent par des mouvements involontaires, des contractions soutenues donnant lieu à des mouvements répétitifs et à des torsions posturales (Reeber et al., 2013). Des différences anatomiques du cervelet, entre patients et sujets sains, sont également observées dans des pathologies d'ordre psychiatrique telles que la schizophrénie, où une diminution du volume du lobe antérieur du vermis peut être détectée (Parker et al., 2014), les troubles bipolaires où une

atrophie du cervelet peut être observée et, comme nous le verrons, également dans le cas de l'autisme (Reeber et al., 2013; Phillips et al., 2015).

The Purkinje cell : as an integrative machine

Anaïs Grangeray, Kevin Dorgans, **Sébastien Roux** et Jean-Louis Bossu

In : Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders (2016) pp 183-188

Institut des Neurosciences Cellulaires et Integratives CNRS et Université Louis Pasteur UPR 3212 5 rue Blaise Pascal F-67084 Strasbourg Cedex 03

The Purkinje cell: as an integrative machine

Anais Grangeray, Kevin Dorgans, Sebastien Roux, and Jean-Louis Bossu

Institut des Neurosciences Cellulaires et Integratives CNRS et Université Louis Pasteur UPR 3212 5 rue Blaise Pascal F-67084 Strasbourg Cedex 03

jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr

Abstract

The aim of this chapter is to discuss how the spontaneous activity, the simple spike and the complex spike are generated and modulated depending on the channel types expressed on the somatic and dendritic Purkinje cell membranes. Finally, we will shortly address the surprising role of PCs in the physiopathology of autism.

A brief histological prerequisite on Purkinje cells

Purkinje cells (PCs) were discovered in 1837 by a Czech anatomist, Jan Evangelista Purkyně and further nicely illustrated by Ramón y Cajal in 1899 using Golgi's staining method. This cell is considered as one of the most fascinating neurons for neuroscientists. PCs have a very large dendritic arbor decorated with little spines. The dendritic arbor stems from a primary dendrite that emerges from a large pear-shaped cell body with a single axon originating from the other end (see Figure 1a). PC somas are Calbindin-positive and aligned in the cerebellar cortex to form the PC layer.

Introduction

PCs which are spontaneously active, receive two excitatory inputs from distinct fiber systems: parallel fibers (PF) and climbing fibers (CF) (Figure 1a). Those inputs provide electrical signals that are integrated and modulated along the PC dendritic tree and soma due to the presence of a large battery of ionic channels. Each PC receives converging inputs from about 200 000 PF synapses. Stimulation of PF releases glutamate and produces simple spikes (SS) in PCs (Figure 1b, left panel) at various frequencies. CF originate from the inferior olive nucleus and unlike PF, one CF contacts a few PCs. In adult animals, after a fascinating synaptic elimination, each PC receives only one single CF. Stimulation of CF releases glutamate on PC soma and dendrites giving rise to a complex spike (CS) a massive electrical firing event (Figure 1b, right panel). Finally, action potentials (AP) propagate along the PC axon and trigger GABA release on deep cerebellar nuclei (DCN) neurons.

I. Spontaneous activity of PCs

In vivo the spontaneous activity of PCs consists in tonic SS trains at frequencies ranging between 50-125 Hz and CS at 1Hz due to spontaneous CF activation (Latham & Paul, 1971). SS as well as CS are synchronized for pairs of PCs localized in the same cortical zone, this synchronization is under the control of sensory inputs (Wise et al., 2010).

This activity has a pacemaker component independent of excitatory synaptic inputs, characterized *in vitro* as an irregular pattern of discharge with a frequency of 40 Hz (Figure 1c, left panel) the pattern is controlled by GABAergic inhibition (Hausser et al, 1997). A trimodal pattern of pacemaker activity (tonic, bursting and silent modes, Figure 1c, right panel) has been also depicted and is probably induced by the lack of CF input. Its existence (explained by a PC's bistability with two stable levels of membrane potential: a quiescent hyperpolarized state and a depolarized state with firing under control of Ih) *in vivo* is still under debate. (Engbers et al, 2013 for review).

a. *Ionic mechanism of the pacemaker activity of PCs*

It was postulated that PC pacemaker activity was driven by low threshold TTX sensitive Na-current and a large TEA sensitive K-current (Nam & Hockberger, 1997; Raman & Bean, 1999). A role of Ih has been proposed. This current maintains the membrane potential within a range where the inward Na-current responsible for the generation of spontaneous AP firing can be activated (Williams et al., 2002). Thus, inhibition of the Ih current leads to quiescent periods. Apamin sensitive small conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels (SK) activated by Ca^{2+} entering through P-type Ca^{2+} channels control the pacemaker firing frequency (Edgerton & Reinhart 2003). In PCs with a trimodal pattern, blockade of large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels (BK) shortened the duration of the trimodal pattern (Womack & Khodakhah, 2003; Womack et al 2009) whereas dendritic Ca^{2+}-T-type, BK and SK channels contribute to interspike and interburst intervals. P/Q Ca^{2+} channels are required to sustain spontaneous bursting (Womack et al, 2004). A partial blockade of

P/Q channels eliminates dendritic Ca^{2+}-spikes and causes a switch from regular bursting to tonic firing or irregular bursting (Walter et al., 2006).

b. Modulation of the spontaneous activity of PCs

CF and PF activation can modulate PC spontaneous activity. *In vivo* stimulation of CF is immediately followed by a pause in the spontaneous discharge. This effect is also depicted in PCs recorded in acute slices prepared from mouse cerebellum (see Figure 1b, right panel). After the pause an increase in SS activity is regularly observed and is often followed by a reduction of the SS frequency (De Zeeuw et al., 2011 for a review and possible mechanisms). *In vivo* removal of CF input induces an increase of spontaneous discharge frequency or even a slow oscillatory pattern of discharge. Repetitive CF discharge can also convert the spontaneous trimodal PC discharge pattern (recorded *in vitro*) to a non-bursting pattern. This pattern consists in spike trains interrupted by CF-evoked pauses or longer pauses associated with state transitions (Engbers et al, 2013 for a review).

Concerning the PF modulation, *in vivo* when excitatory inputs from GCs are chronically reduced the SS firing regularity increased without alteration of the spiking frequency. Furthermore, *in vitro*, when the PFs are stimulated an inhibition of the spontaneous activity is depicted (Figure 1 b, left panel; De Zeeuw et al., 2011 for a review).

c. Physiological role of the spontaneous activity of PCs

PC activity plays a role in sensory-motor calibration. In a recent review Medina et al. (2011) proposed a model where PC activity is used in three different ways in the early stages of sensory-motor calibration (First, sensory and motor prediction. Second, teaching signal. Third, motor command). Interestingly, using optogenetic inhibition of PCs activity in awake mice, Heiney et col. (2014) have demonstrated that a transient suppression of the spontaneous activity in a sub-population of PCs causes discrete movements with variations in size, speed and timing depending on the duration and intensity of the inhibition.

II. The simple spike and the complex spike.

a. The simple spike induced by parallel fibers stimulation

A simple electrical stimulation of PFs releases glutamate and produces small depolarizing synaptic potentials (DSPs) at many synaptic sites dispersed on the dendritic arborization. DSPs temporally and spatially summate to reach the proximal axon where a high frequency of discharge of SS is generated (Palmer et al., 2010). The DSPs are modified in amplitude and shape during their passive propagation in the dendritic tree and are also modulated by ionic-channel conductances on the dendritic and somatic membrane. This integration is highly conditioned by PCs morphology (large dendritic tree and soma) but especially by the expression of many channels types such as P/Q (Cav2.1) and T type (Cav3) Ca^{2+} channels, voltage-gated K^+ channels (Kv1, Kv3.3) Ca^{2+}-activated K^+ channels (BK, SK) and Ih. For example, the Cav3 associated with a intermediate conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels suppresses the temporal summation of DSPs generated by PFs activation (Engbers et al.,2012).

b. The complex spike induced by CF stimulation

Stimulation of CFs results in a massive depolarization of dendrites giving rise CS in the soma. The CS is primarily mediated by Na^+ channels and in some extent by Ca^{2+} channels. It consists in a large depolarization inducing one initial fast action potential followed by one to six smaller spikelets. The CS is followed by an hyperpolarization mediated by Ca^{2+}-activated K^+-channels (De Zeeuw, 2011 for a review). T-type Ca^{2+} channels activated by CF stimulation participate to the CS waveform, whereas somatic Kv3.3 channels are required for spikelet generation (Kitamura and Kano, 2013 for a review). The fast initial spike and the spikelets (driven by Na^+) are initiated in the initial axon (Palmer et al., 2010). Stimulation of CF also triggers dendritic Ca^{2+} spikes mediated by P/Q type Ca^{2+}-channels. Ca^{2+}-spikes are not necessary for CS generation but regulate the pause in firing following the CS, probably by activating Ca^{2+}-dependent K^+-channels (Davie et al., 2008).

III. PCs and autistic syndromes

Autism, a childhood mental disorder, belongs to a group of disorders collectively referred as Autism Spectrum Disorders (ASDs). During the last decade, imaging and autopsy studies of autistic patients have shown cerebellar abnormalities. Interestingly, it has been shown in mice that a PC loss is associated with autistic syndromes such as repetitive behaviors and increased activity (Martin et al. 2010). When the Tsc1 gene-deletion is restricted to PCs, a loss of PCs is observed with an alteration of the excitability of the remaining PCs. This mutant mouse also shows autistic-like behavior (Tsai et al., 2012). Prenatal exposition to sodium-valproate induces several autistic symptoms in mice (Roullet et al.,2013) such as repetitive behaviors (Figure 2, left panel jlb unpublished data). Using the autistic model of valproate-treated mice, we show a global PC loss of about 25% with variations among cerebellar lobules (Figure 2, right panel jlb unpublished data). One important challenge for the following years would be to determine whether a PCs loss associated with modifications of PC excitability can induce autistic syndromes in adult mice.

References

Davie JT, Clark BA, Häusser M (2008) The origin of the complex spike in cerebellar Purkinje cells. J Neurosci 28(30):7599-7609.

Edgerton JR, Reinhart PH (2003) Distinct contributions of small and large conductance Ca2+-activated K+ channels to rat Purkinje neuron function. J Physiol 548(Pt 1):53-69.

Engbers JD, Anderson D et al (2012) Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. Proc Natl Acad Sci U S A 109(7):2601-2606.

Engbers JD, Fernandez FR, Turner RW (2013) Bistability in Purkinje neurons: ups and downs in cerebellar research. Neural Netw 47:18-31.

Häusser M, Clark BA (1997) Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. Neuron 19(3):665-678.

Heiney SA, Kim J et al (2014) Precise control of movement kinematics by optogenetic inhibition of Purkinje cell activity. J Neurosci 34(6):2321-2330.

Kitamura K, Kano M (2013) Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. Neural Netw 47:11-17.

Latham A, Paul DH (1971) Spontaneous activity of cerebellar Purkinje cells and their responses to impulses in climbing fibres. J Physiol 213(1):135-156.

Martin LA, Goldowitz D, Mittleman G 2010 Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. Eur J Neurosci 31(3):544-555.

Medina JF (2011) The multiple roles of Purkinje cells in sensori-motor calibration: to predict, teach and command. Curr Opin Neurobiol 21(4):616-622.

Nam SC, Hockberger PE (1997) Analysis of spontaneous electrical activity in cerebellar Purkinje cells acutely isolated from postnatal rats. J Neurobiol (1):18-32.

Palmer LM, Clark BA, Gründemann J et al (2010) Initiation of simple and complex spikes in cerebellar Purkinje cells. J Physiol 588(Pt 10):1709-1717.

Raman IM, Bean BP (1999) Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 19(5):1663-1674.

Roullet FI, Lai JK, Foster JA (2013) In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. Neurotoxicol Teratol 36:47-56.

Tsai PT, Hull C, Chu Y et al (2012) Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. Nature 488(7413):647-651

Williams SR, Christensen SR, Stuart GJ et al (2002) Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current I(H) in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro. J Physiol 539(Pt 2):469-483.

Wise AK, Cerminara NL, Marple-Horvat DE et al (2010) Mechanisms of synchronous activity in cerebellar Purkinje cells. J Physiol 588(Pt 13):2373-2390.

Womack MD, Khodakhah K (2003) Somatic and dendritic small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 23(7):2600-2607.

Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2004) Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 24(40):8818-8822.

Womack MD, Hoang C, Khodakhah K (2009) Large conductance calcium-activated potassium channels affect both spontaneous firing and intracellular calcium concentration in cerebellar Purkinje neurons. Neuroscience162(4):989-1000

De Zeeuw CI, Hoebeek FE, Bosman LW et al (2011) Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum. Nat Rev Neurosci 12(6):327-344.

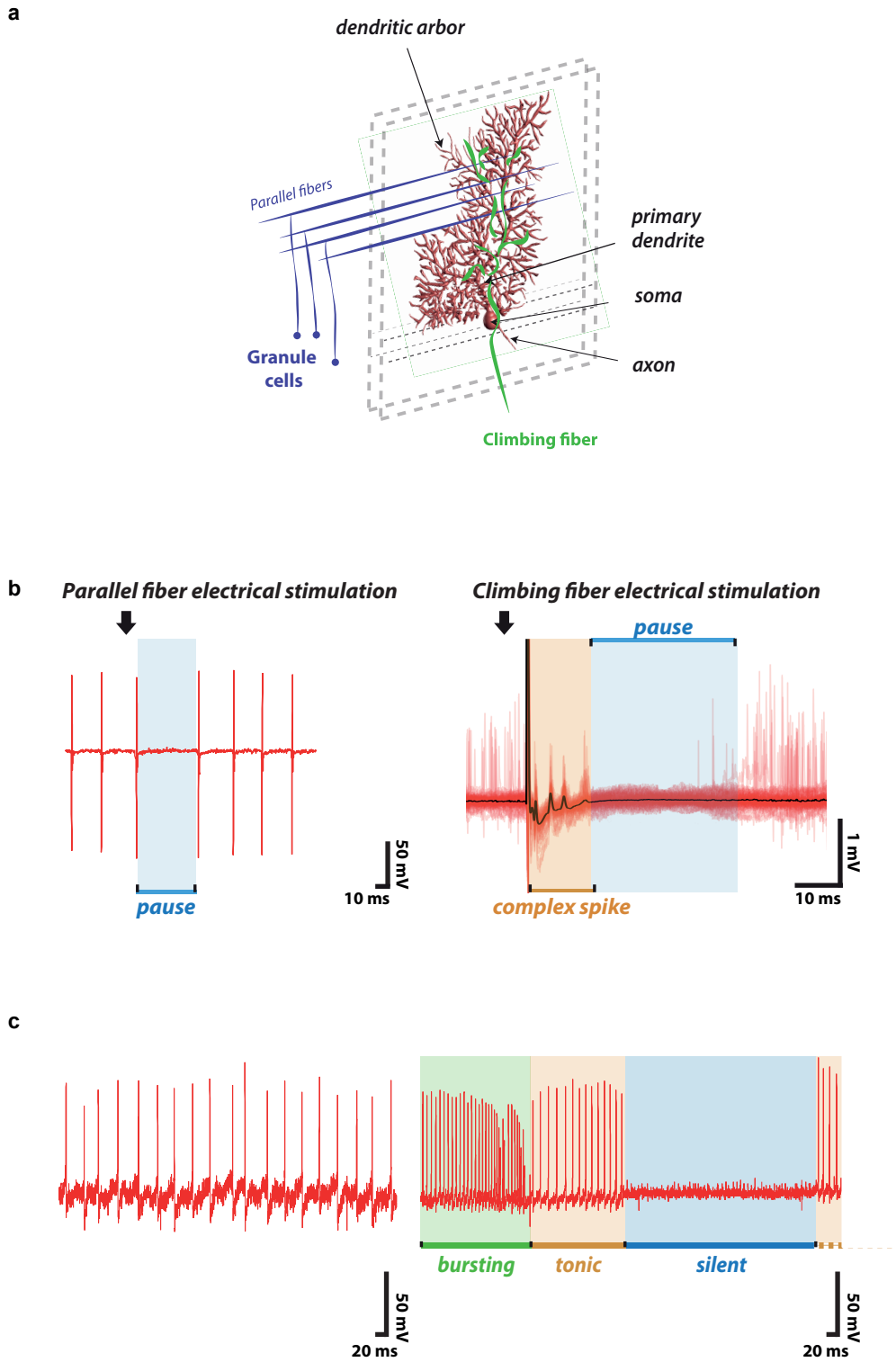


Fig. X.1 **a** 3D reconstruction of PC. Afferences are also drawn, **b** Evoked spiking by climbing-fiber and parallel-fiber inputs, **c** Spontaneous activity and trimodal pattern of Purkinje cells (extracellular recordings in acute slices)

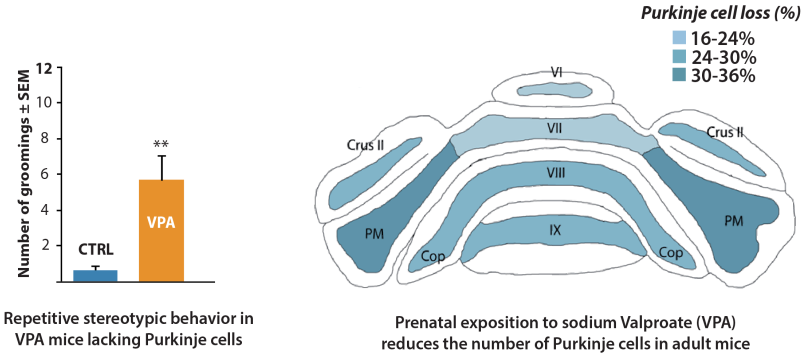


Fig. X.2 Repetitive stereotypic behavior and loss of Purkinje cells in a valproate treated mouse

Chapitre 3 : Autisme et cervelet

Je vais ici résumer les points permettant de faire des liens entre le cervelet et l'autisme. Ces points sont détaillés de façon plus exhaustive dans la revue inclue dans ce chapitre.

Les projections du cervelet innervent de nombreuses zones cérébrales, impliquées notamment dans le contrôle moteur mais également dans des tâches cognitives tels que l'apprentissage du langage (vermis postérieur), les émotions et la perception sensorielle, dans lesquelles il agit comme un modulateur (D'Angelo and Casali, 2012; Reeber et al., 2013; Strata, 2015). Le cervelet joue aussi un rôle dans les réponses reflexes, la représentation mentale, les comportements affectifs et l'acquisition de données sensorielles, fonctions souvent touchées dans l'autisme et dont les déficiences pourraient être expliquées par les atteintes observées au niveau du cervelet (Fatemi et al., 2012). En effet, des données issues d'études post-mortem, réalisées sur des cerveaux de patients autistes, ont montré une diminution du nombre de CP au niveau latéral des lobes postérieurs du cortex cérébelleux (Ritvo et al., 1986).

Des études regroupées par Fatemi et al. ont permis de mettre en évidence une implication du cervelet, non seulement au niveau des interactions sociales, mais également dans des processus cognitifs et les émotions (Fatemi et al., 2012). L'importance du vermis médian postérieur, lié au système limbique, a été démontrée par l'étude de lésions de cette zone, provoquant des déficits cognitifs légers ainsi que des déficits de l'expression, des fonctions exécutives et du langage (notamment pour le débit, le phrasé, ou encore l'accentuation). Ces lésions mèneraient également à une désinhibition ou à un émoussement des comportements affectifs. Autant de symptômes caractéristiques de l'autisme, qui renforcent l'hypothèse d'un rôle majeur du cervelet, et, ici, plus particulièrement du vermis médian postérieur, dans la mise en place de la pathologie. Si les patients cérébelleux montrent des symptômes qui s'apparentent à l'autisme, les autistes eux aussi présentent fréquemment des troubles suggérant une atteinte cérébelleuse. En effet, jusqu'à 80% des sujet TSA présentent des altérations motrices qui débutent durant l'enfance et se poursuivent jusqu'à l'âge adulte (Becker and Stoodley, 2013). On peut noter ici des déficits des mouvements fins ou plus large, tels que des mouvements lents et répétés des mains et des pieds, une imprécision de la dextérité manuelle, une instabilité posturale ainsi qu'une altération de la démarche.

Ces résultats sont renforcés par des études d'imagerie montrant une fréquence de survenue élevée d'une hypoplasie du vermis, notamment des lobules 6 et 7, chez les sujets autistes (Skefos et al., 2014). Cette hypoplasie cérébelleuse, ainsi que le nombre réduit en CP, sont les atteintes neuropathologiques les plus souvent rapportées pour les TSA. La neuropathologie cérébelleuse dans les TSA ne se limite pas à ces seules atteintes, on constate également une augmentation de la glie de Bergmann, une diminution de la taille et du nombre de cellules dans les noyaux cérébelleux ainsi qu'une activité neuroinflamatoire au niveau de la matière blanche (Rogers et al., 2013).

Des études d'imagerie fonctionnelle ont également mis en évidence des différences d'activité au sein du cervelet. Les patient TSA ont, par exemple, une activation plus importante que les contrôles des circuits thalamo-cérébelleux lors d'une tache de saccade oculaire guidée visuellement (Takarae et al., 2007), ainsi que de la partie antérieure de l'hémisphère ispsilatérale du cervelet lors d'une tache motrice simple (Allen et al., 2004). Catani et al ont montré en 2008 que la diminution de la matière blanche cérébelleuse était positivement corrélée avec la sévérité des déficits sociaux (Catani et al., 2008).

Les déficits cérébelleux semblent ainsi jouer un rôle dans la symptomatologie des TSA et ces données obtenues chez l'homme ont étés renforcées par l'étude de modèles animaux de l'autisme.

Tsai et al. (2012) ont mis en évidence un lien direct entre une perte en CP et les symptômes autistiques, grâce à un modèle de souris transgénique où le gène TSC (Tuberous sclerosis complex), codant pour l'harmatine, une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire, est inactivé spécifiquement dans les CP. Cette mutation conduit à une forte diminution du nombre de CP, associée à des anomalies morphologiques de l'arborisation dendritique des CP survivantes. Ils ont montré, via des tests comportementaux, que ces souris présentaient une forte isomorphie avec l'autisme : diminution des interactions sociales, inflexibilité et absence de préférence pour la nouveauté (Tsai et al., 2012). Cette étude est la première à montrer qu'une perte en CP est suffisante pour induire des comportements autistiques.

Afin de mieux comprendre l'origine des déficits observés, ils ont également étudié le fonctionnement du réseau neuronal du cervelet *via* des mesures éléctrophysiologiques. Ils montrent une absence de différence des réponses évoquées, enregistrées au niveau des CP lors d'une stimulation des fibres grimpantes ou des fibres parallèles, par rapport aux contrôles. Ils ont ensuite mesuré l'activité de décharge des potentiels d'actions des CP et ont montré, chez ce modèle, une réduction de la fréquence de leur décharge, ainsi qu'une diminution de leur excitabilité. Le dérèglement de l'activité des CP pourrait être à l'origine de certains syndromes autistiques.

L'ensemble de cette étude montre qu'une perte en CP, associée à des changements de leur morphologie et de leur excitabilité, est suffisante pour induire des comportements autistiques chez une souris.

Allant encore plus loin, ce même groupe a montré l'existence de connexions fonctionnelles entre le Crus1 droit et différents réseaux impliqués dans l'autisme, comme le réseau frontopariétale, chez l'humain et chez la souris (Stoodley et al., 2017). Ils ont aussi montré que ces connexions étaient altérées chez les patients TSA et les modèles murins de l'autisme. Enfin, ils ont réussi à induire un comportement autistique chez des souris contrôles en inhibant spécifiquement les CP dans le Crus1 droit, mais aussi à récupérer des déficits sociaux présents dans leurs modèles en stimulant, cette fois spécifiquement, les CP dans le Crus1 droit.

Les exemples et démonstrations d'une implication du cervelet dans l'autisme sont aujourd'hui nombreux. Une large part des connaissances acquises l'a été grâce aux modèles animaux d'étude de l'autisme.

Le cervelet, des troubles moteurs à l'autisme

Sébastien Roux et Jean-Louis Bossu

Institut des Neurosciences Cellulaires et Integratives CNRS et Université Louis Pasteur UPR 3212 5 rue Blaise Pascal F-67084 Strasbourg Cedex 03

Neuropsychologie 2016 ; 8 (3) : 182 - 191

John Libbey EUROTEXT

L'essentiel de l'information scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/nrp/sommaire.md?type=text.html

Montrouge, le 24/09/2016

Jean-Louis Bossu

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :
Le cervelet : des troubles moteurs à l'autisme

paru dans
Revue de neuropsychologie, 2016, Volume 8, Numéro 3

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire. Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.
© John Libbey Eurotext, 2016

Article de synthèse

Rev Neuropsychol

2016 ; 8 (3) : 182-91

Le cervelet : des troubles moteurs à l'autisme

The cerebellum: from motor diseases to autism

Sébastien Roux, Jean-Louis Bossu

Institut des neurosciences cellulaires et intégratives,
CNRS UPR 3212,
5, rue Blaise-Pascal,
67084 Strasbourg, France
<jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr>

Pour citer cet article : Roux S, Bossu JL. Le cervelet : des troubles moteurs à l'autisme. *Rev Neuropsychol* 2016 ; 8 (3) : 182-91 doi:10.1684/nrp.2016.0385

Résumé

L'autisme est une pathologie neurologique aux conséquences comportementales sévères regroupées sous le terme de troubles du spectre autistique. Ses origines peuvent être génétiques mais dans la plupart des cas l'autisme est considéré comme une pathologie idiopathique. Le lien entre un dysfonctionnement de certains réseaux neuronaux et l'autisme n'a pas été clairement établi et les mécanismes pathophysiologiques qui lui sont associés restent encore mal connus. Les pathologies du cervelet dans certains cas d'autisme sont connues depuis plus de 20 ans. Au-delà du rôle majeur du cervelet dans le contrôle de l'équilibre, de la coordination motrice et dans l'apprentissage moteur, on sait que le petit cerveau (du latin *cerebellum*) est aussi impliqué dans certaines fonctions complexes telles que la régulation des émotions et de l'attention ainsi que dans l'apprentissage du langage. La maturation anatomique et fonctionnelle du cervelet est principalement postnatale, il est donc probable qu'il joue un rôle dans le développement des capacités cognitives de l'enfant. Cette revue fait la synthèse des connaissances cliniques, anatomopathologiques et en imagerie ainsi que sur les modèles animaux, qui soulignent l'importance du cervelet dans l'autisme. Enfin, elle propose quelques axes de recherche sur le rôle majeur du cervelet dans l'autisme.

Mots clés : autisme • cervelet • neuropathologie • cellule de Purkinje

Introduction

L'autisme est une pathologie neurodéveloppementale complexe et hétérogène touchant près de un enfant sur 150 en France, d'après les données recueillies par la Haute Autorité de Santé, en 2012. Cette prévalence est en augmentation de 1,25 % en 2011-2013 à 2,24 % en 2014 aux États-Unis [1]. L'autisme résulte, en général, d'un développement anormal du cerveau pendant la grossesse et après la naissance conduisant à une augmentation du volume du cerveau entre 2 et 4 ans et à des anomalies des microcolonnes du cortex [2, 3]. Selon le DSM-5 (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders* publié par l'American Psychiatric Association, fifth edition, Washington, DC : 2013) qui introduit la notion de troubles du spectre autistique (TSA), le diagnostic de l'autisme est basé sur l'observation de deux catégories de symptômes :

– des troubles de la communication sociale touchant notamment la réciprocité des interactions, les comportements de communication verbale et non verbale, ainsi que la capacité à développer, maintenir et comprendre une relation avec autrui ;

– des comportements restreints et répétitifs.

Ces symptômes sont présents dès la petite enfance mais se manifestent pleinement quand la limitation des capacités empêche de répondre aux exigences sociales [4]. Selon les individus, les TSA sont associés à d'autres désordres psychiatriques et médicaux tels que l'épilepsie, l'hyperactivité, l'anxiété, les troubles du sommeil, des difficultés motrices, des problèmes gastro-intestinaux. Il est difficile de décrire l'autisme au vu de la grande diversité des traits de cette pathologie et de leurs causes. L'étiologie de l'autisme reste à ce jour mal définie mais semble invariablement multifactorielle. L'autisme a des origines génétiques, les études menées sur des jumeaux montrent un taux de concordance très élevé chez des jumeaux monozygotes (80-90 %) par rapport aux jumeaux dizygotes où il n'est que de 0 à 30 % [5, 6]. Le nombre de gènes responsables de formes « monogéniques » de TSA est estimé à plus de 400. Ils sont impliqués notamment dans l'organisation neuronale et corticale, dans la formation des synapses, dans la neurotransmission et l'excitabilité neuronale [7]. Cependant, il apparaît de plus en plus clairement que des facteurs environnementaux pourraient contribuer à l'étiologie de cette pathologie. Ainsi, l'exposition à des agents tératogènes (valproate de sodium, mercure, pesticides) durant la grossesse

Tiré à part auteur

doi:10.1684/nrp.2016.0385

© John Libbey Eurotext, 2016

augmente les risques de développement de l'autisme chez les enfants [8]. Des facteurs génétiques et environnementaux pourraient ainsi contribuer à la genèse de l'autisme [9].

Au niveau cellulaire, il est possible que les TSA impliquent partiellement une dérégulation de la balance entre l'excitation (nombre de neurones excitateurs et efficacité de neurotransmission excitatrice) et l'inhibition (nombre de neurones inhibiteurs et efficacité de la neurotransmission inhibitrice) dans les structures du système nerveux qui gouvernent les fonctions sensorielles et mnésiques ainsi que la sociabilité et les émotions [10]. On sait que suite à une modification du gradient aux ions chlorures au cours du développement, le GABA, excitateur chez les neurones « immatures », devient inhibiteur chez les neurones « matures ». La persistance de neurones « immatures » excitables par le GABA serait impliquée dans la dérégulation de la balance excitation/inhibition responsable des TSA [11].

La majorité des études d'imagerie cérébrale réalisées chez des patients autistes s'est focalisée sur des structures impliquées dans les comportements sociaux, le langage et la flexibilité comportementale et cognitive. Cependant, tous les réseaux neuronaux affectés dans cette pathologie n'ont pas été décrits et les mécanismes pathophysiologiques sous-jacents restent encore mal connus. Le cervelet est régulièrement cité comme structure du système nerveux mise en cause dans l'autisme. Dès 1986, Ritvo *et al.* [12] décrivent un déficit de cellules de Purkinje dans le cervelet de patients autistes dans une étude *post mortem*. Depuis, plus de 600 publications associent autisme et cervelet. Cette structure primordiale dans le contrôle moteur est également impliquée dans le traitement des signaux essentiels à la perception, la cognition et aux émotions [13].

Après un court rappel sur l'anatomie, l'organisation cellulaire et le rôle du cervelet, cette revue fait le point sur la littérature incriminant le cervelet dans l'apparition et le développement des troubles autistiques.

Le cervelet

Anatomie descriptive

Le cervelet est situé sous les hémisphères cérébraux et pèse en moyenne 140 g chez l'homme adulte, ce qui ne représente que 10 % du poids du cerveau. Sa structure anatomo-fonctionnelle se met en place essentiellement pendant la période postnatale, avec plus de 50 milliards de neurones, le cervelet contient plus de 50 % des neurones de l'encéphale. Schématiquement (*figure 1A*), en vue dorsale, le cervelet présente deux hémisphères flanquant le vermis central. La masse du cervelet est constituée de trois lobes (antérieur, postérieur et floculonodulaire) séparés par deux fissures transversales profondes et subdivisés par des fissures moins profondes en dix lobules numérotés de I à X, le lobule VII étant subdivisé en Crus I, Crus II et VIIB. Le cervelet se compose d'un cortex externe autour de la substance blanche englobant les noyaux cérébelleux profonds (dentelé, emboliforme, globuleux et fastigial ; *figure 1B*).

Histologie

Le cortex cérébelleux est composé d'un circuit neuronal canonique (*figure 1C*). Les cellules de Purkinje reçoivent toutes les informations à différents niveaux de leur arborisation dendritique. Ces cellules intègrent l'information de différentes modalités sensorielles et envoient un message inhibiteur aux noyaux profonds cérébelleux qui véhiculent l'information sortant du cervelet. Les cellules de Purkinje reçoivent une innervation excitatrice directe très particulière par les fibres grimpantes issues de l'olive inférieure (une cellule de Purkinje est innervée par une seule fibre grimpante chez l'adulte) et une innervation indirecte par les fibres moussues *via* les cellules granulaires. Les fibres moussues proviennent de nombreux noyaux spinaux et centraux. Des interneurones inhibiteurs (cellules en panier, étoilées. . .) modulent l'effet des innervations excitatrices qui convergent sur la cellule de Purkinje. De plus, il existe un rétro-contrôle excitateur entre les noyaux cérébelleux et les cellules granulaires (boucle nucléo-corticale) et un rétro-contrôle inhibiteur entre les noyaux cérébelleux et l'olive inférieure (boucle olivo-cortico-nucléaire). Ce circuit serait capable d'adapter les signaux moteurs et pourrait moduler des comportements non moteurs. Cependant, les cellules de Purkinje ne sont pas toutes identiques en taille et par leurs propriétés électriques et l'expression de certaines protéines [14]. Elles sont regroupées en sous-populations constituant des modules traitant des informations sensorielles différentes. L'interconnection de ces modules permettrait leur communication en réponse à des stimulations sensorielles multiples qui restent encore à explorer [14-16].

Rôles multiples du cervelet

Le cervelet contrôle la motricité. Une commande motrice volontaire provoque l'arrivée dans le cervelet, d'une part, d'informations vestibulaires, somatosensorielles directes ou indirectes par l'intermédiaire du néocortex et, d'autre part, d'une copie de l'ordre moteur en provenance du cortex moteur et du programme d'exécution de l'ordre moteur de la part de la moelle épinière. Le cervelet module la genèse du mouvement et le contrôle au niveau du cortex moteur primaire par l'intermédiaire du thalamus. Il confère ainsi aux programmes moteurs du mouvement une organisation chronologique, somatotopique et spatio-temporelle (*figure 2A*). Dans ce contexte, le rôle du cervelet serait de générer un modèle interne de l'appareil moteur et de l'environnement en utilisant les informations sensorielles [17]. Le cervelet participe également à l'apprentissage moteur tel que l'adaptation du réflexe vestibulo-oculaire. Il nous permettrait également d'anticiper le futur par une adaptation prédictive du mouvement en relation avec les informations sensorielles [18, 19].

Tirés à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

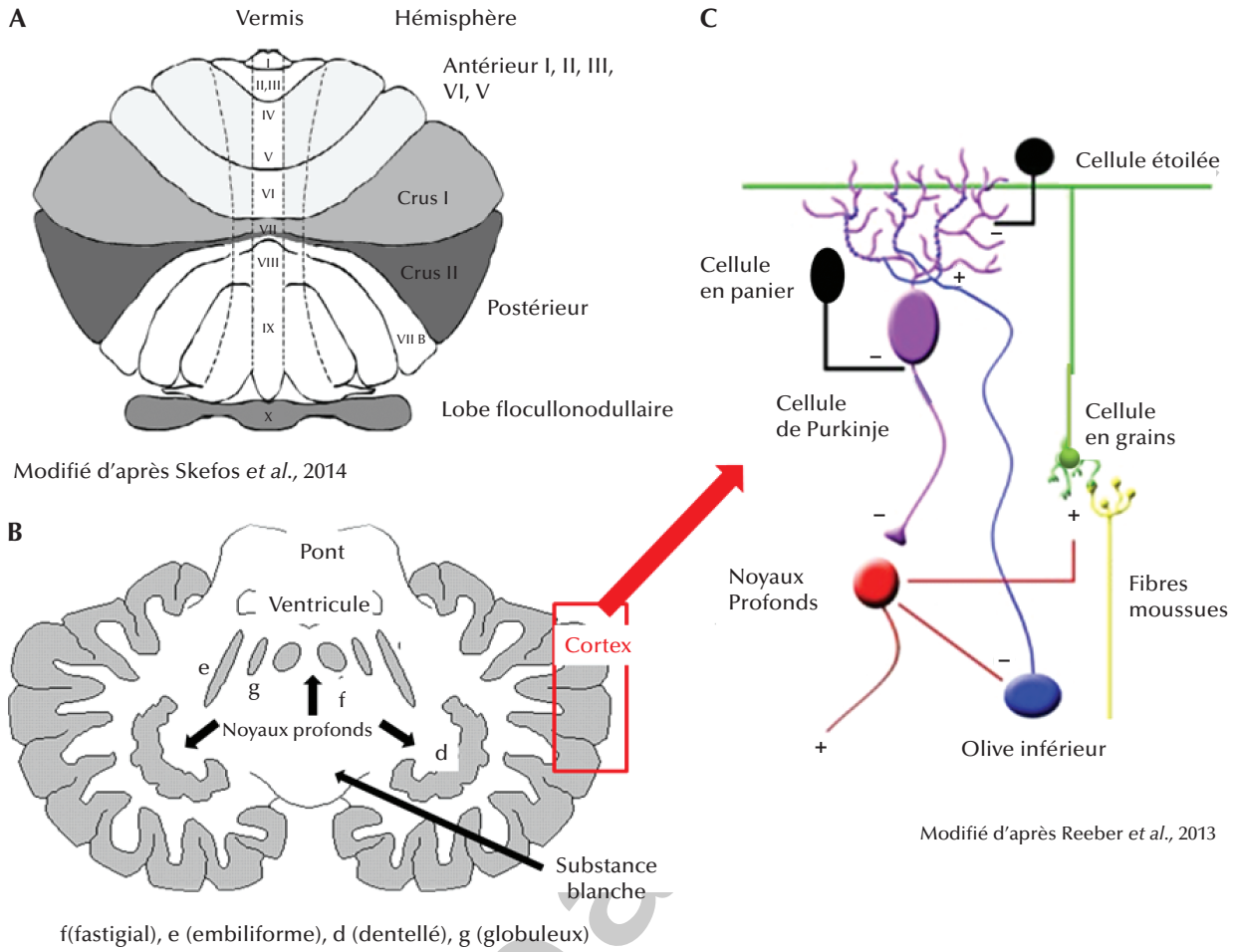


Figure 1. Anatomie du cervelet et organisation cellulaire du cortex cérébelleux. A) vue dorsale et organisation lobulaire ; B) coupe horizontale ; C) organisation cellulaire du cortex cérébelleux.

L'atteinte du circuit cérébelleux conduit à un déficit moteur se traduisant par des gestes maladroits et une difficulté du patient à exécuter les gestes fins et précis. Son écriture est irrégulière dans le sens horizontal et vertical. On observe une dysmétrie accompagnée d'une hypermétrie, une asynergie (mauvaise coordination motrice, le mouvement n'est plus lié mais il est décomposé) et une mauvaise répartition du tonus dans les muscles anti-gravitaires. Un retard à la mise en route et à l'arrêt du mouvement (dyschronométrie), l'impossibilité de faire des mouvements associés rapides (adiadococinésie) et des tremblements sont également observés. On parle d'ataxie cérébelleuse en référence à la mauvaise coordination des mouvements. Les lésions du cervelet causent également des déficits oculomoteurs comme des saccades dysmétriques et un nystagmus qui peuvent indirectement affecter la perception visuelle. On pense que le cervelet recalibre la perception visuelle de la dynamique des stimulations visuelles [17].

Des études récentes des connections afférentes et efférentes du cervelet (*figure 2B*) utilisant des virus neurotropes comme traceurs transneuronaux ainsi que des approches électrophysiologiques [20] ont participé à modifier cette vision purement motrice de la fonction du cervelet et l'impliquent dans des fonctions plus complexes telles que les processus perceptuels [21]. En effet, les noyaux cérébelleux projettent, sur de nombreuses régions du néocortex telles que le cortex prémoteur, préfrontal, et pariétal postérieur par l'intermédiaire de multiples noyaux thalamiques. Le cervelet est également connecté aux ganglions de la base qui jouent non seulement un rôle dans la programmation et le contrôle des mouvements mais également dans la motivation des comportements, dans le traitement de processus cognitifs et la régulation de l'humeur. Le cervelet est connecté au système limbique et notamment à l'hippocampe au niveau duquel il pourrait influencer la navigation spatiale [22]. Le cervelet serait nécessaire à la

© John Libbey Eurotext, 2016

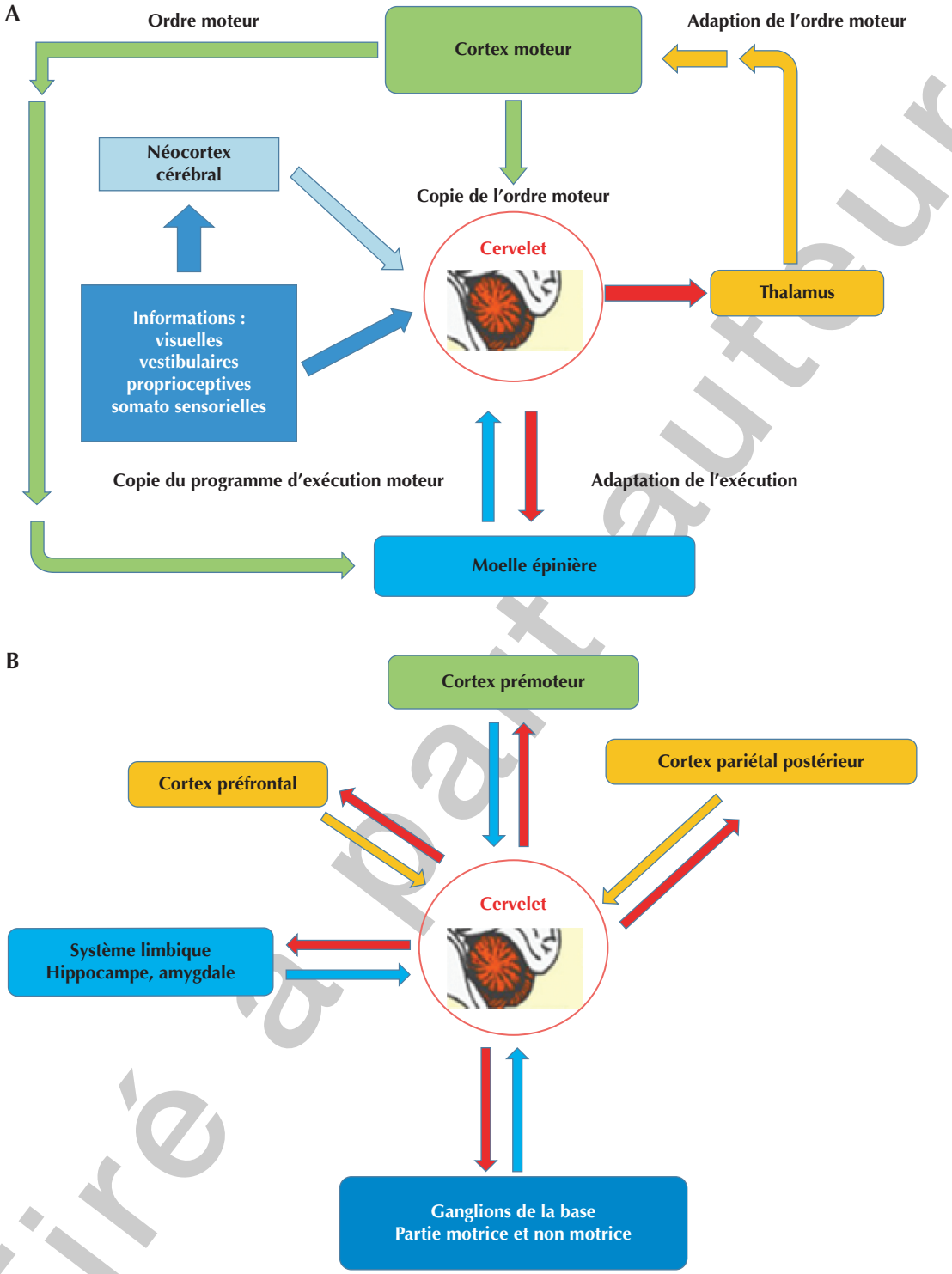


Figure 2. Circuits cérébelleux. A) régulation de la commande motrice ; B) connections mettant en jeu des structures impliquées dans les processus cognitifs.

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

construction de la représentation spatiale par l'hippocampe par sa participation au traitement de l'information du mouvement propre de l'individu [23]. Finalement, le cervelet est connecté à l'amygdale, structure essentielle pour l'attribution d'une valence émotionnelle aux stimuli sensoriels tels que les indices sociaux-affectifs faciaux [24]. Les bases neuro-anatomiques de l'implication du cervelet dans les processus cognitifs ont ainsi été établies.

Des études récentes en imagerie démontrent que certaines zones du cervelet sont activées lors de la réalisation de tâches cognitives. Il est intéressant de noter que les lobules qui s'activent lors de tâches cognitives et émotionnelles sont différents des lobules qui s'activent lors de tâches motrices. Par exemple, le lobule VI, VII (Crus I, CrusII, VIIB) et le lobule VII médian qui sont connectés aux régions associatives du cortex cérébral sont fortement activés lors de tâches cognitives et émotionnelles [20]. De ce fait, les effets moteurs et non moteurs de lésions cérébelleuses vont dépendre de leur localisation. Par exemple, des lésions des parties postérieures du cervelet perturbent les fonctions exécutives (planification, raisonnement abstrait, mémoire de travail), la cognition spatiale (organisation visuo-spatiale, mémoire spatiale), le langage (agrammatisme, dysprosodie) et provoquent des changements de personnalité que l'on appelle plus généralement syndrome cérébelleux affectif et cognitif (problèmes affectifs, comportements inappropriés, irritabilité, isolement social [25]). Des lésions des parties antérieures induisent des déficits moteurs sans troubles cognitifs [25-27]. Les troubles moteurs des patients cérébelleux peuvent être aussi associés à des déficits de perception visuelle et de proprioception [17]. L'atteinte du cervelet pourrait sous-tendre des pathologies complexes telles que certaines formes de dystonie qui se traduisent par des mouvements involontaires, des contractions soutenues donnant lieu à des mouvements répétitifs et à des torsions posturales [28]. Des différences anatomiques du cervelet par rapport à des sujets sains sont également observées dans des pathologies d'ordre psychiatrique telles que la schizophrénie, où une diminution du volume du lobe antérieur du vermis peut être détectée [29], les troubles bipolaires, où une atrophie du cervelet peut être observée et comme nous le verrons également dans le cas de l'autisme [28, 30].

Cervelet et autisme

Le lien entre cervelet et autisme est basé sur des études réalisées, d'une part, chez l'homme et, d'autre part, chez des modèles murins de l'autisme.

Signes cliniques d'atteinte purement cérébelleuse dans certains cas d'autisme (*figure 3*)

Les signes cliniques d'une atteinte cérébelleuse les plus simples à mettre en évidence lors de la description des TSA sont les troubles moteurs. En effet, une majorité de patients autistes présentent des problèmes moteurs concernant les mouvements fins et grossiers et qui peuvent être observées lors d'une pathologie purement cérébelleuse [31, 32]. Certaines études montrent qu'ils sont généralement associés avec la sévérité des symptômes autistiques, ce qui suggère une origine commune [33, 34]. Parmi les problèmes moteurs, la marche anormale, la mauvaise coordination des membres, la dysmétrie des mouvements manuels et la dyspraxie sont les plus communément observées [35, 36].

Pour résumer, les études des mouvements des membres supérieurs, du mouvement des mains et de l'apprentissage moteur réalisées chez les patients autistes ont montré un déficit du contrôle qui précède les mouvements (*forward*), du rétro-contrôle sensoriel (*feedback*) et de l'apprentissage moteur dépendant du cervelet. Chacun de ces processus met en jeu des zones distinctes du cervelet et leur interaction avec le cortex frontal et pariétal. Les études réalisées chez les patients autistes qui portent sur la posture, l'initiation de la marche et la démarche révèlent des problèmes moteurs compatibles avec des déficits de ces mêmes témoins mais qui impliquent d'autres circuits cérébelleux telle que la voie spino-cérébelleuse [32].

Selon le DSM-5, les anomalies de la fixation du regard font partie des critères de diagnostic du TSA. La fixation du regard est un processus dynamique qui met en jeu un contrôle du système oculomoteur qui génère des microsaccades des yeux. Des anomalies de la fixation visuelle ont également été documentées chez des patients présentant des lésions cérébelleuses [32]. Des études récentes montrent que la dynamique du mouvement en saccades des yeux ainsi que son adaptation qui met en jeu un circuit au centre duquel se trouve le cervelet (en particulier les lobules VI et VII du vermis) est affecté chez les enfants autistes [37, 38]. La perturbation de l'apprentissage moteur chez les enfants autistes qui présentent une augmentation de la sensibilité aux erreurs proprioceptives et une diminution de sensibilité aux erreurs visuelles pourrait être associée à une anomalie du cervelet [39].

D'un point de vue cognitif, les patients autistes peuvent présenter des déficits des fonctions exécutives, des capacités linguistiques et de mémorisation qui sont similaires aux perturbations cognitives observées chez les patients présentant une pathologie cérébelleuse chronique [34]. Ainsi, dans 40 % des cas, les enfants atteints du syndrome de Joubert défini par une hypoplasie du vermis [40] sont diagnostiqués comme autistes [41].

Imagerie fonctionnelle du cervelet

Très peu d'imagerie fonctionnelle a été réalisée jusqu'à ce jour chez des personnes atteintes de TSA qui passent des examens permettant de s'intéresser à leur cervelet. Cependant, les rares études réalisées [42], qui comparent les patients autistes à des sujets sains, révèlent une augmentation de l'activation de certaines zones du cervelet pendant l'accomplissement d'une tâche purement motrice ou lors d'un dialogue et une diminution de l'activation d'autres zones du cervelet lors de la réalisation de tâches cognitives

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

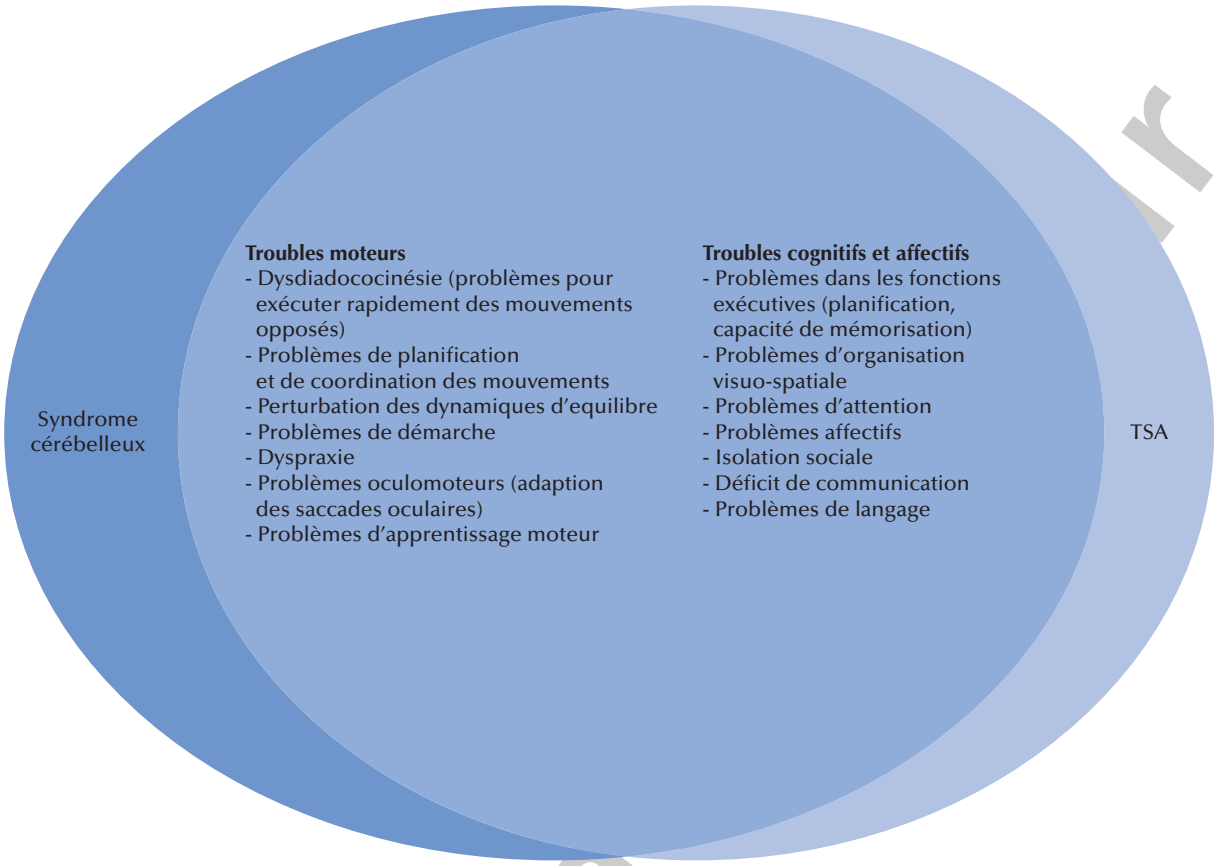


Figure 3. Troubles communs observés lors d'une atteinte cérébelleuse et dans certains cas d'autisme.

et hautement sensorielles (attention, apprentissage, prise de décision) chez les patients autistes. Cette dichotomie pourrait être le reflet d'une réduction régionalisée du nombre de cellules de Purkinje observée chez certains patients autistes (voir section « Histologie chez l'homme : une diminution du nombre de cellules de Purkinje »). Une étude récente montre que l'activité fonctionnelle cérébro-cérébelleuse (sensori-motrice) au repos est accrue chez les adolescents autistes comparés aux adolescents sains, renforçant l'idée que le cervelet participe à des fonctions cognitives pouvant être affectées dans cette pathologie [43].

Imagerie morphométrique du cervelet

Le développement de l'IRM a permis d'étudier les modifications morphométriques du cervelet des personnes atteintes de TSA. Les premières études ont conclu à une hypertrophie du cervelet en corrélation avec une hypertrophie du cerveau chez les enfants autistes de 2 à 4 ans, alors que chez les enfants autistes plus âgés (jusqu'à 16 ans) le volume du cerveau est normal. Cependant, une réduction de la matière grise du cervelet est observée, associée à une hypotrophie des lobules VI et VII du vermis [44]. Il a fallu attendre l'évolution des techniques de mesure morphométrique quantitative dans les années 2011 pour dresser un tableau plus précis de la morphologie du cervelet des patients autistes. La matière grise cérébelleuse présente une réduction régionalisée chez les patients autistes. Elle peut être détectée selon les études, bilatéralement dans le Crus II et le vermis [45], dans la partie inférieure du vermis (lobule IX), dans le lobule VIIIB, et le Crus I droit [46], dans le lobule VII (Crus I et II, [47]). Une réduction du volume du cervelet antérieur a également été rapportée chez certains enfants autistes [39]. Toutes ces études récentes concernent des enfants âgés de 2 à 13 ans. Ces réductions régionalisées de matière grise demandent à être confirmées chez des adultes autistes lorsque le développement du cervelet est terminé. Dans ce contexte, Lange *et al.* [48] précisent les observations de Courchesne en établissant les courbes d'évolution du volume du cerveau et du cervelet chez des patients autistes et témoins entre 2 et 35 ans. En ce qui concerne les volumes du cerveau et du cervelet, ils sont bien supérieurs à la normale chez les autistes durant la prime enfance, deviennent identiques aux témoins durant la prime adolescence et, enfin, diminuent jusqu'à l'âge adulte. Alors que

© John Libbey Eurotext, 2016

le volume de matière grise cérébelleuse des sujets témoins augmente, la réduction du volume de matière grise dans le Crus I du cervelet droit s'amplifie avec l'âge chez les autistes entre 7 et 29 ans [49].

À l'heure actuelle, l'association des TSA aux anomalies du cervelet n'est soutenue que par des arguments indirects. En effet, une corrélation pourrait être établie entre l'importance de la réduction en volume de la substance grise au niveau du Crus I et II et du vermis et le degré d'altération de la communication et de l'interaction sociale chez certains autistes [45, 47]. Aussi, la perte de matière grise dans le cervelet et l'occurrence des stéréotypies pourraient être corrélées chez les patients autistes entre 7 et 47 ans [50]. Enfin, la variabilité des interactions entre le néo-cervelet (Crus I) et certaines structures corticales importantes dans les interactions sociales pourraient rendre compte des différences de perception sociale observées chez certains adolescents autistes [51].

Histologie chez l'homme : une diminution du nombre de cellules de Purkinje

La plupart des études neuropathologiques *post mortem* de cervelets de personnes ayant souffert de TSA montrent une diminution du nombre de cellules de Purkinje dans les hémisphères et le vermis. Dès 1986, Ritvo *et al.* [12], par une étude histologique classique (Crésyl violet), rapportent une réduction du nombre de cellules de Purkinje d'environ 25 % dans les hémisphères et de 40 % dans le vermis du cervelet de sujets autistes (garçons de 10-22 ans) ayant présentés des problèmes de coordination motrice (trois cas) ou un retard à l'apprentissage de la marche (un cas). Ces résultats ont été confirmés très récemment par la mesure de la densité linéaire des cellules de Purkinje. Cette étude a été réalisée *post mortem* chez trois filles et cinq garçons atteints de TSA dont les problèmes moteurs ne sont pas précisés [52] et montre globalement une diminution de 11 % de la densité des cellules de Purkinje dans le cervelet des patients autistes comparé aux sujets sains. Elle démontre aussi la régionalisation de cette diminution de densité plus importante dans certaines régions du cortex cérébelleux telles que le Crus I et II où elle peut atteindre 20 %. Une étude récente, utilisant l'IRM nucléaire pour analyser la densité de la substance blanche cérébelleuse (*i.e.*, nombre et taille des cellules de Purkinje) a été réalisée chez des enfants présentant des TSA (15 enfants de 3,6 à 13,3 ans dont les troubles moteurs ne sont pas précisés) et confirme *in vivo* cette réduction du nombre de cellules de Purkinje [53]. Par ailleurs, bien que la densité de cellules de Purkinje ne soit pas affectée, une réduction de leur taille a été mise en évidence *post mortem* dans certains cas [54].

Modèles animaux

Il est important de définir les critères qui permettent de considérer une souris ou un rat comme un modèle d'étude de l'autisme. De manière générale, pour être valide en tant que modèle, les animaux doivent répondre à au moins une des trois conditions majeures : validité de construction (même étiologie que la pathologie humaine), validité prédictive (le modèle doit répondre de la même manière que l'humain au traitement existant) et l'isomorphie des symptômes (mêmes symptômes que ceux observés dans la pathologie humaine). L'étiologie de l'autisme n'étant pas précisément connue et en absence de traitement efficace sur l'ensemble de la population, la validité d'un modèle animal de l'autisme sera basée sur l'isomorphie symptomatologique. Ces modèles devront donc présenter une perturbation des interactions sociales, un déficit de communication et des mouvements stéréotypés. Une mutation génétique connue chez certains patients atteints de TSA, ou un traitement *in utero* par un facteur tératogène reconnu comme facteur de risque, sont généralement employés pour générer un modèle animal d'autisme. Les modèles animaux de l'autisme permettent d'étudier les atteintes du système nerveux liés à cette pathologie et de déterminer les facteurs environnementaux susceptibles d'induire des troubles autistiques. Finalement, ces modèles vont permettre de tester des traitements potentiels des TSA [55].

Les études réalisées chez les rongeurs ont confirmé l'importance des cellules de Purkinje du cervelet. Une diminution du nombre de cellules de Purkinje survient dans le cervelet de rats exposés au valproate de sodium au cours de la vie embryonnaire et présentant des comportements autistiques [56]. De façon surprenante, une mutation dirigée spécifiquement sur les cellules de Purkinje (par utilisation d'un promoteur spécifique) et ayant pour conséquence de réduire leur nombre (réduction de 50 % deux mois après la naissance), leur taille et d'induire des modifications de leurs propriétés électriques est à l'origine d'un phénotype autistique (stéréotypie, vocalisations et comportement social anormal) chez la souris [57]. De même, une réduction du nombre de cellule de Purkinje d'environ 20 % est associée à l'apparition de comportements répétitifs chez ce rongeur [58]. La suppression du récepteur p75 aux neurotrophines des cellules de Purkinje, [59] induit l'apparition de comportement autistiques chez la souris. Ces observations soulèvent une question importante : comment des anomalies affectant les cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (nombre, morphologie. . .) et pouvant apparaître durant leur développement peuvent être à l'origine de TSA [60]. À la lumière de travaux récents, l'importance du rôle des cellules de Purkinje au sein du circuit cérébelleux a pu être démontrée. En effet, chez la souris une stimulation optogénétique des cellules de Purkinje induit des mouvements fins [61] mais également un apprentissage moteur mesuré par l'adaptation du réflexe vestibulo-oculaire [62].

Les premières études d'imagerie morphométrique du cervelet ont été réalisées chez des modèles de souris « autistes » génétiquement modifiées. Elles confirment l'existence d'altérations morphologiques du cervelet [63]. Des altérations fonctionnelles en relation avec le cervelet comme un déficit d'apprentissage moteur (conditionnement du clignement des paupières) ont été décrites chez

Tirés-à-part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

certains modèles de souris autistes et pourraient être induites par un défaut de plasticité synaptique dans le circuit cérébelleux [64, 65].

Conclusions et perspectives

Le cervelet a non seulement un rôle moteur mais également un rôle dans les processus cognitifs et psychoaffectifs [66]. La maturation anatomique et fonctionnelle du cervelet se fait principalement après la naissance, il est donc fort probable que le cervelet joue un rôle dans le développement des capacités cognitives de l'enfant. Bien que des déficits moteurs et cognitifs d'origine cérébelleuse aient été décrits chez certains patients autistes, les troubles cognitifs liés au dysfonctionnement du cervelet ne sont pas forcément associés à un déficit moteur. Si l'on considère que le cervelet est une structure essentielle à la prédiction, son dysfonctionnement chez l'autiste étayerai l'hypothèse étiologique selon laquelle les TSA seraient une manifestation d'un désordre des capacités prédictives du patient [67]. L'autiste aux compétences de prédiction compromises habiterait un monde lui paraissant « magique » où les événements arrivent inopinément et sans cause, rendant difficile les interactions avec les habitants d'un tel monde. L'étude anatomique et histologique du cervelet met en évidence des différences aussi bien chez certains patients autistes que chez certains modèles animaux « autistes » comparés à des sujets sains.

De nombreuses questions restent cependant sans réponse et constituent un axe majeur de recherches cliniques et fondamentales pour mieux comprendre cette pathologie. Déterminer si la perturbation du développement du cervelet peut être à l'origine de certaines formes d'autisme semble être une question importante. En effet, le développement fœtal du cerveau est contrôlé par un programme génétique qui peut être perturbé par des mutations et des facteurs environnementaux. En ce qui concerne l'autisme, de nombreux allèles à risque ont été identifiés pouvant être à l'origine d'un développement anormal du cerveau. Ils sont impliqués entre autres dans la différenciation neuronale, la maturation, la migration cellulaire, la mise en place des réseaux neuronaux ainsi que la transmission synaptique. La localisation et le *timing* de l'expression de ces gènes ou groupes de gènes à risque dans le système nerveux restent à explorer. Des travaux récents, chez l'homme, montrent une forte expression de ces gènes dans le cervelet de la naissance à 6 ans. Des mutations pourraient alors induire, d'une part, des perturbations dans l'établissement des réseaux neuronaux entre le cervelet et les multiples régions centrales avec lesquelles il est connecté (sachant que le cervelet à une longue période de développement post natal) et, d'autre part, modifier l'architecture de ces régions [68].

Le rôle des pathologies cérébelleuses dans les anomalies de la motricité et dans l'apparition et le développement des TSA devrait être étudié en tenant compte de l'âge des patients autistes dans les recherches cliniques associant bilan psychomoteur, IRM et IRM fonctionnelle. Il sera alors possible de déterminer l'existence d'une relation entre certains troubles moteurs et l'importance des déficits cognitifs. Une rééducation motrice spécifique et adaptée pourrait alors permettre de corriger les déficits moteurs et d'atténuer certains TSA.

Dans les modèles murins de l'autisme, les atteintes du circuit neuronal cérébelleux et notamment la diminution de la densité des cellules de Purkinje observée chez la souris valproate devraient être étudiées plus avant. Il sera essentiel d'établir une cartographie régionale de cette diminution dans le cervelet et de la mettre en relation avec le degré d'altération et la spécificité des comportements moteurs, l'intensité des stéréotypies et l'importance des troubles d'interaction sociale. L'origine de la diminution de la densité des cellules de Purkinje pourrait trouver son origine soit dans la destruction des précurseurs des cellules de Purkinje, soit dans la migration de ces cellules souches vers d'autres régions du cerveau. Alternativement, les cellules de Purkinje pourraient mourir prématurément du fait de leur sensibilité spécifique à certaines agressions [69]. Dans l'hypothèse qu'une modification de la balance excitation/inhibition puisse être une cause de l'autisme, une analyse détaillée du fonctionnement du réseau neuronal cérébelleux devra être réalisée chez les souris « autistes ». Une attention particulière pourra être portée à l'étude des récepteurs au glutamate de type NMDA excitateurs [70] et aux modifications du gradient chlore par la voie des récepteurs GABA inhibiteurs [71].

Remerciements

Les auteurs remercient les docteurs Bernard Poulain et Yannick Bailly pour une relecture approfondie et critique de cette revue.

Liens d'intérêts

les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Tirés à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

Références

1. Zablotsky B, Black LI, Maenner MJ, *et al*. Estimated prevalence of autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 National Health Interview Survey. *Natl Health Stat Report* 2015 ; 13 : 1-20.
2. Ziats MN, Edmonson C, Rennert OM. The autistic brain in the context of normal neurodevelopment. *Front Neuroanat* 2015 ; 9 : 115.
3. Ecker C, Bookheimer SY, Murphy DG. Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan. *Lancet Neurol* 2015 ; 14 : 1121-34.
4. Constantino JN, Charman T. Diagnosis of autism spectrum disorder: reconciling the syndrome, its diverse origins, and variation in expression. *Lancet Neurol* 2015 ; 15 : 279-91.
5. Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, *et al*. Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009 ; 163 : 907-14.
6. Deng W, Zou X, Deng H, *et al*. The relationship among genetic heritability, environmental effects, and autism spectrum disorders: 37 pairs of ascertained twin study. *J Child Neurol* 2015.
7. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015 ; 16 : 551-63.
8. Rossignol DA, Genuis SJ, Frye RE. Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl Psychiatry* 2014 ; 11 : e360.
9. Zhubi A, Cook EH, Guidotti A, *et al*. Epigenetic mechanisms in autism spectrum disorder. *Int Rev Neurobiol* 2014 ; 115 : 203-44.
10. Rubenstein JL, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2003 ; 2 : 255-67.
11. Ben-Ari Y. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience* 2014 ; 24 : 187-219.
12. Ritvo ER, Freeman BJ, Scheibel AB, *et al*. Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC autopsy research report. *Am J Psychiatry* 1986 ; 143 : 862-6.
13. D'Angelo E, Casali S. Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Front Neural Circuits* 2013 ; 6 : 116.
14. Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, *et al*. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci* 2015 ; 16 : 79-93.
15. Voogd J. What we do not know about cerebellar systems neuroscience. *Front Syst Neurosci* 2014 ; 8 : 1-10.
16. Witter L, De Zeeuw CI. Regional functionality of the cerebellum. *Curr Opin Neurobiol* 2015 ; 33 : 150-5.
17. Therrien AS, Bastian AJ. Cerebellar damage impairs internal predictions for sensory and motor function. *Curr Opin Neurobiol* 2015 ; 33 : 127-33.
18. Bastian AJ. Learning to predict the future: the cerebellum adapts feedforward movement control. *Curr Opin Neurobiol* 2006 ; 16 : 645-9.
19. Schlerf J, Ivry RB, Diedrichsen J. Encoding of sensory prediction errors in the human cerebellum. *J Neurosci* 2012 ; 32 : 4913-22.
20. Bostan AC, Dum RP, Strick PL. Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends Cogn Sci* 2013 ; 17 : 241-54.
21. Baumann O, Borra RJ, Bower JM, *et al*. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum* 2015 ; 14 : 197-220.
22. Rochefort C, Lefort JM, Rondi-Reig L. The cerebellum: a new key structure in the navigation system. *Front Neural Circuits* 2013 ; 13 : 35.
23. Lefort JM, Rochefort C, Rondi-Reig L. Cerebellar contribution to spatial navigation: new insights into potential mechanisms. *Cerebellum* 2015 ; 14 : 59-62 [Group of L.R.R. is member of Bio-Psy Labex and ENP Foundation].
24. Murray RJ, Brosch T, Sander D. The functional profile of the human amygdala in affective processing: insights from intracranial recordings. *Cortex* 2014 ; 60 : 10-33.
25. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 1998 ; 121 : 561-79.
26. Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2004 ; 16 : 367-78.
27. Siuda K, Chrobak AA, Starowicz-Filip A, *et al*. Emotional disorders in patients with cerebellar damage – case studies. *Psychiatr Pol* 2014 ; 48 : 289-97.
28. Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci* 2013 ; 7 : 1-11.
29. Parker KL, Narayanan NS, Andreasen NC. The therapeutic potential of the cerebellum in schizophrenia. *Front Syst Neurosci* 2014 ; 8 : 163.
30. Phillips JR, Hewedi DH, Eissa AM, *et al*. The cerebellum and psychiatric disorders. *Front Public Health* 2015 ; 3 : 66.
31. Gowen E, Miall RC. The cerebellum and motor dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Cerebellum* 2007 ; 6 : 268-79.
32. Mosconi MW, Wang Z, Schmitt LM, *et al*. The role of cerebellar circuitry alterations in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Front Neurosci* 2015 ; 9 : 296.
33. Freitag CM, Kleser C, Schneider M, *et al*. Quantitative assessment of neuromotor function in adolescents with high functioning autism and Asperger Syndrome. *J Autism Dev Disord* 2007 ; 37 : 948-59.
34. Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood Pet al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* 2012 ; 11 : 777-807.
35. MacNeil LK, Mostofsky SH. Specificity of dyspraxia in children with autism. *Neuropsychology* 2012 ; 26 : 165-71.
36. Miller M, Chukoskie L, Zinni M, *et al*. Dyspraxia, motor function and visual-motor integration in autism. *Behav Brain Res* 2014 ; 269 : 95-102.
37. Mosconi MW, Luna B, Kay-Stacey M, *et al*. Saccade adaptation abnormalities implicate dysfunction of cerebellar-dependent learning mechanisms in autism spectrum disorders (ASD). *PLoS One* 2013 ; 8 : 1-9.
38. Schmitt LM, Cook EH, Sweeney JA, *et al*. Saccadic eye movement abnormalities in autism spectrum disorder indicate dysfunctions in cerebellum and brainstem. *Mol Autism* 2014 ; 5 : 47.
39. Marko MK, Crocetti D, Hulst T, *et al*. Behavioural and neural basis of anomalous motor learning in children with autism. *Brain* 2015 ; 138 : 784-97.
40. Joubert M, Eisenring JJ, Robb JP, *et al*. Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnoea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology* 1969 : 813-25.
41. Ozonoff S, Williams BJ, Gale S, *et al*. Autism and autistic behavior in Joubert syndrome. *J Child Neurol* 1999 ; 14 : 636-41.
42. Allen G. The cerebellum in autism. *Clin Neuropsychiatry* 2005 ; 2 : 321-37.
43. Khan AJ, Nair A, Keown CL, *et al*. Cerebro-cerebellar resting-state functional connectivity in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 2015 ; 78 : 625-34.
44. Courchesne E, Karns CM, Davis HR, *et al*. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology* 2001 ; 57 : 245-54.
45. Riva D, Annunziata S, Contarino V, *et al*. Gray matter reduction in the vermis and CRUS-II is associated with social and interaction deficits in low-functioning children with autistic spectrum disorders: a VBM-DARTEL Study. *Cerebellum* 2013 ; 12 : 676-85.
46. Stoodley CJ. Distinct regions of the cerebellum show gray matter decreases in autism ADHD, and developmental dyslexia. *Front Syst Neurosci* 2014 ; 8 : 92.
47. D'Mello AM, Crocetti D, Mostofsky SH, *et al*. Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *Neuroimage Clin* 2015 ; 7 : 631-9.
48. Lange N, Travers BG, Bigler ED, *et al*. Longitudinal volumetric brain changes in autism spectrum disorder ages 6-35 years. *Autism Res* 2015 ; 8 : 82-93.
49. Lin HY, Ni HC, Lai MC, *et al*. Regional brain volume differences between males with and without autism spectrum disorder are highly age-dependent. *Mol Autism* 2015 ; 6 : 1-18.

Tirés à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

50. Rojas DC, Peterson E, Winterrowd E, *et al*. Regional gray matter volumetric changes in autism associated with social and repetitive behavior symptoms. *BMC Psychiatry* 2006 ; 13 : 56.
51. Jack A, Morris JP. Neocerebellar contributions to social perception in adolescents with autism spectrum disorder. *Dev Cogn Neurosci* 2014 ; 10 : 77-92.
52. Skefos J, Cummings C, Enzer K, *et al*. Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PLoS One* 2014 ; 9 : 1-11.
53. Jeong JW, Tiwari VN, Behen ME, *et al*. In vivo detection of reduced Purkinje cell fibers with diffusion MRI tractography in children with autistic spectrum disorders. *Front Hum Neurosci* 2014 ; 28 : 110.
54. Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, *et al*. Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cell Mol Neurobiol* 2002 ; 22 : 171-5.
55. Shevelkin AV, Ihenatu C, Pletnikov MV. Pre-clinical models of neurodevelopmental disorders: focus on the cerebellum. *Rev Neurosci* 2014 ; 25 : 177-94.
56. Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, *et al*. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol* 2000 ; 22 : 319-24.
57. Tsai PT, Hull C, Chu Y, *et al*. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 2012 ; 488 : 647-51.
58. Martin LA, Goldowitz D, Mittleman G. Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. *Eur J Neurosci* 2010 ; 31 : 544-55.
59. Lotta LT, Conrad K, Cory-Slechta D, *et al*. Cerebellar Purkinje cell p75 neurotrophin receptor and autistic behavior. *Transl Psychiatry* 2014 ; 4 : e416.
60. Sudarov A. Defining the role of cerebellar Purkinje cells in autism spectrum disorders. *Cerebellum* 2013 ; 12 : 950-5.
61. Proville RD, Spolidoro M, Guyon N, *et al*. Cerebellum involvement in cortical sensorimotor circuits for the control of voluntary movements. *Nat Neurosci* 2014 ; 17 : 1233-9.
62. Nguyen-Vu TD, Kimpo RR, Rinaldi JM, *et al*. Cerebellar Purkinje cell activity drives motor learning. *Nat Neurosci* 2013 ; 16 : 1734-6.
63. Steadman PE, Ellegood J, Szulc KU, *et al*. Genetic effects on cerebellar structure across mouse models of autism using a magnetic resonance imaging atlas. *Autism Res* 2014 ; 7 : 124-37.
64. Piochon C, Kloth AD, Grasselli G, *et al*. Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 5586.
65. Kloth AD, Badura A, Li A, *et al*. Cerebellar associative sensory learning defects in five mouse autism models. *ELIFE* 2015 ; 4 : e6085.
66. Koziol LF, Budding D, Andreasen N, *et al*. Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum* 2014 ; 13 : 151-77.
67. Sinha P, Kjelgaard MM, Gandhi TK, *et al*. Autism as a disorder of prediction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 ; 111 : 15220-5.
68. Wang SSH, Kloth AD, Badura A. The cerebellum, sensitive periods, and autism. *Neuron* 2014 ; 83 : 518-32.
69. Kern JK. Purkinje cell vulnerability and autism: a possible etiological connection. *Brain Dev* 2003 ; 25 : 377-82.
70. Lee EJ, Choi SY, Kim E. NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. *Curr Opin Pharmacol* 2015 ; 20 : 8-13.
71. Lemonnier E, Degrez C, Phelep M, *et al*. A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Transl Psychiatry* 2012 ; 2 : 1-8.

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2016

Chapitre 4 : Les modèles animaux d'étude de l'autisme

Sur la base de données obtenue chez l'Homme, des modèles animaux ont été développés afin de mieux comprendre cette pathologie et ses origines, mais également dans le but de tester différents traitements, tant pharmacologiques que cognitifs, susceptibles d'atténuer les troubles autistiques et ainsi d'améliorer la qualité de vie des patients.

Ces modèles animaux, afin d'être valides comme modèle d'étude de l'autisme, doivent remplir une condition majeure : présenter les deux critères de diagnostic de l'autisme qui sont, pour rappel, une perturbation des interactions sociales et de la communication ainsi que la présence de mouvements stéréotypés.

Même si certaines études sont effectuées sur les primates non-humains, la majeure partie des modèles animaux a été validée chez les rongeurs. On retrouve d'une part, plusieurs modèles de souris transgéniques où sont mutés divers gènes connus pour être impliqués dans la pathologie humaine (cf. chapitre 1.2), et d'autre part, des modèles de rongeurs obtenus par exposition in-utéro à des facteurs environnementaux à risque, tels que le mercure, des agents viraux ou encore des agents tératogènes comme que le VPA (pour revue voir (Gadad et al., 2013).

1 - Les modèles transgéniques

De nombreux modèles transgéniques de l'autisme ont été créés par mutation des gènes connus pour être à risque chez l'Homme, comme NLGN3 (Neuroligine 3), NRXN1 et 3 (neurexine 3 et 4) ou encore SH3 (Shank3) (pour revue voir Varghese et al., 2017 et Gadad et al., 2013). La mutation des gènes de la sclérose tubéreuse (TSC1/TSC2) à également été utilisée pour générer un modèle d'autisme. Récemment, plusieurs études ont utilisées des modèles ou TSC1 ou TSC2 était spécifiquement muté dans les CP.

Parmi ces modèles, le plus connu et le plus souvent utilisé est sans doute le modèle des souris KO FMR1, modèle de l'autisme et du syndrome de l'X fragile. Le syndrome de l'X fragile est causé par l'expansion d'un trinucléotide cytosine-guanine-guanine dans le promoteur du gène FMR1. Ce gène code pour FMRP, protéine se liant aux ARNm et régulant la synthèse de protéines de façon locale en fonction de l'activité synaptique (Maurin et al., 2014). Environs 30%

des enfants atteint du syndrome de l'X fragile partagent un ou plusieurs symptômes en commun avec les TSA, comme des retards mentaux, de l'hyperactivité avec déficit d'attention ou de l'épilepsie. Les souris FMR1 KO présentent des perturbations de des interactions sociales et de la communication, de même que des stéréotypies ce qui en fait donc un modèle valide pour l'étude de l'autisme. Ce modèle présente également plusieurs similitudes avec la pathologie, comme l'augmentation de la densité des épines dendritiques dans le cortex cérébral, facteur commun à l'X fragile et à l'autisme.

Un autre modèle avec lequel j'ai eu l'occasion de travailler durant ma thèse est celui des souris n'expriment pas le récepteur aux opioïdes mu (KO OPRM1), basé sur la théorie de la récompense sociale. Ce modèle a montré des déficits d'interaction sociale et des comportements stéréotypés, remplissant ainsi les critères d'un modèle d'étude de l'autisme. Les souris KO OPRM1 présentent également plusieurs symptômes associés aux TSA comme de l'agressivité, de l'anxiété ou encore une augmentation du risque de développer des crises épileptiques. De plus, l'ocytocine ayant montré des effets positifs sur les patient humains, permet également une amélioration des symptômes dans le modèle (Becker et al., 2014).

2 - Les modèles d'atteinte environnementale

Cette catégorie de modèle est moins diversifiée que celle des modèles transgéniques. L'exposition à des produits comme le thalidomide ou le mercure a montré certains points communs avec l'autisme (Gadad et al., 2013) et des modèles comme celui de l''exposition prénatale à un agent virale, afin d'activer le système immunitaire (MIA), ont été développés. Cependant, le plus utilisé d'entre eux, dont je vais faire la description ici, est le modèle d'exposition prénatale au VPA.

2.1 - Le modèle d'activation du système immunitaire maternel

Des études épidémiologiques ont montrées qu'une infection ou une fièvre durant la grossesse augmentait le risque de survenue de TSA chez les enfants (Atladóttir et al., 2010; Lee et al., 2015). Des modèles ont été développé a partir de ces observations en induisant une réponse immunitaire chez des souris gestante via une exposition à des virus, des bactéries ou de l'ARN

synthétique (Shevelkin et al., 2014). Une perte en CP, des anomalies dans la migration des cellules granulaires, des modifications dans le pattern d'expression du marqueur Zébrine II ainsi que des perturbations motrices et de l'interactions sociales ont étés rapportés dans ces modèles (Shevelkin et al., 2014; Aavani et al., 2015). Il est intéressant de noter que des modifications du transcriptome GABAergique sont rapportées dans le cortex préfrontal de ces souris ce qui pourrait supporter une altération de la signalisations GABAergique ce qui constitue une piste intéressante (Richetto et al., 2014).

2.2.1 - Le valproate

L'acide valproïque ou acide 2-propylpentanoic est une courte chaine d'acide gras synthétisée comme un analogue de l'acide valérique, extrait de la valériane. Le valproate induit son effet via deux mécanismes principaux. Premièrement il agit sur l'excitabilité neuronale, notamment en augmentant la disponibilité du GABA dans la fente synaptique, en diminuant l'activité des canaux sodium dépendant du voltage, en augmentant la réponse des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ et en diminuant la liaison du glutamate avec son récepteur AMPA. Deuxièmement, le valproate régule l'expression génique en phosphorylant des facteurs de transcription et en inhibant les histone déacetylases (Monti et al., 2009). Il est utilisé sous forme de valproate de sodium comme anticonvulsivant dans le traitement de l'épilepsie, comme stabilisateur de l'humeur dans le cadre de troubles bipolaires et également dans des traitements antimigraineux. Actuellement, il est étudié comme agent anticancéreux. Le VPA est donc un composé largement prescrit dans la population mondiale. Comprendre les risques qui peuvent être liés à une exposition prénatale au valproate est un enjeu majeur de santé publique. En effet, des observations effectuées au cours des 40 dernières années ont montré qu'une exposition prénatale au VPA est associée à des malformations congénitales, des déficits cognitifs et à un risque accru de présenter des syndromes autistiques (pour revue voir Roullet et al., 2013). Ainsi, des études statistiques, réalisées sur des bases de données médicales, indiquent l'existence d'un risque de 4,15% d'avoir des enfants diagnostiqués autistes chez des sujets ayant pris comme traitement de l'acide valproïque durant leur grossesse, contre seulement 1,02% chez des personnes contrôle (Christensen, 2013).

2.2.2 - Le modèle des souris valproate

Basé sur ces observations, un nouveau modèle murin d'étude de l'autisme a été mis au point. Il est obtenu par une injection intrapéritonéale de VPA, (350mg/kg à 800mg/kg), chez des rongeurs en gestation, précisément au jour de développement embryonnaire 12.5 (E12.5) (période de fermeture du tube neural). La descendance présente des syndromes s'apparentant à l'autisme, tels que des comportements stéréotypés, des déficits d'interactions sociales ou encore des déficits en communication. Les animaux utilisés dans la plupart des cas sont des rats, mais des études ont montré que ce modèle est également valide chez la souris, notamment avec les souches C57BL6 (Moldrich et al., 2013) et, rarement, CD1 (Kataoka et al., 2011).

La revue inclue dans ce chapitre détaille de façon plus exhaustive l'intérêt du modèle des souris valproate dans l'autisme.

Après avoir décrit l'autisme, le cervelet, les connexions existant entre les deux ainsi que les modèles permettant de tester ces connexions, je vais, dans le prochain chapitre, vous présenter le mécanisme sur lequel j'ai travaillé au cours de ma thèse afin de mettre à jour une nouvelle connexion : le gradient des ions chlorures.

Valproic acid and autism spectrum disorder: from clinical observations to animal studies

Sébastien Roux et Jean-Louis Bossu

Institut des Neurosciences Cellulaires et Integratives CNRS et Université Louis Pasteur UPR 3212 5 rue Blaise Pascal F-67084 Strasbourg Cedex 03

Current Trend in Neurology (2017, vol 11 pp 53-61)

Current Trends in Neurology

Review

Valproic acid and autism spectrum disorder: from clinical observations to animal studies

Sebastien Roux and Jean Louis Bossu*

Institut des Neurosciences, Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 5, rue Blaise Pascal 67084, Strasbourg, France.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental pathology clinically characterized by persistent deficits in social communication and social interactions associated with restricted repetitive patterns of behavior, interests or activity. ASD is actually one of the most common childhood neurological disorders. Despite a genetic origin, environmental factors are determinant in the etiology of autism. Based on observations that exposure to valproic acid (VPA) during pregnancy increases the risk of autism in children, *in utero* exposure of rodents to VPA was performed to produce animal models of autism. VPA-treated rodents exhibit social interaction deficits and repetitive behaviors, and display similar brain structure abnormalities to those observed in human cases of ASD. These rodent VPA models support the hypothesis that an imbalance between excitation and inhibition and/or a hyperconnectivity-hyperplasticity in those brain regions implicated in social interactions, learning and perception is at the root of ASD, and thus provide valuable tools for screening novel therapeutics.

KEYWORDS: autism, valproate, prenatal exposure, neurodevelopment, connectivity, excitation/inhibition balance.

INTRODUCTION

Autism spectrum disorder (ASD) is classified as a neurodevelopmental pathology defined by persistent deficits in social communication and social interactions in multiple contexts associated with restricted, repetitive patterns of behavior interests or activity. Although symptoms may be/are present in the early developmental period, they only fully manifest when social demands exceed limited capacities (DSM 5, Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders published by the American Psychiatric Association, Fifth Edition Washington, DC: 2013). Typically, ASD is diagnosed within the first three years of life. The increase in the prevalence of ASD cases, reaching more than 1/100 children worldwide, places this disorder as one of the most common pervasive neurodevelopmental disorders [1]. The etiology of ASD remains elusive, and most ASD cases are classified as idiopathic. Nevertheless, a genetic origin including single gene mutations, copy number variations and polygenic risk factors may explain approximatively 20-30% of ASD cases [2]. Prenatal exposition to various environmental factors such as maternal immune activation, maternal stress, heavy metal, air pollution, pesticides, endocrine disruptors and drugs have been proposed as risk factors for ASD [3]. In this line, it is generally admitted that the epigenetic effects of environmental factors may affect normal neurodevelopment and lead to ASD [4].

Postmortem neuropathologic explorations of human tissue have revealed cellular and cytoarchitecture alterations in several regions of the brain from individuals with ASD [2]. Cortical regions such as the prefrontal cortex, known for its role in cognitive control, the fusiform gyrus, that plays a role in our

*Corresponding author: jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr

capacity to interact appropriately in social situations, and cortical areas (frontoinsular and cingulate cortex) implicated in the processing of emotions and their integration are consistently altered in ASD patients. The limbic system, including hippocampus (spatial memory) and amygdala (emotional learning) are also altered in ASD patients. Finally, the cerebellum that is involved in motor coordination and learning, as well as in more complex tasks such as the regulation of emotion [5] and the perception of environment [6] presents alterations in ASD patients.

The most consistent structural finding yielded by magnetic resonance imaging (MRI) is the increased growth of total cortical volume in early ASD infants. The same observation is also reported for some subcortical brain regions (e.g., amygdala and hippocampus) and the cerebellum. However, studies comparing ASD adolescents or adults with controls did not reveal such differences and have even reported a decrease of total brain volume in ASD patients [7].

Hyperconnectivity and underconnectivity, as well as a combination of both have been revealed by functional MRI in the autistic brain [8]. Although fascinating, these studies are complex and difficult to interpret given the mosaic of behavior abnormalities in ASD patients.

The current animal models of ASD which mimic ASD behaviors have been developed in the rodents [9] and zebrafish [10] to investigate the neuropathological processes of ASD. Based on the well-characterized forms of ASD linked to monogenic mutations in humans, monogenic mouse models of ASDs have been developed and provide strong converging evidence for the important contribution of synaptic dysfunction to the pathophysiology of autism [11]. Animal models of idiopathic ASD have also been developed using environmental constraints such as maternal stress [12], maternal immune activation [13], and prenatal exposure to paraben [14] and to valproic acid (VPA) [9].

This review focuses on the "valproate model of ASD" that follows epidemiologic observations of human ASD cases and summarizes its main contribution to our understanding of ASD neuropathology.

In utero exposure to VPA: a risk factor for autism in humans

VPA is an antiepileptic agent commonly used as adjunctive therapy in patients that have failed to respond adequately to other medications. One of its main modes of action is to potentiate the inhibitory effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on neuronal firing [15]. Nevertheless, although VPA is an efficient therapeutic agent for epilepsy and bipolar troubles, it is particularly toxic for the fetus. Indeed, exposure to VPA in the first trimester of pregnancy is associated with three-fold increase in the rate of major anomalies such as spina bifida, cardiac and craniofacial skeletal and limb defects associated with a cluster of anomalies including behavioral delays that are clinically defined as the fetal valproate syndrome (FVS) [16]. Based on case reports, prenatal exposure to VPA was also suspected to be a risk factor for infantile autism [17]. Although this was subsequently confirmed by several studies and clinical observations, the link between *in utero* VPA exposure and autism was finally proven in 2013 [18]. In that study, clinical observations from a large population of children demonstrated that maternal use of VPA during pregnancy increases the risk of autism by a factor 4. The FSV and autism are the consequence of the teratogenic effect of VPA, with drastic effects for the infant if VPA is administrated when the neural tube of the fetus is closing during pregnancy [16, 19]. Nevertheless, later exposure to VPA could not be excluded as a cause of autism. At the cellular level, VPA acts as a non-selective inhibitor of histone deacetylases implicated in the regulation of gene transcription and phenotype differentiation [20].

Exposure to VPA generates an animal model for autism

Based on human cases of autism showing that exposure to teratogens during the pregnancy period corresponding to closure of the neuronal tube causes/leads to lesions of motor cranial nerve nuclei, Rodier and colleagues [21] have looked for similar lesions in rats exposed to VPA (350 mg/kg) during the closure of the neural tube (embryonic day (E) 11.5, 12 and 12.5). All treatments with VPA affected motor nuclei leading to the conclusion that the initiating autism injury occurs around

the time of the neuronal tube closure. Interestingly, the same group [22] also showed that a single dose of VPA (600 mg/kg) at E12.5 causes Purkinje cell loss, the cerebellar anomaly associated with autism in humans. Furthermore, rats exposed prenatally (E9) to VPA present high levels of serotonin in several brain regions similar to those in autistic patients [23]. These pioneering experiments strongly suggest that rats prenatally exposed to VPA were potential animal models of autism. However, a precise phenotypic characterization of these VPA rats was necessary to confirm that such animal models reproduce the core symptoms of autism i.e deficits in social interactions and communication associated with repetitive behaviors. Subsequently, Schneider and Przewlocki [24] clearly demonstrated that a single injection of VPA (600 mg) at E12.5 decreased a number of social behaviors, increased latency of social interactions and locomotor repetitive stereotypic-like hyperactivity combined with low exploring activity in male offspring. In addition, the VPA rats showed delayed maturation, lower body weight, delayed motor development, attenuated integration of coordinated series of reflexes and lower sensitivity to pain [24]. Comparing different embryonic periods of VPA exposure revealed that VPA exposure at E12 produced the most significant behavioral changes: i.e reduced sociability and social preference [25]. Similarly, prenatal exposures to VPA (E13, 600 mg/kg) in mice produced developmental deficits and reduced social interactions and repetitive behaviors [26-29]. Experiments conducted by many groups have thus confirmed that a prenatal exposure of rodents to VPA reproduces the core signs of human autism. Consequently, VPA rodents have been adopted as environmental models to study several aspects of autistic neurodevelopmental diseases [9, 30].

The zebrafish (larval and adult) presents numerous advantages as a model organism to study brain function and dysfunction [31]. Zebrafish are a highly social species and exhibit a range of social behaviors that could be analyzed and quantified. Recently, VPA exposure at early developmental stages was shown to induce deficits in social interactions, anxiety, and hyperactivity in the adult zebrafishes [32]. Consequently, the VPA-treated zebrafish is another possible model to analyze the deficits relevant to ASD [33]. Similarly, *Xenopus laevis* tadpoles exposed to VPA display abnormal sensorimotor and schooling behaviors suggesting that the effects of VPA are conserved across the vertebrates [34].

Contribution of VPA animal models to our understanding of ASD and development of targeted treatments

As a major role of VPA in the etiology of ASD was demonstrated in several animal species, this compound should be prohibited for pregnant women at any time of gestation. An important issue for pharmaceutical companies is to validate an alternative treatment for VPA-sensitive epilepsy.

VPA and epigenetics

VPA inhibits histone deacetylase (HDAC) and consequently impairs the modulation of gene transcription. A link between autistic-like behaviors and VPA effect on HDAC has been clearly established in mice. Indeed, whereas a prenatal exposure to VPA induced social deficits, a prenatal exposure to valpromide, a VPA analogue lacking histone deacetylase inhibition activity had no effect [35]. Furthermore, prenatal exposure of mice to trichstatine A, a potent HDAC inhibitor, reproduces the sociability deficits induced by prenatal exposure to VPA [36]. Importantly, SHANK2 and SHANK3 [37, 38] which encode a family of postsynaptic scaffolding proteins that are present at glutamatergic synapses and growth cones of developing neurons [39] are genes which show impaired transcription after prenatal exposure to VPA. Mutations in the SHANK family genes are also linked to ASD in humans and animal models [40]. In addition, mRNA expression of Neuroligin3, a member of the Neuroligins family that are postsynaptic cell-adhesion molecules involved in synaptic maturation, is downregulated in some brain regions in the VPA mice [41]. Furthermore, prenatal exposure to VPA induced a transient increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the fetal brain [42]. In the medial prefrontal cortex, VPA exposure altered the expression of a subset of genes implicated in the circadian rhythm and acting in extracellular matrix [43].

Brain structures affected by prenatal VPA exposure

Neuroanatomical and functional investigations of ASD patients have mainly revealed alterations in neocortical structures, limbic system and cerebellum. Similarly, neocortical regions are affected in VPA rodent models of autism. Whereas the typical cortical organization of the prefrontal cortex is preserved, the interneuronal space is wider in VPA-treated than in control animals [44]. A loss of Nissl positive cells in the middle and lower layers of the prefrontal cortex and lower layers of the sensory cortex has been reported in VPA male mice [35]. However, a longer exposure to VPA (prenatal plus postnatal) increased the number of neocortical neurons [45] associated with autistic-like behaviors, suggesting a differential effect of VPA on neocortical structures depending on the duration of the VPA treatment. Morphological alterations in VPA rodent models include complexity of the apical dendrites of cortical motor neurons [46], decreased dendritic branching of neurons in the orbitofrontal and medial prefrontal cortices, decreased spine density of neurons of the prefrontal cortex [47, 48], and synaptic structure deficits in cortical neurons [49].

Several alterations have been identified in the hippocampus after prenatal exposure to VPA, such as a reduced size of CA1 of the dorsal hippocampus [50], increased neuronal density in CA1, CA2, CA3, dentate gyrus and subiculum [51], induced spatial disorganization of the pyramidal CA3 layer and dentate granular cell layers [44], retracted neuronal arborization in the ventral and dorsal hippocampus, reduced number of spines in the dorsal hippocampus and increased dendritic spine density in the ventral hippocampus [48]. The amygdala was also affected by prenatal VPA exposure as the size of the basolateral amygdala [50], as well as the spine density [48] were reduced. A link between morphological rearrangements in limbic regions and the typical exploratory behavior and enhanced spatial memory of VPA animals is under debate [48, 51].

In the cerebellum, prenatal exposure to VPA reproduces the anomalies associated with autism: a reduced volume of the vermis associated with a decrease in Purkinje cell number [22]. In addition, Purkinje cells are smaller with shorter and less complex dendritic arbors [52]. The morphology of the deep cerebellar nuclei was also modified after prenatal exposure to VPA [53]. Accordingly, animals prenatally exposed to VPA performed significantly worse in cerebellum-dependent motor tasks [52].

VPA animal models and the excitation/ inhibition imbalance in autism

Several observations have led to the idea that some forms of autism are caused by an increased ratio of excitation/inhibition in sensory, mnemonic, social and emotional systems [54]. In principle, this imbalance between excitation and inhibition may be a consequence of one or more of the following parameters: ratio between the number of excitatory and inhibitory neurons, neuronal excitability, connectivity, and synaptic strength (based on number of synaptic contacts, number of post synaptic receptors and concentration of neurotransmitter in the synaptic cleft).

As detailed above in VPA animal models, the morphological alterations in neurons (dendritic arbor and dendritic spines) that are susceptible to impact the excitatory/inhibitory ratio have been depicted. Prenatal VPA may alter the expression of transcription factors governing glutamatergic/ GABAergic differentiation during fetal neural development, in conjunction with the genetic preload [55]. Prenatal VPA exposure causes a loss of inhibitory GABAergic Purkinje cells in the rat cerebellum [22] and a loss of GABAergic interneurons in the hippocampal dentate gyrus [56]. VPA exposure also impairs the GABAergic synaptic transmission in the cortex [57]. Intriguingly, GABA has abnormally conserved an immature-like, depolarizing effect on pyramidal neurons in the hippocampus of adult VPA rats [58]. Prenatal VPA treatment was shown to alter GABAergic transmission in both young and adult rodents as the expression of two of its important regulators, the GABAAR β3 subunit and the K-Cl co-transporter KCC2 [59] was downregulated in the temporal cortex, parietal cortex, cerebellar cortex and hippocampus. Similarly, GABRA1, GABRA5 and GABRB2 subunits were downregulated in the cortices of VPA-induced autistic adult mice [60]. VPA is believed to cause an ectopic increase in glutamatergic synapses in the cortex and hippocampus [61] and a selective

overexpression of 2A and 2B subunits of NMDAR in the neocortex of young autistic rats [62]. However, a more recent study shows that NMDAR subunits 2A, 2B, 2C are downregulated in the cortices of VPA-induced autistic adult mice [60].

In the hippocampus, VPA treatment is likely to alter the clearance of glutamate by astrocytes [63] and increase metabotropic glutamate receptor 1A immunoreactivity [64] while drastically reducing the serotonin level [65]. The effect of VPA on the serotoninergic system has been confirmed in zebrafish which selectively fail to express central serotonin after VPA treatment early during development [66]. The implication of serotonergic and dopaminergic deficiencies in the etiology of human ASD is supported by hypofunction of the dopaminergic system in the mouse prefrontal cortex after VPA exposure [67].

VPA models: autism and the intense world theory

At the cellular level, the young rat (PND 12-16) VPA model of autism present hyperconnected, hyperreactive and hyperplastic neuronal microcircuits in different brain regions such as the somatosensory cortex [68], prefrontal cortex [69, 70] and amygdala [71, 72]. The local electric field potentials in the hippocampus and the olfactory bulb also suggest a distinct electrical activity of the brain of animals prenatally exposed to VPA [73]. Overexpression of the NMDA receptor subunits NR2 A and B could be involved in the hyperplasticity at least in somatosensory cortex [74]. Such modifications of the neuronal circuitry are associated with a hyperleaning and a hyperfear memory [70, 71]. Nevertheless, in contrast to young VPA-treated rats, the synaptic function was reduced in the medial prefrontal cortex [75] and expression of the NMDAR subunits was downregulated in the cortex of adult (PND 50) VPA-treated rats [62].

Based on these observations, at least young VPA animals exhibit amplified fear processing and memories along the line of the original notion of an Intense World Syndrome in autism proposed by Markram *et al*. [76, 77]. Their observations in the neocortex and amygdala suggest that hyperfunctional microcircuits become autonomous and memory-trapped leading to exacerbated perception, attention, memory and emotions. In autistic patients, the symptoms may depend on the brain areas concerned by alterations of microcircuit activity [78]. Interestingly, based on the analysis of the number of c-Fos-positive auditory neurons in response to tones, VPA-exposed rats have been postulated to display hyperresponsiveness to sound [79].

The link between hyperreactivity of local neuronal circuitry and the excitatory/inhibitory imbalance and/or hyperconnectivity is still debated [78]. Whereas hyperconnectivity is established in the neocortex [68], the synaptic excitatory/inhibitory balance is believed to be disrupted in the amygdala [72] where the NMDA glutamatergic synaptic plasticity is dysfunctional [80] and the GABAergic system is disturbed [81, 82].

VPA models and sexual dimorphism of ASD

In humans, ASD is reported to be more prevalent in males than in females with a ratio of about 4/1. Interestingly, the rodent VPA models of autism present more pronounced behavioral alterations in males than in females [83-86]. Nevertheless, most studies on VPA animals have been performed on males and only very few studies concern cellular and molecular consequences of this sexual dimorphism. However, female VPA rats appear to lose Nissl-positive cells in the prefrontal cortex, but not in the sensory cortex [87], and postsynaptic maturation is only disturbed in male VPA rats [84]. Interestingly, a recent study reveals sex-specific metabolic and connectivity changes in VPA rats suggesting that difference in patterns of connectivity may underlie autistic-like behavior [86]. Finally, after prenatal VPA exposure, a preferential expression of exon 1- and exon 4-BDNF transcripts has been depicted in females compared to males and may contribute to sex differences in ASDs by protecting females from the adverse effects of genetic variants or environmental factors such as VPA on the developing brain [88]. Investigating sex-related differences in the effects of prenatal exposure to VPA could yield important information about the pathophysiology of ASD.

VPA models and preclinical studies for ASD treatments

One important issue about animal models of human pathologies is their use as a platform for

preclinical studies. In the case of VPA models of ASD, therapies should target core ASD behaviors: the deficits in social interactions and the stereotypes. One classical research axis is testing compounds able to restore the excitatory/ inhibitory balance by acting on the GABAergic and glutamatergic systems. Bumetanide restores the chloride gradient in dysfunctional GABAergic neurons and attenuates the behavioral phenotypes of VPA rats [89] and improves the core symptoms of ASD in children and adolescents [90]. Nematine [91] and Agmatine [92] are two NMDAR antagonists which rescued impaired social behaviors, as well as repetitive behaviors in the VPA-induced mice models of autism. VPA animal models have confirmed the therapeutic effect of ocytocin in ASD. Indeed, intranasal treatment with ocytocin attenuates the deficits in social interaction in prenatal VPA-exposed mice [93] and ameliorates the core symptoms of autism in ASD patients [94]. Elucidating the mechanism of this ocytocin effect on behavior is expected to provide new insights into ASD pathogenesis. Prenatal and early postnatal oxidative stress and neurodegeneration are possible causes of ASD in humans. In agreement, several anti-oxidant and neuroprotective agents has been recently shown to ameliorate behavioral disorders in rodents prenatally exposed to VPA [95-100] and may be effective candidates for pharmacological treatments of ASD.

CONCLUSION

It is clearly established that valproate is a risk factor associated with ASD in humans [17]. Converging data indicates that prenatal exposure of rodents to VPA provides relevant models for analyzing the mechanisms underlying autism**.** Recently developed VPA-treated zebrafish models may also clarify key events leading to neurodevelopmental perturbations associated with ASD. Although the VPA rodents are validated animal models of ASD as shown by the effects of bumetanide and ocytocin on behavioral abnormalities in both ASD patients and VPA rodents, it is now crucial to verify in VPA-treated rodents the correspondence of the core symptoms of ASD identified in human cases and the similarity of the impacted brain regions in human ASD patients and VPA-treated rodents. Furthermore, whereas behavioral therapies produce beneficial effects on ASD patients, environmental enrichment has been shown to reverse behavioral alterations in rats prenatally exposed to VPA [101, 102]. Thus, VPA models of autism provide valuable tools to investigate the brain region-specific neurodevelopmental and cellular defects underlying autistic behaviors and to screen for novel therapeutics.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Nancy Grant and Yannick Bailly for critical reading of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Zablotsky, B., Black, L. I., Maenner, M. J., Schieve, L. A. and Blumberg, S. G. 2015, Natl. Health Stat. Report., 13(87), 1.
2. Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., Harony-Nicolas, H., De Rubeis, S., Drapeau, E., Buxbaum, J. D. and Hof, P. R. 2017, Acta Neuropathol., doi: 10.1007/s00401-017-1736-4.
3. Rossignol, D., Genuis, S. and Frye, R. 2014, Transl. Psychiatry, doi: 10.1038/tp. 2014.4.
4. Tran, N. Q. V. and Miyake, K. 2017, Int. J. Genomics, doi: 10.1155/2017/7526592.
5. Koziol, L. F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H., Ito, M., Manto, M., Marvel, C., Parker, K., Pezzulo, G., Ramnani, N., Riva, D., Schmahmann, J., Vandervert, L. and Yamazaki, T. 2014, Cerebellum, 13(1), 151.
6. Therrien, A. S. and Bastian, A. J. 2015, Curr. Opin. Neurobiol., 33, 127.
7. Li, D., Karnath, H. O. and Xu, X. 2017, Neurosci. Bull., 33(2), 219.
8. Hull, J. V., Jacokes, Z. J., Torgerson, C. M., Irimia, A. and van Horn, J. D. 2017, Front. Psychiatry, 4(7), 205.
9. Roullet, F. I., Lai, J. K. and Foster, J. A. 2013, Neurotoxicol. Teratol., 36, 47.

10. Meshalkina, D. A., Kizlyk, M. V., Kysil, E., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Abreu, M. S., Barcellos, L. J., Song, C., Warnick, J. E., Kyzar, E. J. and Kalueff, A. V. 2017, Exp. Neurol., doi: 10.1016/j.expneurol.2017.02.004.
11. Hulbert, S. W. and Jiang, Y. H. 2016, Neuroscience, 3(321), 3.
12. Bercum, F., Rodgers, K. M., Benison, A. M., Smith, Z. Z., Taylor, J., Kornreich, E., Grabenstatter, H. L., Dudek, F. E. and Barth, D. S. 2015, J. Neurosci., 35(48), 15894.
13. Boksa, P. 2010, Brain Behav. Immun., 24(6), 881.
14. Ali, E. H. and Elgoly, A. H. 2013, Pharmacol. Biochem. Behav., 111, 102.
15. Chapman, A., Keane, P. E., Meldrum, B. S., Simiand, J. and Vernieres, J. C. 1982, Prog. Neurobiol., 19(4), 315.
16. Ornoy, A. 2009, Reprod. Toxicol., 28(1), 1.
17. Christianson, A. L., Chesler, N. and Kromberg, J. G. 1994, Dev. Med. Child. Neurol., 36(4), 361.
18. Christensen, J., Gronborg, T. K., Sorensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H. and Vestergaard, M. 2013, JAMA., 309(16), 1696.
19. Arndt, T. L., Stodgell, C. J. and Rodier, P. M. 2005, Int. J. Dev. Neurosci., 23(2-3), 189.
20. Chomiak, T., Turner, N. and Hu, B. 2013, Patholog. Res. Int., 2013, 712758, doi: 10.1155/2013/712758.
21. Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S. and Romano, J. 1996, J. Comp. Neurol., 370(2), 247.
22. Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B. and Rodier, P. M. 2000, Neurotoxicol. Teratol., 22(3), 319.
23. Narita, N., Kato, M., Tazoe, M., Miyazaki, K., Narita, M. and Okado, N. 2002, Pediatr. Res., 52(4), 576.
24. Schneider, T. and Przewłocki, R. 2005, Neuropsychopharmacol., 30(1), 80.
25. Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Yang, S. I., Cheong, J. H., Shin, C. Y. and Ko, K. H. 2011, Toxicol. Lett., 201(2), 137.
26. Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P. and Halladay, A. K. 2006, J. Autism Dev. Disord., 36(6), 779.
27. Yochum, C. L., Dowling, P., Reuhl, K. R., Wagner, G. C. and Ming, X. 2008, Brain Res., 1203, 126.
28. Gandal, M. J., Edgar, J. C., Ehrlichman, R. S., Mehta, M., Roberts, T. P. and Siegel, S. J. 2010, Biol. Psychiatry, 68(12), 1100.
29. Roullet, F. I., Wollaston, L., Decatanzaro, D. and Foster, J. A. 2010, Neuroscience, 170(2), 514.
30. Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., Harony-Nicolas, H., De Rubeis, S., Drapeau, E., Buxbaum, J. D. and Hof, P. R. 2017, Acta Neuropathol., doi: 10.1007/ s00401- 017-1736-4.
31. Kalueff, A. V., Stewart, A. M. and Gerlai, R. 2014, Trends Pharmacol. Sci., 35(2), 63.
32. Zimmermann, F. F., Gaspary, K. V., Leite, C. E., De Paula Cognato, G. and Bonan, C. D. 2015, Neurotoxicol. Teratol., 52, 36.
33. Meshalkina, D. A. N., Kizlyk, M. V., Kysil, E., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Abreu, M. S., Barcellos, L. J., Song, C., Warnick, J. E., Kyzar, E. J. and Kalueff, A. V. 2017, Exp. Neurol., doi: 10.1016/ j.expneurol. 2017.02.004.
34. James, E. J., Gu, J., Ramirez-Vizcarrondo, C. M., Hasan, M., Truszkowski, T. L., Tan, Y., Oupravanh, P. M., Khakhalin, A. S. and Aizenman, C. D. 2015, J. Neurosci., 35(7), 3218.
35. Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y. and Matsuda, T. 2013, Int. J. Neuropsychopharmacol., 16(1), 91.
36 Moldrich, R. X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N. and Reutens, D. C. 2013, Behav. Brain Res., 257, 253.
37. Kawanai, T., Ago, Y., Watanabe, R., Inoue, A., Taruta, A., Onaka, Y., Hasebe, S., Hashimoto, H., Matsuda, T. and Takuma, K. 2016, Neurochem. Res., 41(10), 2574.
38. Liu, C. X., Peng, X. L., Hu, C. C., Li, C. Y., Li, Q. and Xu, X. 2016, Dev. Genes Evol., 226(6), 389.
39. Sheng, M. and Kim, E. J. 2000, Cell Sci., 113, 1851.
40. Monteiro, P. and Feng, G. 2017, Nat. Rev. Neurosci., 18(3), 147.
41. Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Roullet, F. I., deCatanzaro, D. and Foster, J. A. 2009, Neuroscience, 163(4), 1201.

42. Almeida, L. E., Roby, C. D. and Krueger, B. K. 2014, Mol. Cell. Neurosci., 59, 57.
43. Olde Loohuis, N. F. M., Martens, G. J. M., van Bokhoven, H., Kaplan, B. B., Homberg, J. R. and Aschrafi, A. 2017, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 77, 128.
44. Codagnone, M. G., Podestá, M. F., Uccelli, N. A. and Reinés, A. 2015, Dev. Neurosci., 37(3), 215.
45. Sabers, A., Bertelsen, F. C., Scheel-Krüger, J., Nyengaard, J. R. and Møller, A. 2014, Neurosci. Lett., 580, 12.
46. Snow, W. M., Hartle, K. and Ivanco, T. L. 2008, Dev. Psychobiol., 50(7), 633.
47. Mychasiuk, R., Richards, S., Nakahashi, A., Kolb, B. and Gibb, R. 2012, Dev. Neurosci., 34(2-3), 268.
48. Bringas, M. E., Carvajal-Flores, F. N., López-Ramírez, T. A., Atzori, M. and Flores, G. 2013, Neuroscience, 241, 170.
49. Mahmood, U., Ahn, S., Yang, E. J., Choi, M., Kim, H., Regan, P., Cho, K. and Kim, H. S. 2017, Pharmacol. Res., doi: 10.1016/j.phrs. 2017.08.006.
50. Sosa-Díaz, N., Bringas, M. E., Atzori, M. and Flores, G. 2014, Synapse, 68(10), 468.
51. Edalatmanesh, M. A., Nikfarjam, H., Vafaee, F. and Moghadas, M. 2013, Brain Res., 1526, 15.
52. Main, S. L. and Kulesza, R. J. 2017, Neuroscience, 340, 34.
53. Mowery, T. M., Wilson, S. M., Kostylev, P. V., Dina, B., Buchholz, J. B., Prieto, A. L. and Garraghty, P. E. 2015, Int. J. Dev. Neurosci., 40, 15.
54. Rubenstein, J. L. and Merzenich, M. M. 2003, Genes Brain Behav., 2(5), 255.
55. 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. 2014, Mol. Neurobiol., 49(1), 512.
56. Watanabe, Y., Murakami, T., Kawashima, M., Hasegawa-Baba, Y., Mizukami, S., Imatanaka, N., Akahori, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M. 2017, Neurotox. Res., 31(1), 46.
57. Banerjee, A., García-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P. and Atzori, M. 2013, Int. J. Neuropsychopharmacol., 16(6), 1309.
58. Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K. T. and Cherubini, E. 2012, Neuroscientist, 18(5), 467.
59. Li, Y., Zhou, Y., Peng, L. and Zhao, Y. 2017, Brain Res., 1671, 33.
60. Chau, D. K., Choi, A. Y., Yang, W., Leung, W. N. and Chan, C. W. 2017, Behav. Brain Res., 316, 255.
61. Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J., Dela Pena, I. C., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H. and Shin, C. Y. 2013, J. Neurochem., 124(6), 832.
62. Rinaldi, T., Kulangara, K., Antoniello, K. and Markram, H. 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(33), 13501.
63. Bristot Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes-Santos, A., Torres Abib, R., Zanotto, C., Batassini, C., Brolese, G., Gonçalves, C. A., Riesgo, R. and Gottfried, C. 2013, Brain Res., 1495, 52.
64. Peralta, F., Fuentealba, C., Fiedler, J. and Aliaga, E. 2016, Mol. Med. Rep., 14(3), 2807.
65. Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., Le Guisquet, A. M., Garreau, L., Ternant, D., Bodard, S., Jaumain, E., Gulhan, Z., Belzung, C., Andres, C. R., Chalon, S. and Guilloteau, D. 2010, Neurosci. Lett., 470(1), 55.
66. Jacob, J., Ribes, V., Moore, S., Constable, S. C., Sasai, N., Gerety, S. S., Martin, D. J., Sergeant, C. P., Wilkinson, D. G. and Briscoe, J. 2014, Dis. Model. Mech., 7(1), 107.
67. Hara, Y., Takuma, K., Takano, E., Katashiba, K., Taruta, A., Higashino, K., Hashimoto, H., Ago, Y. and Matsuda, T. 2015, Behav. Brain Res., 289, 39.
68. Rinaldi, T., Silberberg, G. and Markram, H. 2008, Cereb. Cortex., 18(4), 763.
69. Rinaldi, T., Perrodin, C. and Markram, H. 2008, Front. Neural Circuits, 2, 4.
70. Sui, L. and Chen, M. 2012, Brain Res. Bull., 87(6), 556.
71. Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C. and Markram, H. 2008, Neuropsychopharmacology, 33(4), 901.
72. Lin, H. C., Gean, P. W., Wang, C. C., Chan, Y. H. and Chen, P. S. 2013, PLoS One, 8(1), e55248, doi:10.1371/journal.pone. 0055248.

73. Cheaha, D., Bumrungsri, S., Chatpun, S. and Kumarnsit, E. 2015, Neurosci. Res., 98, 28.
74. Rinaldi, T., Kulangara, K., Antoniello, K. and Markram, H. 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(33), 13501.
75. Martin, H. G. and Manzoni, O. 2014, Front. Cell. Neurosci., 8, 23.
76. Markram, H., Rinaldi. T. and Markram, K. 2007, Front. Neurosci., 1(1), 77.
77. Silva, G. T., Le Bé, J. V., Riachi, I., Rinaldi, T., Markram, K. and Markram, H. 2009, Front. Synaptic Neurosci., 1, 1.
78. Markram, K. and Markram, H. 2010, Front Hum. Neurosci., 4, 224.
79. Dubiel, A. and Kulesza, R. J. 2015, Neuroscience, 311, 349.
80. Wu, H. F., Chen, P. S., Chen, Y. J., Lee, C. W., Chen, I. T. and Lin H. C. 2017, Mol. Neurobiol., (7), 5264.
81. Olexová, L., Štefánik, P. and Krškova, L. 2016, Neurosci. Lett., 629, 9.
82. Bertelsen, F., Moller, A., Folloni, D., Drasbek, K. R., Scheel-Krüger, J. and Landau, A. M. 2017, Acta Neuropsychiatr., 29(5), 309.
83. Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K. and Przewłocki, R. 2008, Psychoneuroendocrinology, 33(6), 728.
84. Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J, Dela Pena, I. C., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H. and Shin, C. Y. 2013, J. Neurochem., 124(6), 832.
85. Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y, Maeda, Y., Ago, Y. and Matsuda, T. 2013, Int. J. Neuropsychopharmacol., 16(1), 91.
86. Cho, H., Kim, C. H., Knight, E. Q., Oh, H. W., Park, B., Kim, D. G. and Park, H. J. 2017, Sci. Rep., 7(1), 13213.
87. Hara, Y., Maeda, Y., Kataoka, S., Ago, Y., Takuma, K. and Matsuda, T. J. 2012, Pharmacol. Sci., 118(4), 543.
88. Konopko, M. A., Densmore, A. L. and Krueger, B. K. 2017, Dev. Neurosci., doi: 10.1159/000481134.
89. Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D. C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N. and Ben-Ari, Y. 2014, Science, 343(6171), 675.
90. Lemonnier, E., Villeneuve, N., Sonie, S., Serret, S., Rosier, A., Roue, M., Brosset, P., Viellard, M., Bernoux, D., Rondeau, S., Thummler, S., Ravel, D. and Ben-Ari, Y. 2017, Transl. Psychiatry, 7(3), e1056, doi: 10.1038/tp.2017.10.
91. Kang, J. and Kim, E. 2015, Front. Mol. Neurosci., 8, 17, doi: 10.3389/fnmol.2015.00017.
92. Kim, J. W., Seung, H., Kim, K. C., Gonzales, E. L. T., Oh, H. A., Yang, S. M., Ko, M. J., Han, S. H., Banerjee, S. and Shin, C. Y. 2017, Neuropharmacol., 113, 71.
93. Hara, Y., Ago, Y., Higuchi, M., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T. and Takuma, K. 2017, Horm. Behav., 96, 130.
94. Watanabe, T., Kuroda, M., Kuwabara, H., Aoki, Y., Iwashiro, N., Tatsunobu, N., Takao, H., Nippashi, Y., Kawakubo, Y., Kunimatsu, A., Kasai, K. and Yamasue, H. 2015, Brain, 138, 3400.
95. Banji, D., Banji, O. J., Abbagoni, S., Hayath, M. S., Kambam, S. and Chiluka, V. L. 2011, Brain Res., 1410, 141.
96. Cuevas-Olguin, R., Roychowdhury, S., Banerjee, A., Garcia-Oscos, F., Esquivel-Rendon, E., Bringas, M. E., Kilgard, M. P., Flores, G. and Atzori, M. 2017, J. Neurosci. Res., 95(12), 2456.
97. Zhang, Y., Yang, C., Yuan, G., Wang, Z., Cui, W. and Li, R. 2015, J. Mol. Med., 35(1), 263.
98. Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R. and Gottfried, C. 2014, Neurosci. Lett., 583, 176-81.
99. Kumar, H., Sharma, B. M. and Sharma, B. 2015, Neurochem. Int., 91, 34.
100. Al-Amin, M. M., Rahman, M. M., Khan, F. R., Zaman, F. and Mahmud Reza, H. 2015, Behav. Brain Res., 286, 112.
101. Schneider, T., Turczak, J. and Przewłocki R. 2006, Neuropsychopharmacol., 31(1), 36.
102. Yamaguchi, H., Hara, Y., Ago, Y., Takano, E., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T. and Takuma, K. 2017, Behav. Brain Res., 333, 67.

Chapitre 5 : Le gradient des ions chlorures

Le gradient des ions chlorures est le phénomène permettant à l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) de déclencher l'inhibition du neurone *via* son récepteur $GABA_A$. Il résulte de la différence de concentration en ions chlorures entre le milieu intra- et extra-cellulaire, dont la mise en place se fait au cours du développement, sous le contrôle de l'expression de différents cotransporteurs cation-chlorure. Une dérégulation de ce gradient est impliquée dans différentes pathologies, dont l'autisme.

1 Le GABA : effets excitateurs et inhibiteurs.

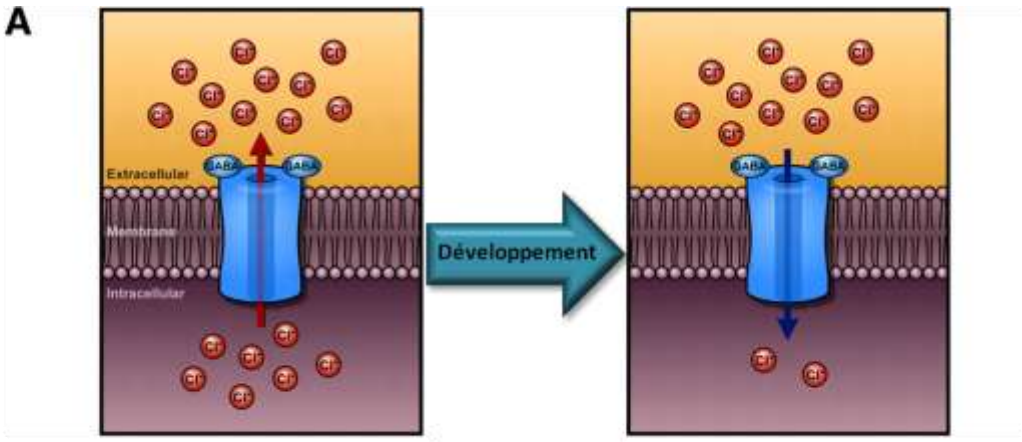
L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), est le principale neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux central. Il agit *via* deux récepteurs : $GABA_A$ et $GABA_B$.

Le récepteur $GABA_A$ est un récepteur canal perméable aux ions chlorures. Il est principalement composé de deux sous-unités α, deux β et une ϒ regroupées autour d'un pore ionique. Jusqu'à maintenant, 6 isoformes de sous-unités α, 3 de β et 3 de ϒ ont été caractérisées. D'autres sous-unités mineures ont également été identifiées tels que δ, ρ ε, θ, π, and ρ. En théorie, un très grand nombre de récepteurs $GABA_A$ peut être assemblé et ce, même au sein d'une unique cellule. Chez l'adulte, l'isoforme dominant est constitué de deux sous-unités α1, 2 β2 et une ϒ2. Le récepteur $GABA_B$ est, lui, un récepteur métabotropique couplé aux protéines G formé de 4 sous-unités auxquelles nous ne nous intéresserons pas ici.

Il existe deux mécanismes par lesquels le GABA peut médier son action inhibitrice, tous deux liés à l'ouverture des canaux associés. Dans le premier, l'ouverture des récepteurs $GABA_A$ permet une entrée d'ions chlorures dans le neurone, selon le gradient électrochimique de cet ion, hyperpolarisant ainsi le neurone. Le potentiel membranaire de ce dernier sera donc plus éloigné du potentiel seuil pour le déclenchement de potentiels d'action et leur émission sera ainsi rendu plus difficile. Le deuxième mécanisme est appelé le mécanisme du shunt inhibiteur. Son principe s'appuie sur la loi d'Ohm. Afin de transmettre un message excitateur, les neurones on besoin d'une dépolarisation (U) elle-même dépendante d'un courant (I) ainsi que d'une résistance (R) fournie par la membrane. Or, si suffisamment de canaux s'ouvrent simultanément, la résistance

membranaire diminuera, rendant le seuil de dépolarisation nécessaire à la génération de potentiels d'action plus difficilement atteignable.

Cependant, le GABA peut également avoir un effet dépolarisant. En effet, lorsque la concentration intracellulaire en ions chlorures est élevée, le potentiel d'inversion pour cet ion peut devenir positif par rapport au potentiel membranaire de repos. Dès lors, l'ouverture des canaux $GABA_A$ conduira à une sortie d'ions chlorures dépolarisant de ce fait le neurone. Cette dépolarisation ainsi créée peut même aller au delà du seuil de déclenchement des potentiels d'action conférant ainsi au GABA des propriétés excitatrices (Cherubini et al., 1991).



Modifié d'après Ben-Ari Y. Neuroscience 2014; 279:187-219.

Figure 2 : Evolution du gradient aux ions chlorure au cours du développement.

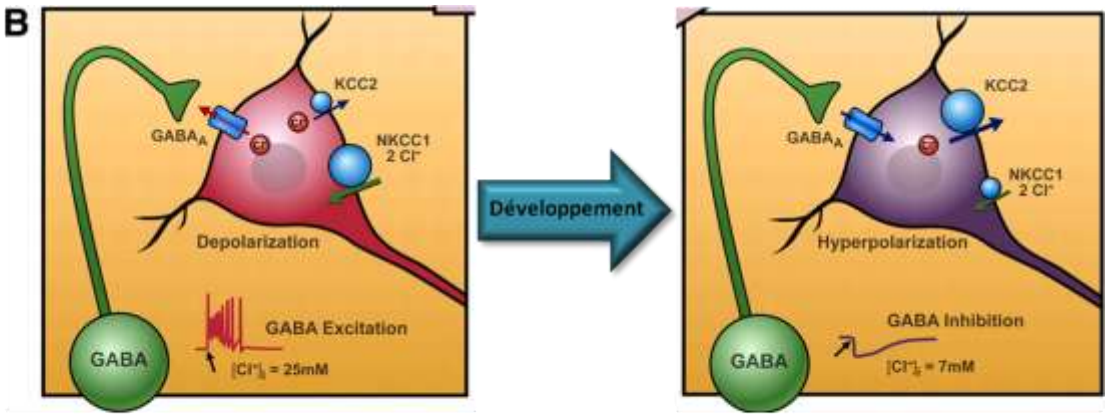
2 - Cotransporteur et développement du gradient

Dans le système nerveux central, les neurones matures présentent une faible concentration intracellulaire en ions chlorures et s'hyperpolarisent en réponse à l'activation des récepteurs $GABA_A$ ($GABA_AR$) par le GABA. Cependant, chez les neurones immatures, la concentration intracellulaire en ions chlorures est élevée, permettant au GABA de les dépolariser (Cherubini et al., 1991; Ben-Ari, 2002).

Le switch d'une action du GABA dépolarisante à hyperpolarisante au cours du développement est due à des changements dans le gradient des ions chlorures, lui-même sous contrôle de

cotransporteurs cation-Cl^-. Le cotransporteur Na^+-K^+-$2Cl^-$ (NKCC1) permet une accumulation de Cl^- dans le milieu intracellulaire des neurones en développement (Alvarez-Leefmans et al., 2001; Ben-Ari, 2002, 2007; Payne et al., 2003), tandis que le cotransporteur K^+-Cl^- (KCC2) permet l'extrusion des ions chlorures (Watanabe and Fukuda, 2015). Le processus ontogénétique subséquent à ce switch est l'augmentation de l'expression du cotransporteur KCC2 et la diminution concomitante de l'expression de NKCC1, au cours du développement, qui va amener la concentration en ions chlorures sur les bas niveaux couramment observés dans le CNS mature et le GABA à son action hyperpolarisante (Yamada et al., 2004). Effectivement, Dzhala et al, dans leur papier de 2015, rapportent que NKCC1 est largement exprimé dans le cortex du rat nouveau-né, tandis que le niveau d'expression de KCC2 ne serait que de 5 à 15% de celui de l'âge adulte (Dzhala and Staley, 2015).

Dans le cervelet, la différenciation et la croissance axonale des CP commencent aux alentours de E15 (Hatten et al., 1997). Or, ces cellules expriment déjà KCC2 à E15.5 et cette expression augmente jusqu'à E18.5. Les niveaux d'expression de KCC2 atteignent les niveaux observés à l'âge adulte aux alentours de P21. Il est intéressant de noter que, contrairement à la plupart des autres populations de neurones, les CP ne présentent pas d'expression du cotransporteur NKCC1 (Mikawa et al., 2002). Zhang et al. (2015) ont mis en évidence deux canaux anoctamine exprimés dans le cervelet et notamment dans les CP : ANO1 et ANO2. Plus particulièrement, ANO2 est exprimé dans l'arborisation dendritique des CP et diminue la force de l'inhibition en augmentant la concentration intracellulaire des ions chlorures (Zhang et al., 2015). Rahmati et al. (2016) ont, eux, montrés que le KO du transporteur SLC26A11, présent sur les CP, conduisait à une diminution de la concentration intracellulaire des ions chlorures. Ces protéines pourraient assurer les fonctions du cotransporteur NKCC1 et expliquer l'absence de son expression dans les CP (Rahmati et al., 2016).



Ben-Ari Y. Neuroscience 2014; 279:187-219.

Figure 3 : Evolution de la signalisation GABAergique et de la balance NKCC1/KCC2 au cours du développement.

3 - Le gradient aux ions chlorures dans un contexte pathologique

Les cotransporteurs aux ions chlorures vont déterminer le gradient aux ions chlorures et ce gradient, en déterminant la force de l'inhibition, va modifier la balance excitation/inhibition (E/I). Ainsi, les niveaux d'expression des cotransporteurs NKCC1 et KCC2 vont influer sur cette balance. Or, une dérégulation de cette balance a été avancée comme cause dans différentes pathologies.

La première pathologie à laquelle on pense lorsque l'on parle de balance E/I est l'épilepsie. L'implication du gradient aux ions chlorures est ici clairement mise en évidence par les mutations des cotransporteurs KCC2 et NKCC1, conduisant à une activité épileptique dans des modèles animaux et étant observées chez l'humain. Des observations de tranches d'hippocampes de patients atteints d'épilepsie temporale montrent une diminution de l'expression de KCC2 et une augmentation de celle de NKCC1 menant à un niveau où l'activité GABAergique devient dépolarisante (Kaila et al., 2014).

L'implication du gradient aux ions chlorures a aussi été montrée dans la douleur chronique. En effet, dans un modèle animal de douleur chronique, on observe une diminution de l'expression

de KCC2 et une perturbation de l'homéostasie des ions chlorures dans les neurones de la corne dorsale superficielle de la moelle épinière.

Un rôle de ces cotransporteurs a aussi été mis en évidence dans la schizophrénie (Arion and Lewis, 2011), le stress (Hewitt et al., 2009) et l'hyperalgésie (Price et al., 2005).

Nous avons vu l'importance du gradient des ions chlorures et de la balance E/I, ainsi que les conséquences que peuvent avoir leurs modifications. Nous allons maintenant nous intéresser aux éléments qui suggèrent une implication de ces modifications dans les TSA.

4 - Gradient des ions chlorures et autisme

Les premières observations menant à l'étude du gradient des ions chlorures pour expliquer le déséquilibre de la balance E/I dans l'autisme ont été une résistance de certains patients aux benzodiazépines, qui suggère une possible modification de ce gradient. Partant de ce postulat, Ben-Ari et Lemonnier (2012) conduisent un essai clinique utilisant le bumétanide, un antagoniste de NKCC1, sur une cohorte d'enfants autistes et obtiennent des résultats positifs (Lemonnier and Ben-Ari, 2010). Ces résultats son rapidement suivi d'une deuxième étude confirmant les résultats de la première (Lemonnier et al., 2012) avec une amélioration des scores sur différentes échelles d'évaluations un mois après la fin des trois mois de traitements.

Tyzio et al. (2014) ont ensuite montré une augmentation de la concentration intracellulaire des ions chlorures et de l'activité excitatrice GABAergique dans des cellules hippocampiques de rats VPA et de souris FMR1 (Tyzio et al., 2014). Le même groupe avait, en 2006, mis en évidence l'existence d'un switch momentané, sous contrôle ocytocinergique, de GABA dépolarisant à GABA hyperpolarisant afin de protéger le cerveau au moment de la naissance (Tyzio et al., 2006). Ils montrent ici que ce switch est aboli dans leur modèle, mais qu'un traitement prénatale au bumétanide restore le profil éléctrophysiologique des neurones et le comportement des animaux.

D'autres études sont venues renforcer l'hypothèse d'une implication du gradient aux ions chlorures dans les TSA. Par exemple, sur des neurones obtenus à partir de cellules pluripotentes

de patients atteints par le syndrome de Rett, Tang et al. (2016) ont observé une sous-expression de KCC2, ainsi qu'un retard de la survenue du switch GABAergique. Ce retard était compensé par l'induction d'une surexpression de KCC2 dans ces mêmes cellules (Tang et al., 2016). Ces auteurs postulent que ce mécanisme pourrait être à l'origine du syndrome de Rett. Or, celui-ci ayant longtemps été considéré comme une forme d'autisme à part entière, on peut émettre l'hypothèse que ces mêmes mécanismes sont à l'œuvre dans les TSA.

D'autres études ont permis de mettre en lumière des interactions possible entre ce que l'on connait de l'autisme et de l'homéostasie du chlore. Par exemple Leonizo et al,. (2016) ont montré que l'expression de KCC2 était sous la dépendance de l'activation du récepteur à l'ocytocine par son ligand (Leonzino et al., 2016). Or, l'ocytocine est connue pour être dérégulée dans les TSA ce qui pourrait amener à une dérégulation du GIC

Partie 2 : Contributions expérimentales

Caractérisation phénotypique des comportements du modèle des souris valproate

Abstract :

Autism spectrum disorders (ASD) are a set of heterogeneous neurodevelopmental disorders, defined by early-onset difficulties in social communication and interaction, together with restricted, repetitive behaviours and interests. The median worldwide prevalence of ASD is about 1% and has been steadily increasing over the past two decades. Imagining and post-mortem studies have unravelled lesions in the cerebellum in patients with ASD, pointing to a role for this structure in the pathology. Exposure to the antiepileptic valproic acid (VPA) during the first trimester of pregnancy, that is associated with a higher incidence of ASD in offspring, was accordingly shown to induce cerebellar alterations in patients and animal models. We used the *in utero* VPA exposure in mice to model ASD, in which we evidenced social interaction deficits and repetitive behaviours coherent with the pathology, as well as deficient motor skill learning.

Material and methods

Animals

All mice were group-housed at the University of Strasbourg, France in temperature-controlled animal facilities (24◦C, 12:12 h light/dark cycle), fed ad libitum with free access to water. C57Bl/6J mice were mated overnight and survey until a vaginal plug was detected. The day of sperm plug detection was defined as gestational day 0 (GD0). At GD12, 400mg/kg or 600 mg/kg valproic acid sodium salt (VPA; Sigma–Aldrich) diluted in 0.9% NaCl was IP administered. Control animals were administered with 0.9%NaCl. All experiments were performed with permission of

the local animal care committee and according the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

All test were adaptated from (Becker et al., 2014).

Animals:

Each behavioural test was performed on 55 mice separate as follow:

	Salin	VPA 400mg	VPA 600mg
Mâles	9	8	8
femelles	11	7	12

Marble:

Mice are placed in a T1 cage containing 5cm of sawdust and 20 glasses marbles (1.5 cm diameter) evenly spaced (cf diagram). Mice spent 15 min in the cage under a light intensity of 40 lux. At the end the number of marble being at least half covered by sawdust were counted.

Direct social interaction:

This test takes place in a square arena (50×50×35) with black Plexiglas walls and white Plexiglas floor allowing infrared light to go through. Test mice are placed in the arena with a stimulus control mouse of the same age, sex and strain for 10 min under a light intensity of 15 lux. Total time spent in close interactions (nose and paw contact), number and duration of each close interaction and of autogrooming events, number of pursuits, rearing and circling are recorded on video track.

Motor stereotypes:

This test is realized in 21×11×17 cm cage fill with 5 cm sawdust under 45 lux light intensity during 10 min. Number of shakes, rearing, burying, grooming and circling and also total time burying are scored directly during the test.

Y-maze exploration:

Spontaneous alternations during maze exploration are taken as record of cognitive flexibility. The maze consist in three arms made of plexiglas (40×9×16 cm) covered with geometrical pattern specific to each arm in order to allow their identification by mice. Test mice are placed in the centre of the maze and allow to freely exploring it during 5 min under 15 lux light intensity. Successive entries in each arm are quote from video-recording. There is three different patterns of exploration: Spontaneous alternation (successive entry in each of the three arms), alternate arm return (alternation between two arm), and same arm return.

Social preference test in the three chamber apparatus:

The apparatus consists in a Plexiglas box divided into three compartments of equal size (40×22×22.5 cm) by transparent acrylic walls. Two sliding doors of 8×5 cm allow mice to go from one chamber to another. Cylindrical contention cage (18×9 cm, 0.5 cm diameter rods with 1 cm interval) are used to contained stimulus mice or an object (fake mouse) in lateral compartment. Stimulus mice are habituated to confinement 20 min daily during two days. During the test, mice are placed in the central compartment and allow to freely explore the apparatus during 10 min under a 15 lux light intensity and with empty cylinder. Then, the mouse is replaced in the

central chamber and stimulus is placed in one of the cylinder and moss mouse in the other one as a control for novelty preference. Sliding door are removed and test mouse is allow to freely explore the apparatus during 10 min. Number of entries in each chamber and number of nose/cylinder contact as well as unitary and total time of each are scored on video recording. Relative position of stimulus mice and moss mouse are equilibrated between each groups.

Novelty suppressed feeding:

Mice are food deprived 24h before test and isolated cage 30 min before test. This test takes place in square arena (50×50) fill with sawdust in the center of which is placed a white tissue with three pellets of classical food. Mice are placed in a corner and allow to freely explore the arena during 15 min maximum under a 60 lux light intensity. Latency to feed is measured as time spent by mice in the arena before biting a pellet. Then they are immediately replaced in home cage for 5 min at the end of which the amount of food intake is scored.

String test:

A metal wire is placed at 40 cm above floor under a 30 lux light intensity. Test begins when mice grip the wire with both front paw and stop when a third paw grips the wire. Three consecutive tests are made.

Skill motor learning :

Motor skill learning are tests on a rotarod (bioseb) accelerating from 4 to 40 rpm in 5 min. Wheel diameter is 5 cm and light intensity is set at 30 lux. On the first day, mice were habituated to the apparatus until they were able to stay on the wheel at 4 rpm during at least

180s. Mice were tested for 3 trials daily during 5 days. For each trial, mice were placed on the wheel rotating at 4 rpm for 1 min. Then acceleration is launch and trial stops when mice fall from the wheel or made two passive rotations (hanging on the wheel). Time spent on the wheel was recorded automatically.

Behaviors of VPA treated mice

VPA mice present deficits in social interactions

Deficient social interactions are core symptom of autism in humans. We assessed the effects of prenatal exposition to VPA on social abilities using two tests, the direct social interaction test and the three-chamber test.

As expected, In the direct social interaction test (Figure 7) we didn't see any significant effect of prenatal exposition to VPA on gender differences (treatment*gender, $p>0.05$). Nevertheless we find a significant deficits in social interactions in VPA mice versus control mice with great reduction in total time spent in social contact ($p<0.0005$ for each doses), number and mean duration of nose contact ($p<0.0005$ for each doses). For the 600mg/kg VPA mice we also saw a significant decrease of the number of following episode ($p<0.05$) and an increase in the number of grooming after social contact. These data show that prenatal exposition to VPA can impaired social interactions in C57 mice without gender effect.

In the three-chamber test (Figure 8) we see no significant effect of prenatal exposition to VPA on gender differences (treatment*gender, $p>0.05$). Nevertheless we find a significant deficit in preferences in VPA mice versus control mice as show by the decrease of the index value which goes from 0.63 for control to 0.50 and 0.47 respectively for VPA 400 and VPA 600 ($p<0.05$ and $p<0.0005$).

VPA mice present an increase of stereotyped behaviors without gender biases

We assessed the effect of VPA prenatal injection on repetitive behaviour by scoring the presence of motor stereotypes (Figure 9A) and by evaluating the pattern of exploration in the Y-maze (Figure 9B) in VPA mice and their saline counterparts.

Figure 9A shows that VPA induce an increase in the number of rearing for both doses ($p<0.05$ and $p<0.0005$ for 400mg and 600mg respectively), in the number of circling for both doses ($p<0.05$ and $p<0.005$ for 400mg and 600mg respectively), in the number of shakes for both doses ($p<0.005$). Thus VPA prenatal exposition increased the occurrence of two types of motor stereotypes.

In the Y-maze exploration test (Figure 9B) we observed that VPA mice have a fewer rates of spontaneous alternation ($p<0.0005$ for both doses), a higher rates of alternate arms returns $p<0.05$ and $p<0.005$ for 400mg and 600mg respectively) and exhibits no change in the rates of same arms returns in the regards with saline mice.

In conclusion, prenatal exposition to VPA increased motor (shakes and circling) and cognitive (perseveration in the Y-maze test) stereotypies in C57/BL6 strain of mice without gender biases.

VPA mice present no increase in anxiety signs

We evaluated the effects of prenatal exposition to VPA on anxiety levels using two tests, the marble burying test (Figure 10A) and the novelty-suppressed feeding test (Figure 10B).

In neither of this test we find significant differences between VPA and saline mice or between male and female mice of each treatment ($p>0.05$)

These data indicate that prenatal exposition to VPA did not modify anxiety levels.

VPA mice present some alterations of their motor performances without gender biases

We assessed the effect of prenatal VPA exposition using three different tests, the string test (Figure 11A), evaluation of locomotors activity (Figure 11B) and the rotarod test (Figure 11C).

In any of this test we find a significant differences between male and female mice of each treatment ($p>0.05$).

For the string test (A) and the locomotors activity (B) we didn't find significant differences between VPA and saline mice ($p>0.05$) meaning that VPA prenatal exposition didn't affect muscular tonus nor global locomotors activity.

In the rotarod test (C) VPA and saline mice performed similary on the first day. On day two the second trial of 600 mg VPA mice is significantly differents ($p<0.05$). The difference between VPA and saline grow bigger and bigger until day 5 when each trial for each VPA doses are significantly shorter than those from saline mice.

These data show that if VPA mice didn't present clear baseline differences in their motor performance they have more difficulties to learn a new motor paradigm.

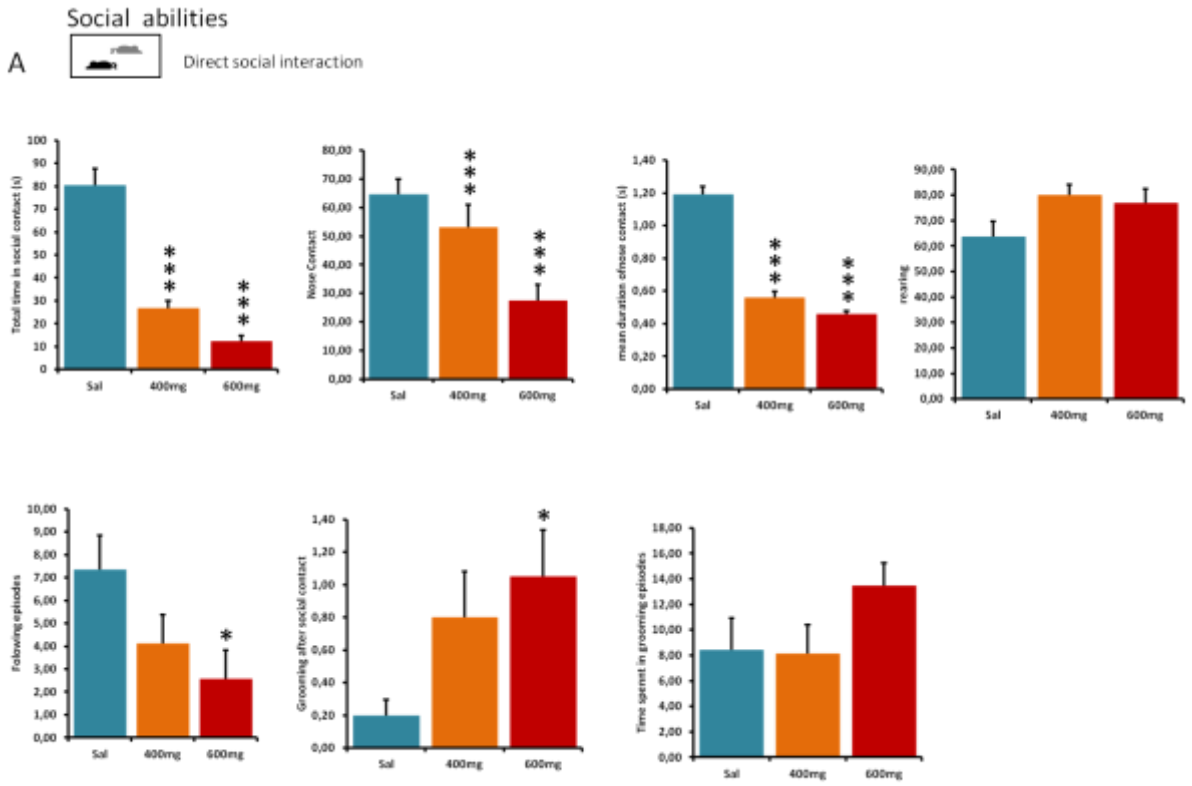


Figure 1. Effect of VPA prenatal injection on social interaction

Figure 7 Effects of VPA prenatal exposure (400 mg/kg and 600 mg/kg) on the main behavioral parameters assessed in the direct social interaction test. Data are presented as mean ± SEM. Comparison to saline mice: on asterik $p<0.05$; two asteriks $p<0.005$; three asteriks $p<0.0005$ (two-way analysis of variance followed by bonferronis post-hoc test).

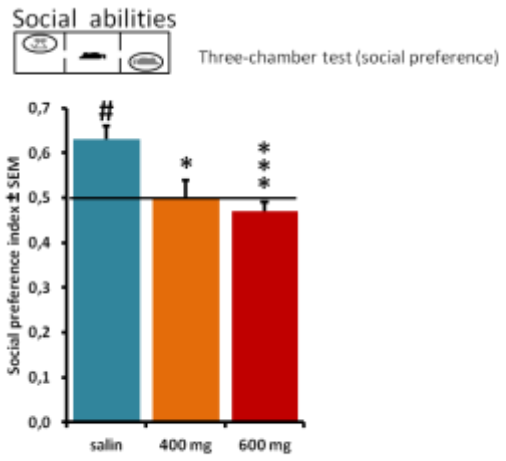


Figure 2. Effect of VPA prenatal injection on social preference.

Figure 8 Effects of VPA prenatal exposure (400 mg/kg and 600 mg/kg) on social preference. The social preference was assessed in the three-chamber test. Data are presented as mean ± SEM. Comparison to saline mice: on asterik $p<0.05$; two asteriks $p<0.005$; three asteriks $p<0.0005$ (two-way analysis of variance followed by bonferronis post-hoc test).

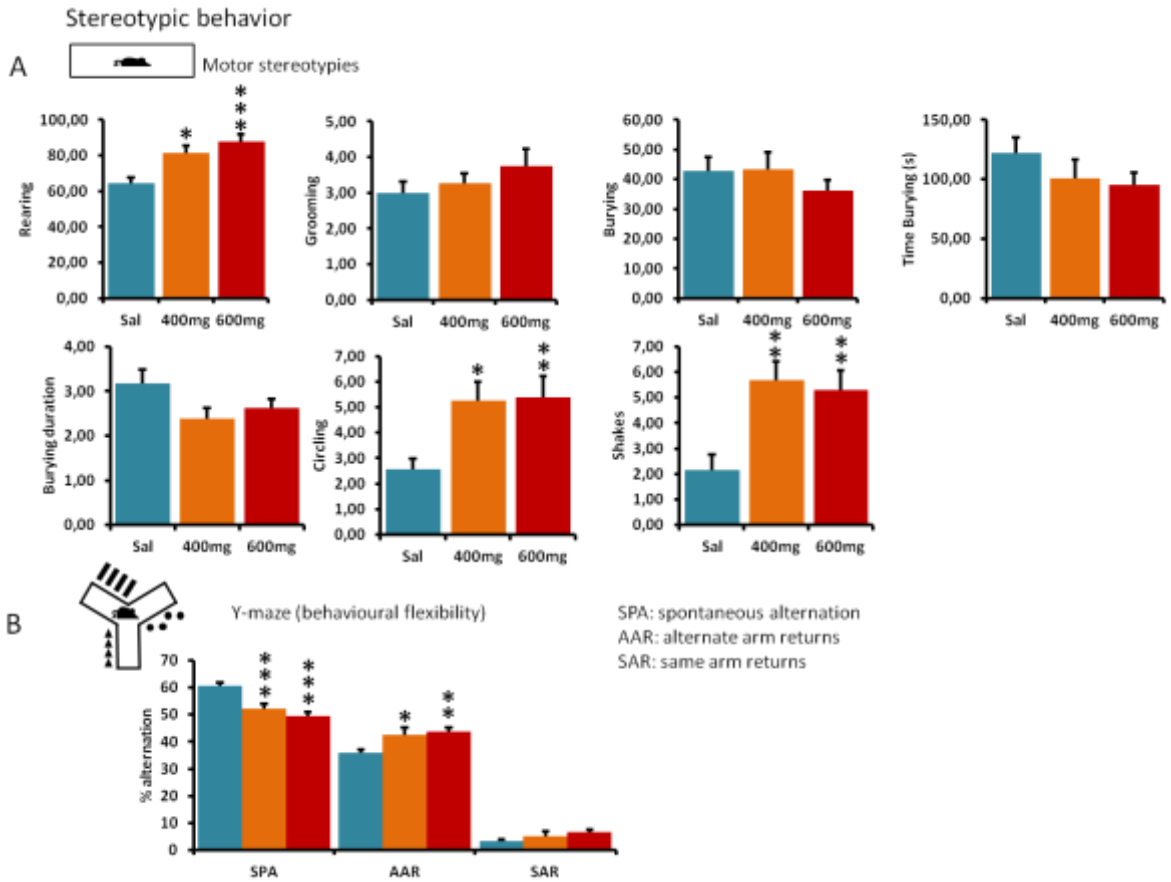


Figure 3. Effect of VPA prenatal injection on motor stereotypies and perseverative behaviour.

Figure 9 Effects of VPA prenatal exposure (400 mg/kg and 600 mg/kg) on stereotypic behaviors. Data are presented as mean ± SEM. Comparison to saline mice: on asterik $p<0.05$; two asteriks $p<0.005$; three asteriks $p<0.0005$ (two-way analysis of variance followed by bonferronis post-hoc test).

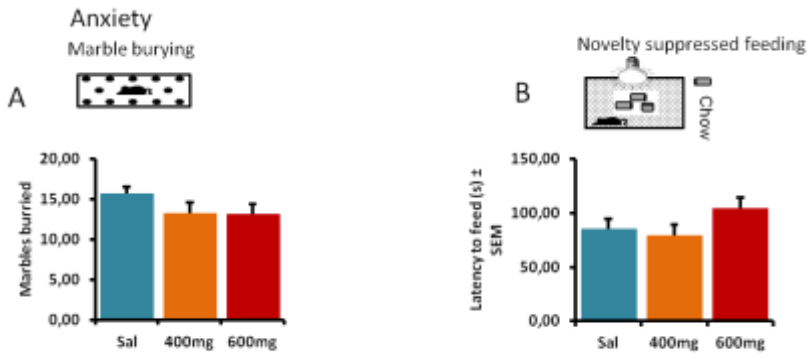


Figure 4. Effect of VPA prenatal injection on anxiety.

Figure 10 Effect of VPA prenatal exposure (400 mg/kg and 600 mg/kg) on anxiety . The anxiety signs were assessed in the marble test and the novelty supressed feeding test. Data are presented as mean ± SEM. Comparison to saline mice: on asterik $p<0.05$; two asteriks $p<0.005$; three asteriks $p<0.0005$ (two-way analysis of variance followed by bonferronis post-hoc test).

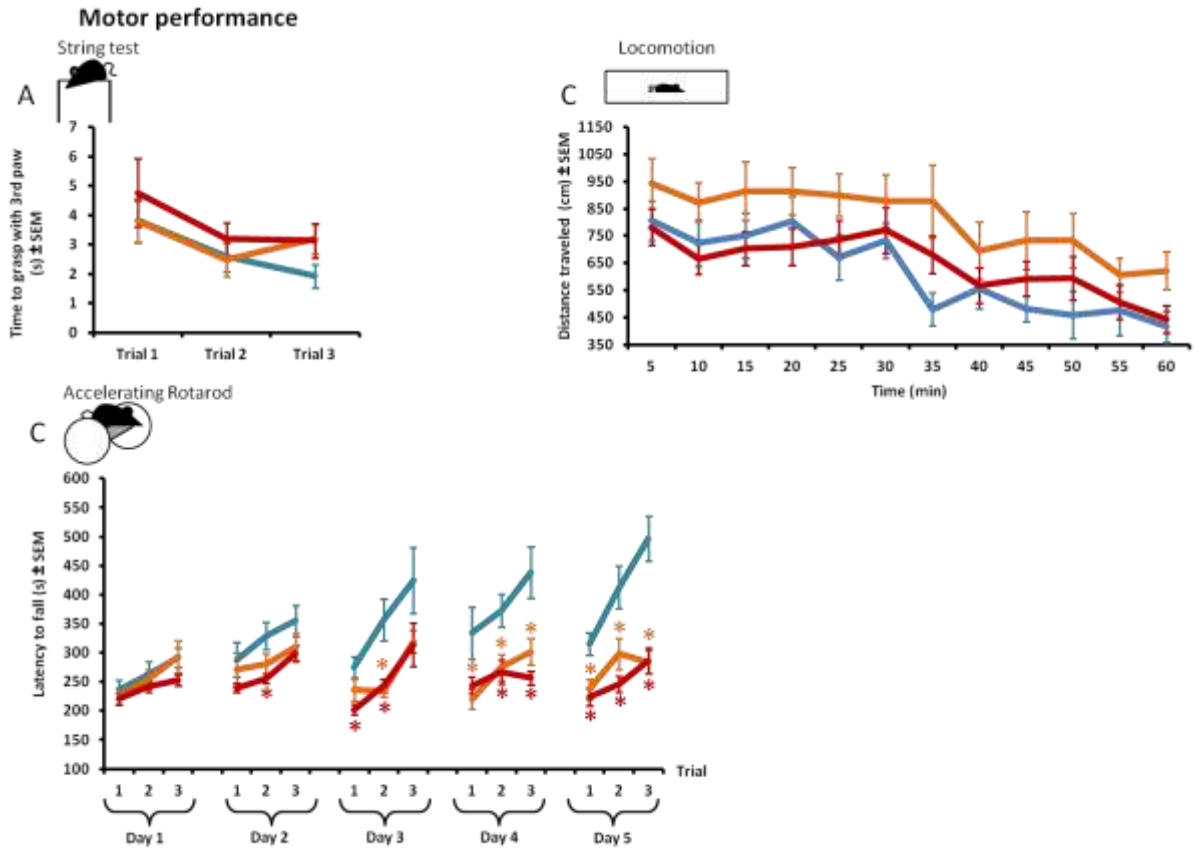


Figure 11 Effects of VPA prenatal exposure (400 mg/kg and 600 mg/kg) on motor performance. The motor performance was assessed using the string test, by measuring the spontaneous locomotors activity and by the rotarod test. Data are presented as mean ± SEM. Comparison to saline mice: on asterik $p<0.05$; two asteriks $p<0.005$; three asteriks $p<0.0005$ (two-way analysis of variance followed by bonferronis post-hoc test).

Article 1 : Maturation of GABAergic transmission in cerebellar Purkinje cells is sex dependent and altered in autism.

(Frontiers in cellular neurosciences : en révision)

Sébastien Roux[1], Ann Lohof[2], Yehezkel Ben-Ari[3], Bernard Poulain and Jean-Louis Bossu[1]

[1]INCI – CNRS UPR 3212 5 rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg – France
[2] UPMC Cassan, bâtiment B, étage 4, case courrier 14, 7 quai Saint Bernard, 75 252 Paris-France.
[3] Neurochlore, bâtiment Beret-Delaage, Ben-Ari Institute of Neuroarcheology, campus scientifique de Luminy, Aix Marseille Université, Marseille, France

frontiers in Cellular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 30 July 2018
doi: 10.3389/fncel.2018.00232

Maturation of GABAergic Transmission in Cerebellar Purkinje Cells Is Sex Dependent and Altered in the Valproate Model of Autism

*Sébastien Roux[1], Ann Lohof[2], Yehezkel Ben-Ari[3], Bernard Poulain[1] and Jean-Louis Bossu[1]**

[1]Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI)—CNRS, UPR 3212, Strasbourg, France, [2]Sorbonne Université, CNRS UMR 8256, Biological Adaptation and Ageing, Paris, France, [3]Neurochlore, Ben-Ari Institute of Neuroarcheology, Campus Scientifique de Luminy, Aix Marseille Université, Marseille, France

Brain development is accompanied by a shift in gamma-aminobutyric acid (GABA) response from depolarizing-excitatory to hyperpolarizing-inhibitory, due to a reduction of intracellular chloride concentration. This sequence is delayed in Autism Spectrum Disorders (ASD). We now report a similar alteration of this shift in the cerebellum, a structure implicated in ASD. Using single $GABA_A$ receptor channel recordings in cerebellar Purkinje cells (PCs), we found two conductance levels (18 and 10 pS), the former being dominant in newborns and the latter in young-adults. This conductance shift and the depolarizing/excitatory to hyperpolarizing/inhibitory GABA shift occurred 4 days later in females than males. Our data support a sex-dependent developmental shift of GABA conductance and chloride gradient, leading to different developmental timing in males and females. Because these developmental sequences are altered in ASD, this study further stresses the importance of developmental timing in pathological neurodevelopment.

Keywords: cerebellum, Purkinje neuron, chloride gradient, autism, sexual dimorphism, $GABA_A$ channels

OPEN ACCESS

Edited by:
Enrico Cherubini, Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati (SISSA), Italy

Reviewed by:
Tommaso Pizzorusso, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Italy
Andrea Barberis, Fondazione Istituto Italiano di Technologia, Italy

****Correspondence:***
Jean-Louis Bossu
jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr

Received: *04 May 2018*
Accepted: *16 July 2018*
Published: *30 July 2018*

Citation:
Roux S, Lohof A, Ben-Ari Y, Poulain B and Bossu J-L (2018) Maturation of GABAergic Transmission in Cerebellar Purkinje Cells Is Sex Dependent and Altered in the Valproate Model of Autism. Front. Cell. Neurosci. 12:232. doi: 10.3389/fncel.2018.00232

INTRODUCTION

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. By opening $GABA_A$ receptor channels and via chloride flow down its electrochemical gradient, GABA hyperpolarizes the membrane potential and thus reduces neuronal excitability in the mature nervous system. Intracellular chloride concentration $(Cl^-)_I$ is regulated by cation-chloride co-transporters that determine the strength of GABAergic inhibition (Rivera et al., 1999; Watanabe and Fukuda, 2015; Raimondo et al., 2017). If the intracellular chloride concentration is high enough that the equilibrium potential for chloride is positive compared to the resting membrane potential, $GABA_A$ receptor activation can depolarize the cell above the action potential threshold, acting like an excitatory neurotransmitter (Ben-Ari et al., 1989; Ben-Ari, 2014). This regulation of $(Cl^-)_I$ has been reported in a wide range of animal species and brain structures; it is affected by many factors including sex steroids, BDNF and IGF-1 signaling (Galanopoulou, 2008; Tsutsui et al., 2011; Waddell and McCarthy, 2012; Ben-Ari, 2014; Watanabe and Fukuda, 2015). Immature neurons have lower $(Cl^-)_I$ than neurons of young adults, leading to depolarizing GABA actions which both activate voltage-gated calcium currents and allow NMDA receptor activation, underlying the well-known trophic actions of GABA in development (Ben-Ari, 2002, 2014; Witte et al., 2014; Raimondo et al., 2017). GABAergic signals also generate action potentials

in many immature neurons, and the switch between excitatory and inhibitory GABA effects occurs at specific developmental time-points, depending on the neural structure and animal species. For example, the GABA "switch" occurs between E15.5 and E 17.5 in mouse spinal motoneurons (Allain et al., 2011), around P5 in the ventral horn of the rat spinal cord (Stein et al., 2004) and in ganglion and amacrine cells of the retina (Zhang et al., 2006), and from P8–P10 in mouse hippocampal pyramidal cells (Ben-Ari et al., 1989; Tyzio et al., 2007). Changes in the timing of the GABA switch, due to genetic mutations and/or environmental insults, are thought to contribute to neurodevelopmental disorders including autism (Ben-Ari et al., 1989; Ben-Ari, 2017).

$GABA_A$ receptors are composed of 2 α subunits, 2 β subunits and 1ϒ subunit, which together form a central ion pore. Excluding splice variants and point mutations, 6 α isoforms, 3 β isoforms and 3 ϒ isoforms have been characterized, as well as some minor subunits (δ, ρ, ε, θ, π and ρ). In theory, therefore, a very large number of $GABA_A$ receptor types may be found even in a single cell. The major adult isoform is generally accepted to be composed of α1, β2 and ϒ2 subunits. Whereas some subunits have a broad expression throughout the central nervous system, other subunits show a restricted cellular and subcellular localization (Sigel and Steinmann, 2012). The expression of $GABA_A$ receptor subunits is developmentally regulated, notably with a developmental switch in α subunit expression associated with a slow-to-fast shift in the kinetics of GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials (Laurie et al., 1992; Fritschy et al., 1994). Thus, in thalamic reticular neurons, a postnatal switch in $GABA_A$ receptor subunits from α5 to α3 is believed to play a role in the early development of the circuit (Pangratz-Fuehrer et al., 2016). Experiments using subunit expression in HEK cells or mouse fibroblasts show that single GABA channels currents have distinct opening conductance levels depending upon subunit composition (Mortensen and Smart, 2006).

Studies on developmental GABA shifts during normal development and in relation to autism spectrum disorders (ASD) have been done primarily in cortical structures. Yet abnormalities of the cerebellum and of cerebellar Purkinje cells (PCs) are frequently described in post mortem studies of humans with autism (Fatemi et al., 2012) as well as in the rodent valproate model of autism (Ingram et al., 2000). In addition, PCs undergo considerable post-natal development, including regression of climbing fiber multi-innervation and dramatic dendritic arbor expansion (Dusart and Flamant, 2012), allowing investigation of these important developmental processes after birth.

We have now measured the changes in somatic $GABA_A$ channel properties and chloride gradient in PCs, comparing these changes in male and female mice, since sex differences in the GABA shift have been reported (Galanopoulou, 2008). We report that in normal and valproate-model male and female mice, the dominant $GABA_A$ receptor channel shifts from high-conductance in the newborn to low-conductance in juvenile and adult mice. This shift in conductance parallels the GABA switch from depolarizing to hyperpolarizing, as it is sex dependent, being delayed in naïve females compared to males. Furthermore, the GABA switch is delayed in mice of both sexes after prenatal exposure to valproate, supporting a role of cerebellar dysfunction in the pathology of autism.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Pregnant C57 mice were injected intraperitoneally with 600 mg valproate sodium salt (n = 18) or saline (n = 15) at embryonic day 12.5 (Roullet et al., 2013). Either control pups or pups from valproate-treated dams were used to prepare acute cerebellar slices for patch-clamp experiments at ages between postnatal days 5 (P5) and 45 (P45). For the study of climbing fiber synapse elimination, either C57 or Swiss pups (because of large number of pups per litter) were used; no differences were found in synapse elimination between the two strains of mice. All procedures followed guidelines established by le Comité National d'ethique pour les Sciences de la Vie et de la Santé (EU Council Directive 2010/63/EU) and were approved by Institutional Animal Care and Use Committees (CREMAS, Comité Régional d'Ethique en experimentation animale de Strasbourg).

Slice Preparation

Standard procedures were used to prepare 250-μm or 300-μm parasagittal slices from control or valproate-treated mice at P5–P45 following a protocol approved by the European and French guidelines on animal experimentation established by le Comité National d'ethique pour les Sciences de la Vie et de la Santé (EU Council Directive 2010/63/EU) and were approved by Institutional Animal Care and Use Committees (CREMAS, Comité Régional d'Ethique en experimentation animale de Strasbourg). Briefly, mice were killed by decapitation under isoflurane anesthesia. Brains were dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) and sliced with a vibratome (Leica VT1200S) at 4°C. Slices were maintained for 30 min at 32°C in an interface chamber containing ACSF equilibrated with 95% O_2, 5% CO_2 and containing (in mM): NaCl 124, KCl 2.7, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1.3, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 0.4, glucose 10, ascorbate 4, then for at least 1 h at room temperature before being transferred to a superfusing recording chamber.

Electrophysiological Recordings

Slices were transferred to a recording chamber on an upright microscope. The recording chamber was continuously perfused at room temperature with bath solution containing: (mM) NaCl 124, KCl 2.7, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1.3, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 0.4, glucose 10, pH 7.4, equilibrated with 95% O_2, 5% CO_2. For cell-attached recordings (in order to stabilized the resting membrane potential) the bath solution contained tetrodotoxin (TTX) 10^{-5} M and NBQX 10^{-5} M. In some experiments isoguvacine or NBQX were applied to the bathing fluid at a concentration of 10^{-5} M. For experiments recording climbing fiber currents, the ACSF contained 10^{-4} M picrotoxin.

Most electrophysiological experiments were performed on visually identified PCs using the patch-clamp technique in the cell-attached configuration. Electrodes were filled for single channels recordings with the following solution (mM): KCl 110, NaCl 2, $MgCl_2$ 2, $CaCl_2$ 2, HEPES 10, tetra-ethyl-ammonium-chloride (TEA) 20, TTX 10^{-3}, $CsCl_2$, 4-aminopyridine (4AP) 1, $BaCl_2$ 1, Isoguvacine or Muscimol 10^{-5}, pH 7.4 ; and for spiking activity with the following solution (mM): NaCl 124, KCl 2.7, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1.3, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 0.4, glucose 10, equilibrated at pH 7.4 with 95%O_2, 5% CO_2.

For experiments recording climbing fiber currents, patch pipettes were filled with a solution containing (mM): Cs-D-gluconate 120, biocytin 13, 10 HEPES, BAPTA 10, TEACl 3, Na_2ATP 2, MgATP 2, NaGTP 0.2, pH 7.3, 290–300 mOsm. Climbing fiber currents were elicited by stimulation in the internal granular layer with a saline-filled glass pipette.

Signals were recorded and filtered at 5 kHz using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instrument). Current and voltage signal were digitized at 50 kHz using a Digidata 1322A (Axon Instruments) prior to being recorded directly using Clampex (10.2) software. Analysis was performed off-line using Clampfit (10.2) software. Data were filtered before analysis with a cut off frequency of 1.5 or 1 kHz.

Graphs, Fitting Procedures and Statistics

Sigma plot 12.5 software was used for graphic representations of the data, fitting procedures and statistical analysis. For channels conductance analysis the normality Shapiro-Wilk test, and equal variance test were used before running an un-paired Student's *t*-test. Data were considered statistically significant when $P < 0.05$. * is used for P values between 0.05 and 0.01; ** for P values between $P > 0.01$ and 0.001. *** is used for P values < 0.001. The quality of the fit was determined using the prediction error.

RESULTS

Two $GABA_A$ Conductances in Neonatal PCs

The single-channel properties of $GABA_A$ receptors have been extensively studied in neuronal cultures and brain slices. In cerebellar granule cells, three main conductance (28, 17, 12 pS) have been characterized and are attributed to distinct $GABA_A$ receptor subtypes (Brickley et al., 1999). We analyzed currents activated by isoguvacine or muscimol, two $GABA_A$ receptor agonists, recorded from 108 cell-attached patches from PCs in acute cerebellar slices from male and female mice, between P5 and P45. In 10 patches, two conductance levels were recorded simultaneously (**Figure 1**). **Figure 1A1** illustrates current traces showing two channels subtypes with a slope conductance of 19 pS and 7.3 pS, reversing at the same potential, indicating a similar ionic selectivity (**Figure 1A3**). The amplitude distribution in **Figure 1A2** shows that the dominant channel conductance in this patch is level 1, and that it is not the result of simultaneous openings of two level 2 channels. The mean conductance slope value is 17.7 ± 0.9 pS for level 1 and 8.1 ± 0.5 pS for level 2 (**Figure 1B**, $n = 10$); these are significantly different ($P < 0.001$).

The histogram distribution of the slope conductance of level 1 (in red) and 2 (in blue) channels are illustrated in **Figure 1C**. For both channel types the amplitude distribution is normal and fitted with a Gaussian function but with distinct peak values, 17 pS for level 1 and 7.5 pS for level 2.

GABA Conductance Switch During PC Development

A switch in the dominant $GABA_A$ receptor channel conductance occurs during development, from primarily level 1 in immature PCs (P5–12) to primarily level 2 in mature (P26–45) PCs in both sexes. Two recordings from PCs (female mice) illustrating this switch are shown in **Figure 2A1**. At P6, the slope conductance of the dominant $GABA_A$ receptor channel is 18 pS, whereas at P24 it is 10.8 pS (**Figure 2A2**).

Figure 2B summarizes and compares the conductances of the dominant channels recorded in males (left panel) at P5–12 (newborn) and at P28–45 (young adult) and in females (right panel) at P6–12 and P26–36. In males the mean conductance of the dominant $GABA_A$ channel switch from 17.3 ± 1.6 pS ($n = 14$) at P5–12 to 10.5 pS ± 1.7 pS ($n = 15$, $p < 0.001$) at P28–45; and in females from 18.5 ± 3.0 pS ($n = 11$) at P6–12 to 9.8 ± 8 pS ($n = 6$, $p < 0.001$) at P26–36. In newborn mice (both sexes), the mean conductance of the dominant $GABA_A$ channel is not significantly different from the level 1 conductance illustrated in **Figure 1**; similarly, the mean conductance of the dominant $GABA_A$ channel in young-adult mice (both sexes) is not significantly different from the level 2 conductance illustrated in **Figure 1**. Thus $GABA_A$ channels in PCs switch from level 1 to level 2 during post-natal development.

Sexual Dimorphism of the Chloride Gradient Shift

We then determined the reversal potential of the dominant $GABA_A$ receptor channel relative to the resting membrane potential (RP) during PC development in males and females. **Figure 3** illustrates current recordings obtained in PCs from a P16 male (**Figure 3A**) and a P16 female (**Figure 3B**). The reversal potential of the $GABA_A$ receptor channel is determined by the linear regression used to fit the current/voltage (I/V) relationship of a single $GABA_A$ receptor channel. At P16, the reversal potential is negative to RP (−14 mV) in males (**Figure 3A**, bottom panel), but positive to RP (+4 mV) in females (**Figure 3B**, bottom panel).

The changes in GABA reversal potential relative to RP in cerebellar PCs from males and females is illustrated in **Figure 3C**. The curve in males can be fitted with a sigmoidal function (four parameters, X_0 14.4 days). Between P5–P11 the reversal potential is stable, around +10 mV relative to RP; the reversal potential then rapidly reaches a negative value around P14 and stabilizes at P26 around −10 mV relative to RP (−10.3 ± 5.0 mV, $n = 10$ at $P \geq 26$, see bottom graph in inset). Therefore, GABA exerts depolarizing effects in male PCs prior to P15 and hyperpolarizing effects thereafter.

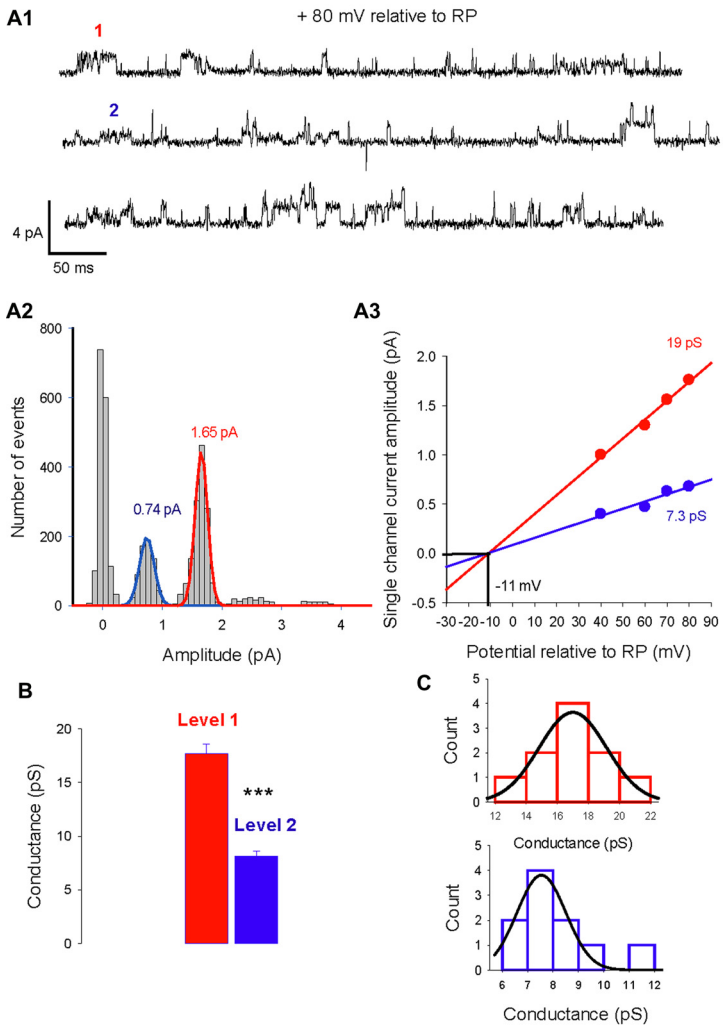


FIGURE 1 | Two levels of type A gamma-aminobutyric acid ($GABA_A$) receptor channel conductances can be recorded from the same Purkinje cell (PC) membrane patch. **(A1)** Current traces recorded in cell-attached conditions at a potential of 80 mV relative to resting potential (RP). Two amplitude levels of $GABA_A$ receptor channels are seen (level 1 in red, level 2 in blue). **(A2)** Data from the same patch as in panel **(A1)** is illustrated in a current amplitude histogram. The distribution is fitted by two Gaussians, with peaks at 1.65 pA and 0.74 pA. **(A3)** The relation between single channel current amplitude and the potential relative to RP for the two conductance levels. Linear regressions give slope conductances of 19 pS (red) and 7.3 pS (blue). The reversal potential for the two conducting levels is −11 mV relative to RP. **(B)** Bar graphs of level 1 (red) and level 2 (blue) conductances recorded in 7 PC membrane patches. The mean value of level 1 is 17.7 ± 0.9 pA and differs significantly (***$p < 0.001$) from the mean value of level 2 (8.1 ± 0.5 pA). **(C)** Histogram distribution of the slope conductance of level 1 (red) and level 2 (blue). Each conductance distribution follows a normal distribution fitted by a Gaussian with a peak value of 17 pS for level 1 and 7.5 pS for level 2.

With the exception of the earliest post-natal days, the developmental curve of the reversal potential in female PCs also follows a sigmoid pattern from P8 to P21 but with a systematically more depolarized value compared to males (**Figure 3C**, red symbols). Although the reversal potential is not significantly more negative between P5 and P7 in females than in males (+3.5 mV vs. +8.7 mV), it then becomes significantly ($p < 0.001$) more positive between P8 and P12 (+15.8 ± 3.6 mV, n = 11) than in males (+9.1 ± 4.1 mV, n = 8, see top graph in inset). From this higher plateau value, the reversal potential change over time is best fitted by a sigmoid curve (four parameters, X_0 18.7 days) and decreases to −8.5 ± 3.5 mV (n = 8), at P26 and older (see bottom graph in inset). These observations show that GABA exerts more depolarizing actions in female PCs than in male PCs during a period of nearly 2 weeks (P8 to P21). In addition, the GABA switch is delayed in females by 4 days (P18 vs. P14 in males), such that from P15–19 the reversal potential is negative relative to RP in males (−15.9 ± 7.4 mV, n = 17) but still positive in females (+7.6 ± 5 mV, n = 10; see top graph in inset).

An important step in cerebellar synaptic maturation during the early postnatal period is the refinement of climbing fiber synapses on PCs, from a multiple climbing fiber innervation to mono-innervation (Hashimoto and Kano, 2003). To determine possible links between GABA signaling and circuit refinement in terms of climbing fiber synapse elimination, we measured

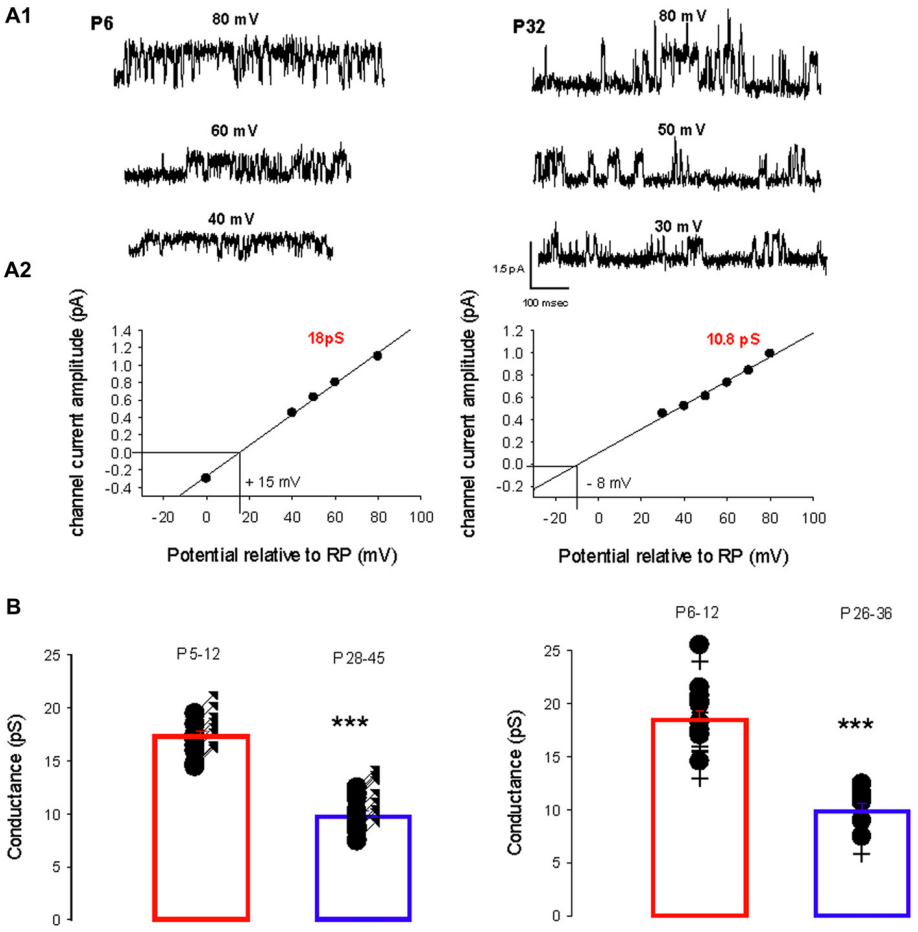


FIGURE 2 | Developmental evolution of the main $GABA_A$ receptor channel conductance. **(A1)** Current traces recorded in cell-attached conditions at different potentials relative to RP as indicated, from a female at P6 (left) and at P32 (right). **(A2)** Current-voltage relationship for the channel recorded at P6 (left) and at P32 (right). Linear regressions yield a conductance of 18 pS (level 1) and a reversal potential at +15 mV relative to RP for the channel recorded at P6; and a conductance of 10.8 pS (level 2) and reversal potential at −8 mV relative to RP for the channel recorded at P32. **(B)** The left panel shows the conductance of the dominant $GABA_A$ receptor channel recorded from males between P5–P12 (n = 14) and P28–45 (n = 15). Each point represents an individual cell. The bar graphs show the mean values ± SD from P5–12 (red) and P28–45 (blue). These mean values (17.3 and 10.1 pS) are significantly different (***$p < 0.001$). The right panel illustrates the conductance of the dominant $GABA_A$ receptor channel recorded from females between P6–P12 (n = 11) and P26–36 (n = 6). Each point represents an individual cell. The bar graphs show the mean values ± SD at P6–12 (red) and P26–36 (blue). These mean values (18.5 and 10.5 pS) are significantly different (***$p < 0.001$). The conductances at P5–12 in males and at P6–12 in females are not significantly different and neither is significantly different from the mean level 1 conductance. The conductances at P24–45 in males and at P26–36 in females are not significantly different and neither is significantly different from the mean level 2 conductance.

the number of climbing fiber synapses on each PC from males and females at different ages (**Figure 3D**). The progress of synapse elimination in both sexes was very similar, indicating that sex-dependent differences in GABAergic signaling does not disrupt this fundamental developmental process.

The Developmental Switch of the Chloride Gradient Is Delayed in the Valproate Mouse Model of Autism

In the valproate rat model of autism, the developmental regulation of the chloride gradient, which determines the effects of $GABA_A$ receptor activation on neuronal excitability, is disrupted in hippocampal neurons. As a result, the developmental excitatory-inhibitory switch of GABAergic effects is abolished in hippocampal neurons from valproate rats, with depolarizing actions from birth onwards (Tyzio et al., 2014). We used this same model in mice to analyze the developmental changes in $GABA_A$ receptor channel conductance and the chloride gradient. We recorded 57 PC-attached recordings of $GABA_A$ receptor channels from 35 males and 22 females from valproate-treated dams, at different postnatal ages. As in control mice, recordings from valproate mice revealed two conductance levels (level 1 mean value 15.8 ± 0.4 pS and level 2 mean value 7.8 ± 0.5 pS, $p < 0.001$) that could occasionally be recorded from the same patch (five patches, **Figure 4A**). Furthermore,

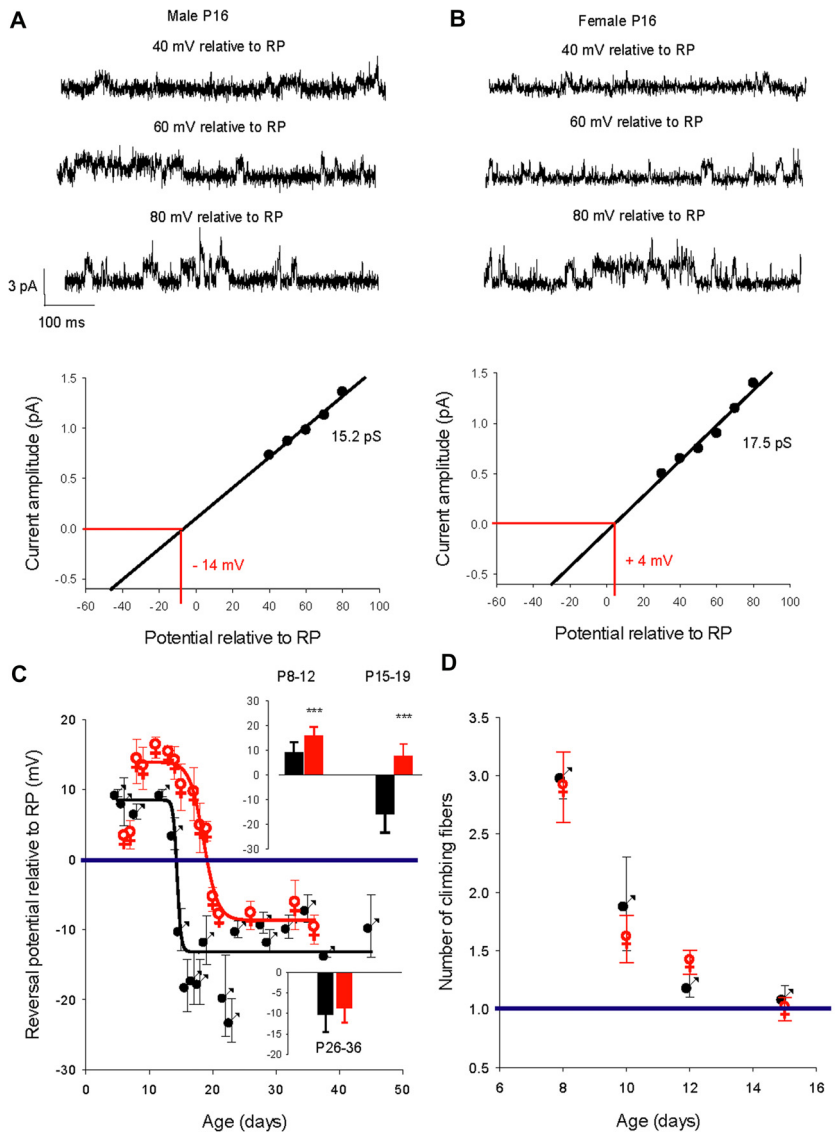


FIGURE 3 | Developmental evolution of the $GABA_A$ receptor channel reversal potential in males and females and climbing fiber synapse elimination. **(A)** Recordings from a P16 male. Current traces show the $GABA_A$ receptor channel recorded from a PC membrane patch at three potentials as indicated on top of each trace. The I/V curve below, a linear regression of the data from this channel, gives a conductance of 15.2 pS and a reversal potential with an extrapolated value of −14 mV relative to RP. **(B)** Recordings from a P16 female. Current traces show the $GABA_A$ receptor channel recorded from a PC membrane patch at three potentials as indicated on top of each trace. The I/V curve below, a linear regression of the data from this channel, gives a conductance of 17.5 pS and a reversal potential with an extrapolated value of + 4 mV relative to RP. Note that at the same post-natal age the $GABA_A$ receptor channel reverses at a negative potential relative to RP in the male, but in the female reversal occurs at a positive potential relative to RP. **(C)** Left graph, evolution of the mean reversal potential of the dominant $GABA_A$ receptor channel as a function of the age in males (black) and females (red). The data were best fit (R 0.98) by a sigmoidal hill function with four parameters ($f = Y_0 + a/(1 + \exp(-(X - X_0)/b))$ between P5 and P48 in males (black line, a (max) = 22, b (slope) = −0.31, X_0 = 14.4 and Y_0 (min) = −13.5) and in between P8 and P36 in females (red line, a = 24.2, b = −1.25, X_0 = 18.5, Y_0 = −8.3). The horizontal line at 0 mV shows the depolarizing/hyperpolarizing switch. The bar graphs in inset compare the mean values of the reversal potential relative to RP in males (black) and in females (red) at P8–12, P15–19 and P26–36. A significant difference between males and females (***$p < 0.001$) was found at P8–12 and P15–19. **(D)** Right graph: regression of climbing fiber multi-innervation of Purkinje cells (PCs) is similar in males and females, indicating that this basic circuit maturation during this developmental period is not sex-dependent.

as in control mice, PCs from valproate-treated male or female newborn mice show a dominant level 1 conductance channel, and PCs from juvenile and young adult PCs showed a dominant level 2 conductance channel. In males, the mean conductance switches from 17.1 ± 1.6 pS (n = 13) at P6–10, to 13.1 pS ± 1.8 pS (n = 5) at P24–30 (**Figure 4B**, p = 0.002). In females, the mean conductance switches from 17.7 ± 3.2 pS (n = 5) at P7–10, to 10.9 pS ± 1.6 pS (n = 7) at P23–30 (**Figure 4C**, $p < 0.001$). These conductance levels are not different between the sexes nor are they different from conductance levels 1 and 2 (**Figures 1B**, **4A**)

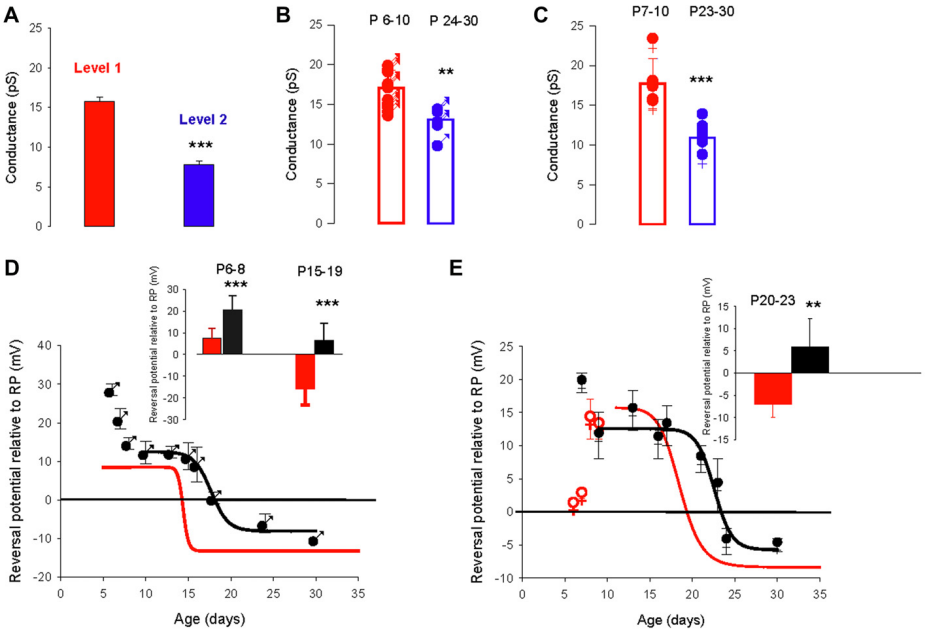


FIGURE 4 | The valproate mouse model of autism alters developmental evolution of $GABA_A$ channel reversal potential. **(A)** Mean slope conductance of the two conductance levels found simultaneously in five cell-attached recordings from PCs of male and female mice prenatally exposed to valproate. The level 1 (red) conductance (15.8 ± 0.4 pS) is significantly different from the level 2 (blue) conductance (7.8 ± 0.5 pS; ***$p < 0.001$). **(B)** Conductance of the dominant $GABA_A$ receptor channel recorded in PCs from male valproate mice at P6–10 ($n = 13$) and at P24–30 ($n = 5$). Each symbol represents a single cell-attached recording. The bar graphs show the mean values ± SD between P6–10 (red) and between P24–30 (blue). These mean values (17.1 and 13.1 pS) are significantly different (**$p = 0.002$). **(C)** Conductance of the dominant $GABA_A$ receptor channel recorded from female valproate mice at P7–P10 ($n = 5$) and at P23–30 ($n = 7$). Each symbol represents a single cell-attached recording. The bar graphs show the mean values ± SD at P7–10 (red) and at P23–30 (blue). These mean values (18.5 and 10.5 pS) are significantly different (***$p < 0.001$). The mean conductances at P6–10 in males and at P7–10 in females are not significantly different, and neither is significantly different from the level 1 channel conductance. The mean conductances at P24–30 in males and at P23–30 in females are not significantly different and neither is significantly different from the level 2 conductance. **(D,E)** Reversal potential of $GABA_A$ receptor channels during development, in PCs recorded from male **(D)** and female **(E)** valproate mice. **(D)** In males, the depolarizing/hyperpolarizing switch is delayed in valproate animals (black symbols). Evolution of the $GABA_A$ reversal potential with age (P5–P30). From P10 to P30 the data are best fit using a sigmoidal hill function with four parameters (black line, $a = 21$, $b = -0.16$, $X_0 = 17.7$ and $Y_0 = -8$). The curve in red represents the same curve but for control males. The inset bar graphs compare the mean values of the reversal potential relative to RP in control males (black) and valproate males (red) at P6–8 and P15–19. A significant difference between control males and valproate males (***$p < 0.001$) is detected. **(E)** In females, the depolarizing/hyperpolarizing switch is less altered in valproate animals (black symbols) Evolution of the $GABA_A$ receptor channel reversal potential with age (P6–P30) in valproate females. Data are best fit by a sigmoidal function four parameters (black curve, $a = 17$, $b = -0.28$, $X_0 = 23$ and $Y_0 = -5$). The red curve is a sigmoidal fit of the evolution of the reversal potential in control females and the red open dots the mean value in control females not included in the fit by the red line. The bar graphs in inset compare the mean values of the reversal potential relative to RP in control females (black) and valproate females (red) at P20–23. A significant difference between control females and valproate females (**$p = 0.003$) is reported.

in control mice. Therefore, the conductance shift is not impacted in this ASD model.

However, the developmental change in the $GABA_A$ receptor channel reversal potential was clearly more complicated in valproate-treated male mice (**Figure 4D**, black symbols) than in control male mice (red sigmoid, from **Figure 3C**). At P6–8 the reversal potential is significantly ($p < 0.001$, see graph in inset) more positive relative to RP (+20.6 ± 6.5 mV, $n = 10$) in valproate males compared to control males (+7.4 ± 4.6 mV, $n = 9$), decreases to a plateau value around +12 mV at P10, then reaches a negative value around P20 (sigmoid curve, X_0 = P17.7 days). Thus, the switch from depolarizing to hyperpolarizing effect of GABA is delayed by 3 days in valproate male mice compared to control males. Therefore during a relatively long period, GABAergic currents are more depolarizing in valproate mice than in age matched control mice. Indeed, at P15–19 the mean reversal potential of the $GABA_A$ channel is still positive in valproate mice (+6.6 ± 4.4 mV, $n = 17$ compared to −15.9 ± 7.4 mV, $n = 11$ in control male mice, $p < 0.001$, see graph in inset). These differences are less evident in females (**Figure 4E**). Yet at P7 in valproate female mice the reversal potential of $GABA_A$ channels is around +20 mV relative to RP whereas it is about +5 mV relative to RP in control females. Furthermore, a comparison between the sigmoidal fit of the data obtained from valproate females (black curve, X_0 22.7 days) and the sigmoidal fit of the data obtained in control females (red curve, from **Figure 3C**) reveals a delay of the GABA switch of almost 4 days. As a consequence, at P20-P23 the mean reversal potential of the $GABA_A$ channels is positive relative to RP (+5.8 ± 6.5 mV, $n = 8$) in valproate treated females but negative (−7.0 ± 3.0 mV, $n = 8$, $p = 0.003$) in control females (see inset **Figure 4D**).

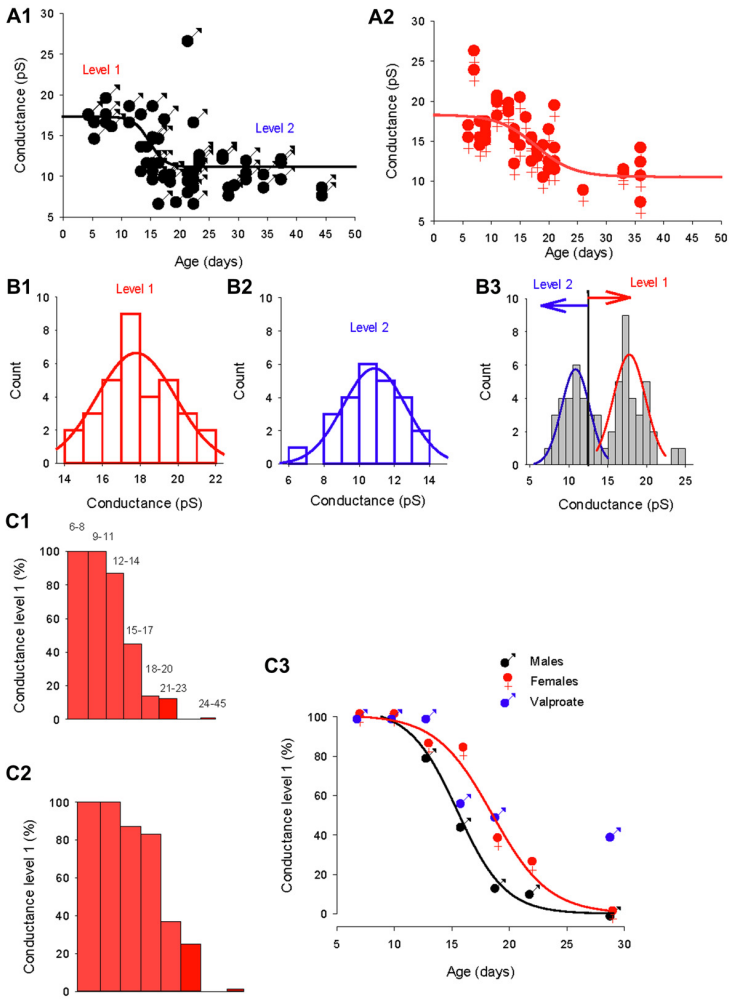


FIGURE 5 | Distinct evolution of the GABA switch between conductance levels 1 and 2 in males, females and valproate-treated males. **(A1)** Dominant $GABA_A$ channel conductance from level 1 to level 2 as a function of the post–natal age in males (each point represents a single cell). Data are best fit with a sigmoidal hill function with four parameters (black line, $a = 6.2$, $b = -1.33$, $X_0 = 14.7$ and $Y_0 = 11.1$). **(A2)** Dominant $GABA_A$ channel conductance from level 1 to level 2 as a function of the post–natal age in females (each point represents a single cell). Data are best fit with a sigmoidal hill function with four parameters (red line, $a = 7.8$, $b = -3.3$, $X_0 = 17.7$ and $Y_0 = 10.5$). Note the presence of three channels with a conductance around 25 pS. **(B1)** Histogram distribution of the slope conductance of level 2 channels (pooled data from **Figures 1B**, **2B**, **4A**). The distribution is normal and fit by a Gaussian (blue line) with a peak value at 10.9 pA. **(B2)** Histogram distribution of the slope conductance of level 1 channels (pooled data from **Figures 1B**, **2B**, **4A**). The distribution is normal and fit by a Gaussian function (red line) with a peak value at 17.8 pA. **(B3)** Histogram distribution of the slope conductance of level 1 and level 2 channels (pooled data from **B1** and **B2**). To determine the limit of conductance between level 2 (blue line) and level 1 (red line) the Gaussian fits obtained in **(A1, A2)** were superimposed. The limit between levels 1 and 2 is 14 pS. Channels with conductances $\geq$14 pS are classified as level 1 channels and channels with conductances $<$14 pS are classified as level 2 channels. **(C1)** Data from male mice. The bar plots show the % of level 1 channels (conductance $\geq$14 pS) at increasing post-natal age ranges, as indicated on top of each bar. **(C2)** Data from female mice. The bar plots show the % of level 1 channels (conductance $\geq$14 pS) at increasing post- natal age ranges (the same range as in **C1**).
(C3) Percentage of conductance level 1 as the function of the age in male mice (black symbols) female mice (red symbols) and valproate treated male mice (blue symbols). Data for control males (black curve) and females (red curve) are best fit using a sigmoidal function with the following parameters: $a = 99$, $b = -1.9$, $X_0 = 15.3$ and $Y_0 = 3.2$ for males; and $a = 100$, $b = -2.42$, $X_0 = 18.5$, $Y_0 = 0.43$ for females.

Sex Dependence of the GABA Conductance Shift: Parallel Development of $GABA_A$ Channel Reversal Potential and Conductance

To determine whether the $GABA_A$ channel conductance and the reversal potential switch occur in parallel, we compared the development of the $GABA_A$ channels conductance in males and females (**Figure 5**). As a first approach, the slope conductance of the dominant $GABA_A$ channel was plotted as a function of age in males (**Figure 5A1**) and females (**Figure 5A2**). The evolution of the conductance could be fitted in both sexes by a sigmoidal function (black and red lines) but with distinct parameters (slope = -1.33, X_0 = 14.7 days for males and slope = -3.3, X_0 = 17.7 days for females) indicating that the shift in conductance is slower and later in females compared

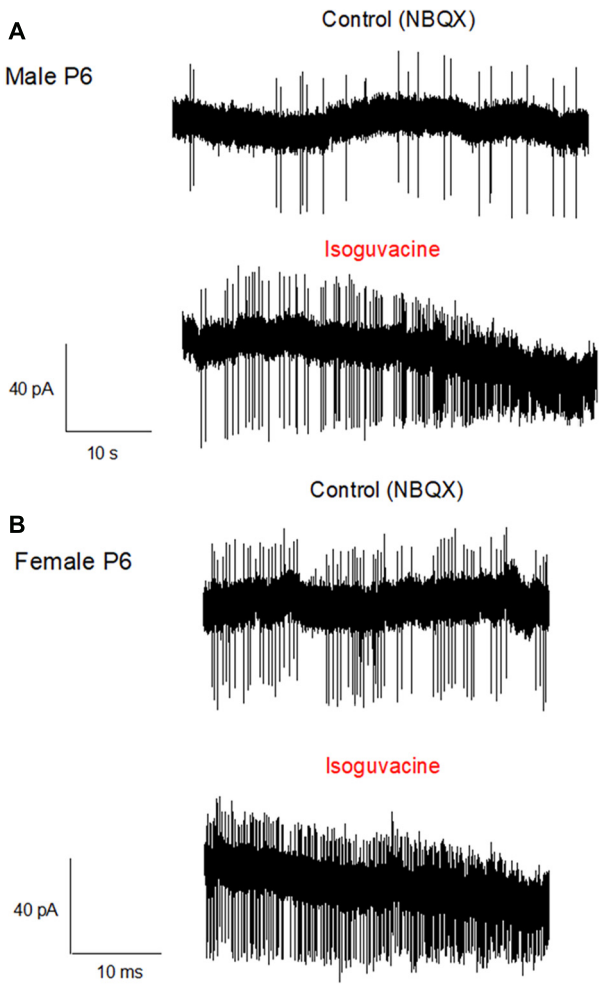


FIGURE 6 | Activation of $GABA_A$ receptors increases PC firing in P6 male and female mice. Cell-attached recordings (voltage clamp) of PC action potentials. **(A)** PC from a male at P6. The upper trace shows the control recording (in the presence of NBQX), and the lower trace shows the recording in presence of Isoguvacine (10^{-5} M). Isoguvacine application increases firing frequency and progressively reduced the spike amplitude. **(B)** PC from a female at P6. Upper trace, control conditions (in the presence of NBQX), lower trace in the presence of Isoguvacine. As in the male, isoguvacine increased firing frequency and progressively reduced spike amplitude.

to males. In both sexes, a single channel with larger slope conductance (25–27 pS, not included in the fit) was recorded in three patches and may indicate the presence of a rarely-occurring third conductance level of $GABA_A$ receptor channel, as previously described for cerebellar granule cells (Brickley et al., 1999).

In order to quantitatively analyze the conductance switch, we determined the conductance ranges of the two levels. We first constructed separate histogram distributions of conductance levels 1 and 2 channels by pooling conductance values of $GABA_A$ channels recorded in both sexes between P5–12 for conductance level 1 (**Figure 5B1**) and conductance values of $GABA_A$ channels recorded at P28–45 in males and P26–36 in females for conductance level 2 (**Figure 5B2**). The distributions are fitted with distinct Gaussian functions, giving a peak of 17.8 pS for level 1 and 10.9 pS for level 2. Next, we combined the two distributions and associated fits (**Figure 5B3**), to show that the two fits intercept at a value of 13.9 pS. From this observation, we classified channels with a slope conductance of 14–22 pS as level 1, and channels with a slope conductance <14 pS as level 2.

Then, we determined the developmental alterations of level 1 channel percentage at different post-natal ages (**Figures 5C1–C3**). In both sexes the proportion of patches displaying dominant level 1 $GABA_A$ receptor channel decreases with age; but the histograms in **Figures 5C1,C2** show that this drop in level 1 conductance (defined as presence in less than 50% of patches) occurred earlier in males (P14; **Figure 5C1**) than in females (P17; **Figure 5C2**). Therefore, during a transitional period (around P15–20), PCs in females have a higher-conductance dominant channel than male PCs.

The evolution of the proportion of level 1 $GABA_A$ channel as a function of age (**Figure 5C3**) is similar in both males and females to the evolution of the chloride reversal potential. Both curves are sigmoidal (four parameters) with similar X_0 s (14.4 days for the level 1 plot and 15.3 days for the chloride reversal potential plot in males; and 18.5 days for both the level 1 plot and the chloride reversal potential in females). Interestingly the switch of $GABA_A$ channel conductance is also altered in valproate male mice with 25% of level 1 channel dominant in young adult animals.

Sexual Dimorphism of the GABA Excitatory/Inhibitory Shift

Finally, we determined possible links between the chloride driving force and the excitatory or inhibitory actions of the $GABA_A$ agonist isoguvacine on PC firing, with or without NBQX. Similar effects of isoguvacine were observed in the presence of NBQX suggesting that glutamatergic neurotransmission was not involved (not shown; $n = 80$). When the reversal potential of the $GABA_A$ channel was positive to RP (at P6), isoguvacine increased the firing rate in males (**Figure 6A**, $n = 3$ out of 5) and in females (**Figure 6B**, $n = 3$ out of 6). This effect was accompanied by a progressive decrease in the size of the spikes due to the sodium channel inactivation produced by a strong depolarization. In the remaining recordings, PCs were silent and isoguvacine applications led to a depolarization. In older PCs, when the reversal potential of the $GABA_A$ channels is negative to RP, isoguvacine decreased spontaneous activity of PCs, without altering the spike amplitude in both males (P27; **Figure 7A**) and females (P25; **Figure 7B**).

Additional experiments confirmed the sex and age difference in the actions of isoguvacine. In males at P15, after 2 min isoguvacine application, PC firing was blocked by 75 ± 35% in all cells tested ($n = 4$; example in **Figure 8A**), and completely blocked (100%) for PCs recorded from P16 to P29 ($n = 14$; example in **Figure 7A**). However in females at P17, 2 min of isoguvacine increased PC firing frequency by 220 ± 161%, accompanied by a reduction in spike amplitude in 5 out of 13 PCs (example in **Figure 8B**), sometimes preceded by a temporary reduction in the firing frequency ($n = 2$, including the example in **Figure 8B**). Isoguvacine had no effect on firing frequency in two PCs from female mice, and inhibited firing frequency in seven of these

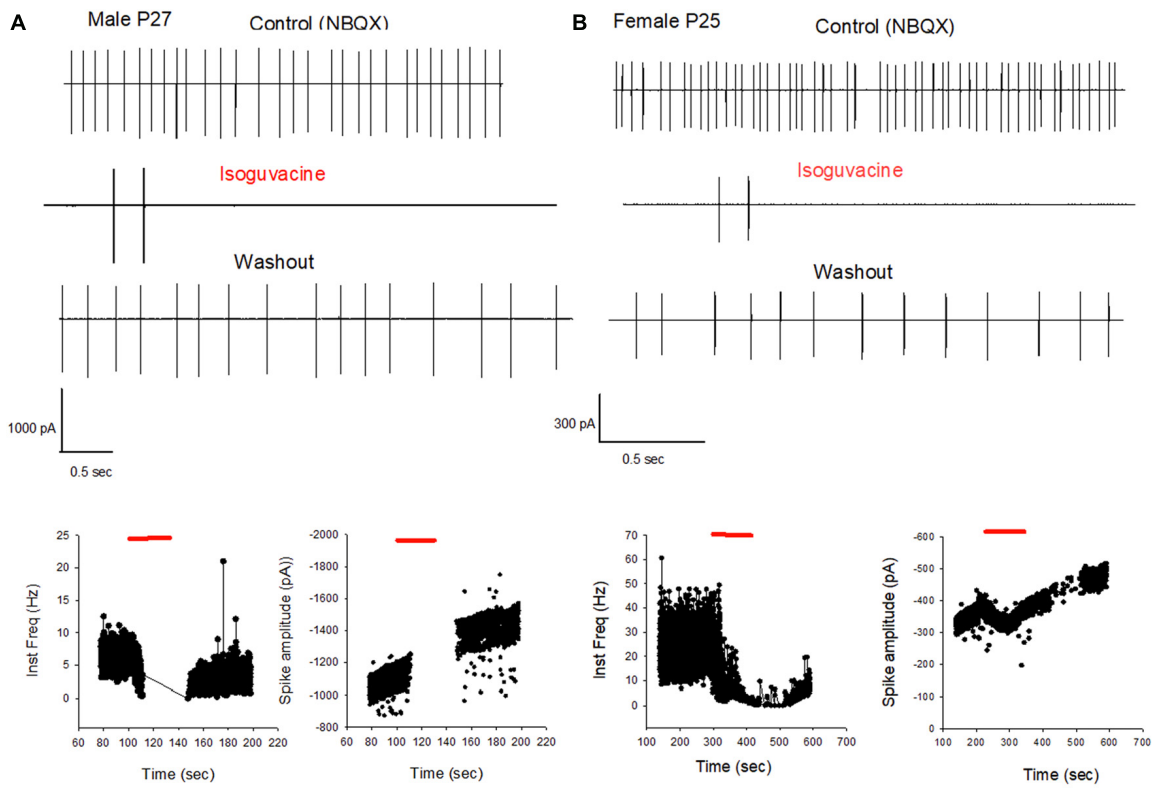


FIGURE 7 | $GABA_A$ receptor activation inhibits PC firing in young adult male and female mice. **(A)** Cell-attached recording (voltage clamp) of the spontaneous spiking activity of a PC from a male P27 mouse. Upper panel: current traces recorded in control conditions (in the presence of NBQX), in the presence of Isoguvacine, and after washout. Isoguvacine silences the cell, and activity recovers after washout. Lower panel: data from the same cell showing instantaneous action potential frequency (left) and action potential amplitude (right) over time. Isoguvacine application is indicated by the red line. The control spike frequency is about 7 Hz; isoguvacine abolishes the spiking activity of the cell; and this effect is reversible upon washout. Note that spike amplitude is not reduced before the silencing of the cell. **(B)** As in panel **(A)**, but from a female P25 mouse. Upper panel: current traces recorded in control conditions, in the presence of Isoguvacine, and following washout. Isoguvacine silences the cell, and activity recovers after washout. Lower panel: data from the same cell, showing instantaneous action potential frequency (left) and action potential amplitude (right) over time. Isoguvacine is applied as indicated by the red line. The control spike frequency is around 30 Hz. In presence of isoguvacine the spiking activity of the cell is almost abolished, but the spike amplitude is not altered.

PCs. The excitatory effect of isoguvacine continued to be seen in female PCs ($n = 2$ out 5) until P19; then at P20–25 isoguvacine had only inhibitory effects (87% ± 8% inhibition, $n = 6$).

To summarize the effects of isoguvacine on spontaneous PC, firing we assigned a value of +1 when isoguvacine produced an increased firing frequency, 0.5 when the increase was preceded by a short inhibition of firing, 0 when isoguvacine had no effect and −1 when isoguvacine inhibited firing. **Figure 9** shows the mean valence as a function of age for PCs from male and female mice, and clearly illustrates the different time course of the shift to inhibitory isoguvacine effects between male and females.

DISCUSSION

Development of $GABA_A$ Receptor Channel Subunit Composition in Cerebellar PCs

Somatic $GABA_A$ receptor channels in adult vertebrate neurons have complex gating and multiple conductance states ranging from 7 to 36 pS, with a single dominant conductance state in each cell type (Newland et al., 1991; Robello et al., 1998; Brickley et al., 1999; Mortensen and Smart, 2006). We found three main conductance levels in PC, with conductances of 7–12 pS, 15–18 pS, and occasionally 25–28 pS. Similar conductance values are observed in adult cerebellar granule cells, but with a shift of the dominant conductance from medium (15–18 pS) to small (7–12 pS) during maturation. This shift likely reflects a reorganization of $GABA_A$ channel subunit composition (Moss et al., 1990; Verdoorn et al., 1990; Mortensen and Smart, 2006). Although it is difficult to equate GABA conductance levels with specific subunits combinations (Brickley et al., 1999), it is likely that in young-adult PCs, receptors lack the γ subunit (Verdoorn et al., 1990; Fisher and Macdonald, 1997; Amato et al., 1999; Hörtnagl et al., 2013). The dominant medium conductance level (18 pS) in newborn PCs suggests the presence of an α1β1 $GABA_A$ receptor at this developmental stage (Moss et al., 1990). The very rare occurrence of the 25–28 pS conducting level is may be related to a low level of expression of the γ2 subunit (Mortensen and Smart, 2006). Our observations suggest a subunit reorganization during development (but see

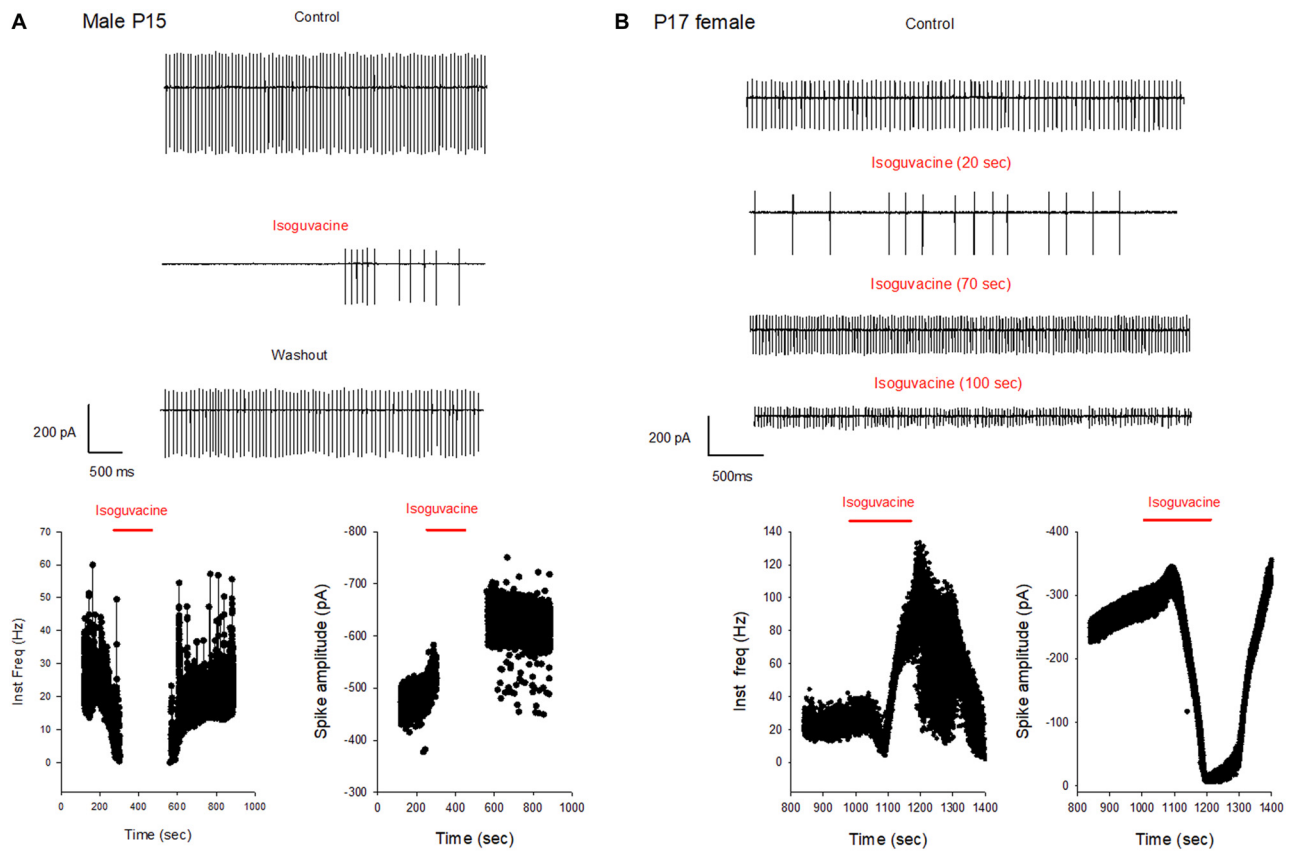


FIGURE 8 | Different effects of $GABA_A$ receptor activation in males and females at P15–P17. **(A)** Cell-attached recording (voltage-clamp) of spontaneous spiking activity of a PC from a P15 male mouse. Upper panel: current traces recorded in control conditions, with isoguvacine, and after washout. Regular action potential firing is reduced in the presence of isoguvacine and recovers after washout. Lower panel: data from the same cell showing instantaneous action potential frequency with time (left) and action potential amplitude with time (right). Isoguvacine application is indicated by the red line. Control firing frequency is about 30 Hz; isoguvacine abolishes firing, and this effect is reversible. Note that the abolition of the discharge is not linked to a decrease in spike amplitude. **(B)** As in panel **(A)**, but from a P17 female mouse. Upper part: current traces recorded in control conditions, with isoguvacine, and after washout. Regular action potential firing is reduced in the presence of isoguvacine and recovers after washout. Lower graphs, from the same cell, show instantaneous action potential frequency with time (left) and action potential amplitude with time (right) Isoguvacine application is indicated by the red line. Control firing frequency is about 30 Hz; with isoguvacine application, a brief inhibition of the firing frequency is followed by an increase, up to 100 Hz; this effect is reversible. Isoguvacine also reversibly decreased spike amplitude.

Nadler et al., 1994; Haghir et al., 2013) but further experiments are required to determine if this is associated with changes in IPSCs kinetics.

Sexual Dimorphism of GABA Driving Force in Wild Type Mice and in the Valproate Model of Autism

In a wide range of brain structures, the polarity of $GABA_A$ receptor effects is regulated by the expression and activity of two chloride membrane transporters: NKCC1 and KCC2. NKCC1 is expressed in immature neurons and actively transports chloride ions into the cell; KCC2 is expressed in mature neurons and actively transports chloride ions out of the cell. This changes in transporter expression leads to depolarizing effects of GABA in immature neurons and hyperpolarizing effects in mature neurons (Ben-Ari, 2014; Watanabe and Fukuda, 2015; Raimondo et al., 2017) with a developmental switch around birth (Tyzio et al., 2014; Watanabe and Fukuda, 2015). However, PCs do not express NKCC1 (Mikawa et al., 2002), suggesting that alternative mechanisms are required to regulate chloride homeostasis, including chloride channels (Zhang et al., 2015; Rahmati et al., 2016) and KCC2. The developmental GABA switch occurs in PCs at the end of the second post-natal week (see also Eilers et al., 2001), when profound morphological and functional alterations occur in PCs (Dusart and Flamant, 2012). The timing of the switch is strongly dependent on the specific cerebral structure; it is similar in the antero-ventral cochlear nucleus (Song et al., 2012) and substantia nigra pars reticulata (SNR; Kyrozis et al., 2006), and earlier in other brain structures (Stein et al., 2004; Tyzio et al., 2007; Allain et al., 2011; Witte et al., 2014). Our results also suggest that the regulation of chloride homeostasis is sex dependent, since it is delayed in female mice. A similar sex dependence of chloride homeostasis has been observed in the substantia nigra (Galanopoulou, 2008).

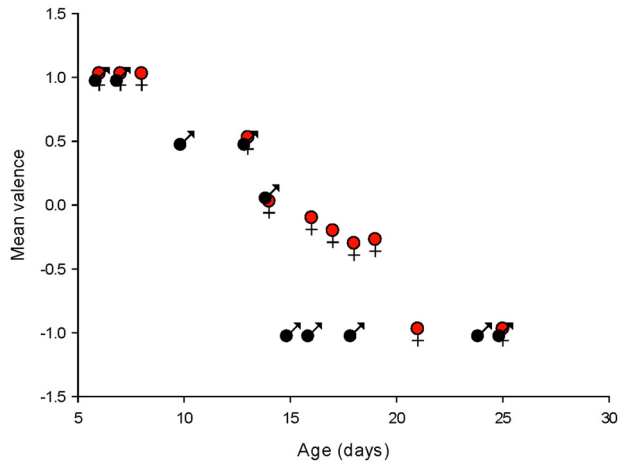


FIGURE 9 | Summary of changes in spontaneous action potential frequency following $GABA_A$ receptor activation by isoguvacine, in males and females. The mean valence of the isoguvacine effects is plotted as a function of the post-natal age in male and female mice.

The mechanisms underlying these sex differences are poorly understood. The testosterone surge in males that occurs during late gestation and shortly after birth (Dean and McCarthy, 2008) has been suggested to promote the expression and the activity of NKCC1 and to depress the synthesis and activity of KCC2 (Waddell and McCarthy, 2012), and thus make the GABA switch occurs later in males than in females. This effect has been shown in hippocampal cultures (Nuñez and McCarthy, 2007), SNR neurons in acute slices (Kyrozis et al., 2006), and embryonic hypothalamic neurons in culture (Mir et al., 2017). However, the GABA switch in PCs is delayed in females, rather than in males, despite this testosterone effect on KCC2, suggesting that alternative mechanisms must be present. PCs synthesize estradiol from cholesterol in the neonatal period and the enzymes involved in this synthesis are developmentally regulated with a different profile in males and in females (Dean and McCarthy, 2008). In PCs, estradiol promotes BDNF-mediated dendritic growth, spinogenesis and synaptogenesis during neonatal life (Tsutsui et al., 2011), and BDNF inhibits KCC2 activity (Huang et al., 2013). Furthermore, the development of the cerebellar expression of insulin receptors (IR) and insulin-like growth factor-1 receptors (IGF-1R) differs in males and females. IR and IGF-1R expression increase between P0–P7 and is down regulated at P14 in males, whereas in females IR and IGF-1R are stable between P0–P7 and up-regulated at P14 (Haghir et al., 2013). IGF-1 accelerates the developmental switch between NKCC1 and KCC2 chloride transporters in the visual cortex (Baroncelli et al., 2017). Collectively, these observations converge to suggest multiple mechanisms to explain the differences between chloride homeostasis regulation in males and females.

Using the valproate mouse model of autism, we observed that the chloride reversal potential in P5–6 valproate males is more positive than in controls (by about 10–20 mV), and that the GABA switch is delayed by 3–4 days in both males and females, extending this experimental model to the cerebellum. Increased excitatory-inhibitory ratio is suggested to underlie the pathogenesis of autism and successful clinical trials have shown that the NKCC1 antagonist bumetanide, which restores low $(Cl^-)_I$ and GABAergic inhibition, also attenuates the severity of autism (Rubenstein and Merzenich, 2003; Lemonnier and Ben-Ari, 2010; Tyzio et al., 2014; Lee et al., 2016; Uzunova et al., 2016; Lemonnier et al., 2017). It is now accepted that the cerebellum is involved in higher order functions (Schmahmann and Sherman, 1998) including perceptual processes (Baumann et al., 2015), in addition to its roles in balance, posture, and motor control. The cerebellum has been implicated in many psychiatric disorders (Phillips et al., 2015) and cerebellar abnormality is associated with ASD (Tsai et al., 2012). Several reports in individuals with autism or animal models of autism describe alterations in PC density and properties (Skefos et al., 2014; Tsai, 2016). Thus, chloride gradient modifications and alterations in the GABA switch in cerebellar PCs that we show here may be particularly relevant for further studies of autism and the role of the cerebellum.

Parallel Development of $GABA_A$ Receptor Channel Subunit Composition and Chloride Gradient

Our data show that the kinetics of the shift of the dominant conductance levels during development, from medium (15–18 pS) to small conductance (7–12 pS), are similar to the kinetics of the development of the chloride gradient. Both phenomena followed a similar sigmoidal process, are delayed in females, and are altered in valproate mice, suggesting interactions between the subunit composition of $GABA_A$ channels and intracellular chloride concentration (Succol et al., 2012).

Interestingly, in PCs, it has been suggested that an interaction between KCC2 and a specific subunit of the $GABA_A$ receptor represents a fundamental mechanism of regulation of GABAergic synapses (Huang et al., 2013). Furthermore, membrane expression of the β3 $GABA_A$ receptor subunit at different postnatal developmental stages is observed in rats exposed prenatally to valproic acid (Li et al., 2017). Finally, alterations in the efficacy of neuronal inhibition mediated by $GABA_A$ receptors containing β3 subunits have been implicated in autism (Vien et al., 2015). Collectively, these observations raise the possibility of parallel convergent developmental alterations of GABAergic signals, linking chloride gradient and subunit composition.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The conductance properties of $GABA_A$ receptors as well as the chloride equilibrium potential and the polarity of GABA effects in PCs are developmentally regulated in parallel, occurring later than in other brain structures, which is coherent with the delayed development of cerebellar PCs to the postnatal period. The switch is also delayed by 4 days in females, indicating sexual dimorphism in keeping with recently reported sex differences in synaptic excitation, inhibition and intrinsic

properties (Mercer et al., 2016). Finally, we show that the valproate model of autism produced a shift in the chloride gradient in developing PCs from males and females, providing important potential implications for the cerebellum in the pathology of autism.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SR, AL, YB-A, BP and J-LB wrote the manuscript. SR, AL and J-LB designed the research, performed the experiments and analyzed the data.

REFERENCES

Allain, A. E., Le Corronc, H., Delpy, A., Cazenave, W., Meyrand, P., Legendre, P., et al. (2011). Maturation of the GABAergic transmission in normal and pathologic motoneurons. *Neural Plast.* 2011:905624. doi: 10.1155/2011/905624

Amato, A., Connolly, C. N., Moss, S. J., and Smart, T. G. (1999). Modulation of neuronal and recombinant $GABA_A$ receptors by redox reagents. *J. Physiol.* 517, 35–50. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0035z.x

Baroncelli, L., Cenni, M. C., Melani, R., Deidda, G., Landi, S., Narducci, R., et al. (2017). Early IGF-1 primes visual cortex maturation and accelerates developmental switch between NKCC1 and KCC2 chloride transporters in enriched animals. *Neuropharmacology* 113, 167–177. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.034

Baumann, O., Borra, R. J., Bower, J. M., Cullen, K. E., Habas, C., Ivry, R. B., et al. (2015). Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum* 14, 197–220. doi: 10.1007/s12311-014-0627-7

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739. doi: 10.1038/nrn920

Ben-Ari, Y. (2014). The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience* 279, 187–219. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.001

Ben-Ari, Y. (2017). NKCC1 chloride importer antagonists attenuate many neurological and psychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 40, 536–554. doi: 10.1016/j.tins.2017.07.001

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., and Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol.* 416, 303–325. doi: 10.1113/jphysiol.1989.sp017762

Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G., and Farrant, M. (1999). Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic $GABA_A$ receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J. Neurosci.* 19, 2960–2973. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-08-02960.1999

Dean, S. L., and McCarthy, M. M. (2008). Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease. *Cerebellum* 7, 38–47. doi: 10.1007/s12311-008-0003-6

Dusart, I., and Flamant, F. (2012). Profound morphological and functional changes of rodent Purkinje cells between the first and the second postnatal weeks: a metamorphosis? *Front. Neuroanat.* 6:11. doi: 10.3389/fnana.2012.00011

Eilers, J., Plant, T. D., Marandi, N., and Konnerth, A. (2001). GABA-mediated Ca^{2+} signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones. *J. Physiol.* 536, 429–437. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0429c.xd

Fatemi, S. H., Aldinger, K. A., Ashwood, P., Bauman, M. L., Blaha, C. D., Blatt, G. J., et al. (2012). Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* 11, 777–807. doi: 10.1007/s12311-012-0355-9

Fisher, J. L., and Macdonald, R. L. (1997). Single channel properties of recombinant $GABA_A$ receptors containing γ 2 or delta subtypes expressed with α 1 and β 3 subtypes in mouse L929 cells. *J. Physiol.* 505, 283–297. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.283bb.x

Fritschy, J. M., Paysan, J., Enna, A., and Mohler, H. (1994). Switch in the expression of rat $GABA_A$-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J. Neurosci.* 14, 5302–5324. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05302.1994

Galanopoulou, A. S. (2008). Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. *Epilepsy Res.* 80, 99–113. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.04.013

Haghir, H., Rezaee, A. A., Nomani, H., Sankian, M., Kheradmand, H., and Hami, J. (2013). Sexual dimorphism in expression of insulin and insulin-like growth factor-I receptors in developing rat cerebellum. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 369–377. doi: 10.1007/s10571-012-9903-6

Hashimoto, K., and Kano, M. (2003). Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38, 785–796. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00298-8

Hörtnagl, H., Tasan, R. O., Wieselthaler, A., Kirchmair, E., Sieghart, W., and Sperk, G. (2013). Patterns of mRNA and protein expression for 12 $GABA_A$ receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* 236, 345–372. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.008

Huang, Y., Wang, J. J., and Yung, W. H. (2013). Coupling between GABA-A receptor and chloride transporter underlies ionic plasticity in cerebellar Purkinje neurons. *Cerebellum* 12, 328–330. doi: 10.1007/s12311-013-0453-3

Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., and Rodier, P. M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 319–324. doi: 10.1016/s0892-0362(99)00083-5

Kyrozis, A., Chudomel, O., Moshé, S. L., and Galanopoulou, A. S. (2006). Sex-dependent maturation of $GABA_A$ receptor-mediated synaptic events in rat substantia nigra reticulata. *Neurosci. Let.* 398, 1–5. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.018

Laurie, D. J., Wisden, W., and Seeburg, P. H. (1992). The distribution of thirteen $GABA_A$ receptor subunit mRNAs in the rat brain: III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 11, 4151–4172. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-11-04151.1992

Lee, K., Goodman, L., Fourie, C., Schenk, S., Leitch, B., and Montgomery, J. M. (2016). AMPA receptors as therapeutic targets for neurological disorders. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 103, 203–261. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.10.004

Lemonnier, E., and Ben-Ari, Y. (2010). The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects. *Acta Paediatr.* 99, 1885–1888. doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01933.x

Lemonnier, E., Villeneuve, N., Sonie, S., Serret, S., Rosier, A., Roue, M., et al. (2017). Effects of bumetanide on neurobehavioral function in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry* 7:e1124. doi: 10.1038/tp.2017.101

Li, Y., Zhou, Y., Peng, L., and Zhao, Y. (2017). Reduced protein expressions of cytomembrane $GABA_A$Rβ3 at different postnatal developmental stages of rats exposed prenatally to valproic acid. *Brain Res.* 1671, 33–42. doi: 10.1016/j.brainres.2017.06.018

Mercer, A. A., Palarz, K. J., Tabatadze, N., Woolley, C. S., and Raman, I. M. (2016). Sex differences in cerebellar synaptic transmission and sex-specific responses to autism-linked Gabrb3 mutations in mice. *Elife* 5:e07596. doi: 10.7554/eLife.07596

Mikawa, S., Wang, C., Shu, F., Wang, T., Fukuda, A., and Sato, K. (2002). Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. *Dev. Brain Res.* 136, 93–100. doi: 10.1016/s0165-3806(02)00345-0

Mir, F. R., Carrer, H. F., and Cambiasso, M. J. (2017). Sex differences in depolarizing actions of $GABA_A$ receptor activation in rat embryonic hypothalamic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 45, 521–527. doi: 10.1111/ejn.13467

Mortensen, M., and Smart, T. G. (2006). Extrasynaptic αβ subunit $GABA_A$ receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J. Physiol.* 577, 841–856. doi: 10.1113/jphysiol.2006.117952

Moss, S. J., Smart, T. G., Porter, N. M., Nayeem, N., Devine, J., Stephenson, F. A., et al. (1990). Cloned GABA receptors are maintained in a stable cell line: allosteric and channel properties. *Eur. J. Pharmacol.* 189, 77–88. doi: 10.1016/0922-4106(90)90232-m

Nadler, L. S., Guirguis, E. R., and Siegel, R. E. (1994). $GABA_A$ receptor subunit polypeptides increase in parallel but exhibit distinct distributions in the developing rat cerebellum. *J. Neurobiol.* 25, 1533–1544. doi: 10.1002/neu.480251206

Newland, C. F., Colquhoun, D., and Cull-Candy, S. G. (1991). Single channels activated by high concentrations of GABA in superior cervical ganglion

neurones of the rat. *J. Physiol.* 432, 203–233. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018382

Nuñez, J. L., and McCarthy, M. M. (2007). Evidence for an extended duration of GABA-mediated excitation in the developing male versus female hippocampus. *Dev. Neurobiol.* 67, 1879–1890. doi: 10.1002/dneu.20567

Pangratz-Fuehrer, S., Sieghart, W., Rudolph, U., Parada, I., and Huguenard, J. R. (2016). Early postnatal switch in $GABA_A$ receptor α-subunits in the reticular thalamic nucleus. *J. Neurophysiol.* 115, 1183–1195. doi: 10.1152/jn.00905.2015

Phillips, J. R., Hewedi, D. H., Eissa, A. M., and Moustafa, A. A. (2015). The cerebellum and psychiatric disorders. *Front. Public Health* 3:66. doi: 10.3389/fpubh.2015.00066

Rahmati, N., Vinueza Veloz, M. F., Xu, J., Barone, S., Rodolfo Ben Hamida, N., Schonewille, M., et al. (2016). SLC26A11 (KBAT) in purkinje cells is critical for inhibitory transmission and contributes to locomotor coordination. *eNeuro* 3:ENEURO.0028–16. doi: 10.1523/ENEURO.0028-16.2016

Raimondo, J. V., Richards, B. A., and Woodin, M. A. (2017). Neuronal chloride and excitability—the big impact of small changes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 43, 35–42. doi: 10.1016/j.conb.2016.11.012

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., et al. (1999). The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255. doi: 10.1038/16697

Robello, M., Amico, C., and Cupello, A. (1998). Cerebellar granule cell $GABA_A$ receptors studied at the single-channel level: modulation by protein kinase G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 768–773. doi: 10.1006/bbrc.1998.9830

Roullet, F. I., Lai, J. K. Y., and Foster, J. (2013). *In utero* exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 36, 47–56. doi: 10.1016/j.ntt.2013.01.004

Rubenstein, J. L. R., and Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2, 255–267. doi: 10.1034/j.1601-183x.2003.00037.x

Schmahmann, J. D., and Sherman, J. C. (1998). The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121, 561–579. doi: 10.1093/brain/121.4.561

Sigel, E., and Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of $GABA_A$ receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40224–40231. doi: 10.1074/jbc.R112.386664

Skefos, J., Cummings, C., Enzer, K., Holiday, J., Weed, K., Levy, E., et al. (2014). Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PLoS One* 9:e81255. doi: 10.1371/journal.pone.0081255

Song, N. Y., Shi, H. B., Li, C. Y., and Yin, S. K. (2012). Interaction between taurine and $GABA_A$/glycine receptors in neurons of the rat anteroventral cochlear nucleus. *Brain Res.* 1472, 1–10. doi: 10.1016/j.brainres.2012.07.001

Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J., and Hübner, C. A. (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J. Comp. Neurol.* 468, 57–64. doi: 10.1002/cne.10983

Succol, F., Fiumelli, H., Benfenati, F., Cancedda, L., and Barberis, A. (2012). Intracellular chloride concentration influences the $GABA_A$ receptor subunit composition. *Nat. Commun.* 3:738. doi: 10.1038/ncomms1744

Tsai, P. T. (2016). Autism and cerebellar dysfunction: evidence from animal models. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 21, 349–355. doi: 10.1016/j.siny.2016.04.009

Tsai, P. T., Hull, C., Chu, Y., Greene-Colozzi, E., Sadowski, A. R., Leech, J. M., et al. (2012). Autistic-like behavior and cerebellar dysfonction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 488, 647–651. doi: 10.1038/nature11310

Tsutsui, K., Ukena, K., Sakamoto, H., Okuyama, S., and Haraguchi, S. (2011). Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the purkinje cell. *Front. Endocrinol.* 2:61. doi: 10.3389/fendo.2011.00061

Tyzio, R., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., and Khazipov, R. (2007). Timing of the developmental switch in $GABA_A$ mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* 48, 96–105. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01295.x

Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D. C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., et al. (2014). Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* 343, 675–679. doi: 10.1126/science.1247190

Uzunova, G., Pallanti, S., and Hollander, E. (2016). Excitatory/inhibitory imbalance in autism spectrum disorders: implications for interventions and therapeutics. *World J. Biol. Psychiatry* 17, 174–186. doi: 10.3109/15622975.2015.1085597

Verdoorn, T. A., Draguhn, A., Ymer, S., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1990). Functional properties of recombinant rat $GABA_A$ receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 4, 919–928. doi: 10.1016/0896-6273(90)90145-6

Vien, T. N., Modgil, A., Abramian, A. M., Jurd, R., Walker, J., Brandon, N. J., et al. (2015). Compromising the phosphodependent regulation of the $GABA_AR$ β3 subunit reproduces the core phenotypes of autism spectrum disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, 14805–14810. doi: 10.1073/pnas.1514657112

Waddell, J., and McCarthy, M. M. (2012). Sexual differentiation of the brain and ADHD: what is a sex difference in prevalence telling us? *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 9, 341–360. doi: 10.1007/7854_2010_114

Watanabe, M., and Fukuda, A. (2015). Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9:371. doi: 10.3389/fncel.2015.00371

Witte, M., Reinert, T., Dietz, B., Nerlich, J., Rübsamen, R., and Milenkovic, I. (2014). Depolarizing chloride gradient in developing cochlear nucleus neurons: underlying mechanism and implication for calcium signaling. *Neuroscience* 261, 207–222. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.050

Zhang, L., Pathak, H. R., Coulter, D. A., Freed, M. A., and Vardi, N. (2006). Shift of intracellular chloride concentration in ganglion and amacrine cells of developing mouse retina. *J. Neurophysiol.* 95, 2404–2416. doi: 10.1152/jn.00578.2005

Zhang, W., Schmelzeisen, S., Parthier, D., Fring, S., and Möhrlen, F. (2015). Anoctamin calcium-activated chloride channels may modulate inhibitory transmission in the cerebellar cortex. *PLoS One* 10:e0142160. doi: 10.1371/journal.pone.0142160

Conflict of Interest Statement: YB-A is CEO of Neurochlore, a biotech company devoted to treat autism.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Roux, Lohof, Ben-Ari, Poulain and Bossu. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 2 : Regional and sex dependent alterations in Purkinje cell density in the valproate mouse model of autism

Sebastien Roux[1], Yannick Bailly[2], Jean Louis Bossu[1]

Soumis à Neuroreport

Physiologie des réseaux neuronaux [1], Trafic membranaire intracellulaire dans les systèmes nerveux & neuroendocrine [2], INCI – CNRS UPR 3212, ULP, 5 rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg – France

Correspondence: jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr

Regional and sex-dependent alterations in Purkinje cell density in the valproate mouse model of autism

Sébastien Roux[1], Yannick Bailly[2], Jean Louis Bossu[1]

Physiologie des réseaux neuronaux [1], Trafic membranaire intracellulaire dans les systèmes nerveux & neuroendocrine [2], INCI – CNRS UPR 3212, ULP, 5 rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg – France

Correspondence: jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr

Abstract (165 words)

Neuropathological and neuroimaging studies indicate a decrease in Purkinje cell (PC) density in the cerebellum of autistic patients and rodent models of autism. Autism is far more prevalent in males than females and sex-specific properties of PCs have been recently reported. We investigated the differential sensitivity of PCs in the valproate (VPA) mouse model of autism by estimating the linear density of PCs immununolabelled with calbindin in the cerebellum of males and females. Whereas prenatal VPA treatment surprisingly increased PC linear density in both genders 13 days after birth (P13), it significantly reduced the linear density of PCs in the cerebellum of 40-day old (P40) males, but not females. In males, PC loss was more pronounced in the posterior part of the cerebellum and was significant in the VIth, VIIth, IXth and paramedian lobules. In females, PC loss was restricted to the VIth and paramedian lobules. These results suggest that this sex-specific sensitivity of PCs to VPA may contribute to the motor disturbances and behavioural abnormalities observed in autism.

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) covers a range of neurodevelopmental disorders characterized by impaired social interactions, restrictive interests and repetitive behaviours. ASD is associated with other mental and physical disabilities, such as attention-deficit/hyperactivity, anxiety, intellectual disability, epilepsy and impairments in motor coordination. ASD is diagnosed in 1 out of 88 children and is four times more frequent in males than in females [1]. Studies of ASD patients and animal

models of autism reveal that many brain regions are affected, including neocortical structures, the limbic system, the nucleus accumbens and the cerebellum [2]. The cerebellum controls movement and cognition [3], and cerebellar abnormalities are amongst the most consistent findings in individuals with ASD [4] and rodents models of ASD [5, 6]. Neuropathological studies of autism [4] have reported a decrease in the density of cerebellar PCs, the key neuron of the cerebellar circuit and the unique output of the cerebellar cortex receiving all synaptic information from outside the cerebellum. Furthermore, diffusion MRI tractography in children with ASD reveals a reduction of PC axons [7]. PC size was also altered in patients with autism [8]. A reduction in PC number has been reported in the cerebellum of rats with autistic-like behaviour after prenatal exposure to valproic acid [9]. It has been proposed that a selective vulnerability of PCs may play a role in the aetiology of autism [10]. Indeed, core symptoms of autism are observed after a selective PC loss in mice or even when excitability of PCs is impaired [6,11]. To investigate sexual dimorphism in autistic-like pathology, we compared the effects of prenatal valproate exposure on PC survival in male and female mice. Male mice prenatally treated with valproate were found to present a more pronounced regional loss of PCs.

Material and methods

Animals

All mice were group-housed at the Chronobiotron (UMS3415 CNRS & Uds, Strasbourg) in a temperature-controlled animal facility (24 °C, 12:12 h light/dark cycle) and fed *ad libitum* with free access to water. C57Bl/6J mice were mated overnight and surveyed until a vaginal plug was detected at gestational day 0 (GD0).

At GD12, 600 mg/kg valproic acid sodium salt (VPA; Sigma–Aldrich) in 0.9% NaCl was administered i.p. Control animals received 0.9%NaCl. All procedures followed the guidelines of the Comité National d'Ethique pour les Sciences de la Vie et de la Santé (EU Council Directive 2010/63/EU) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS, Comité Régional d'Ethique en Experimentation Animale de Strasbourg).

Histology

Animals:

Experiments were performed on P13 mice (n=8: 4 control mice (2 females and 2 males) and 4 VPA mice (2 females and 2 males) and on P40 mice (n=24: 12 control mice (8 females and 4 males) and 12 VPA mice (8 females and 4 males).

Tissue preparation:

Mice were anesthetized with 75% ketamine (Ketamine 1000, Vibrac, France), 25% xylazine (Rompur, Bayer Health care, KVP Kiel Germany) and intracardiacally perfused with a 4% paraformaldehyde in a phosphate buffer saline (pH 7.4). The cerebella were dissected and post-fixed overnight in the same fixative before cryoprotection in sucrose 30% for 48h and then freezing at -80°C in isopentane. Coronal frozen sections (14 µm-thick) were cut in the anterior, median and posterior cerebellum with a cryostat (Leica CM3050 S) and processed floating for Calcium binding protein (CaBP) immunohistochemistry (Fig. 1).

CaBP Immunohistochemistry

The sections were incubated in blocking solution (containing 5% goat serum and 0.3% Triton in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) for 1h at room temperature and then incubated overnight with mice@calbindin D-28K monoclonal (clone CB8955) antibody Catalogue number 9848, 031M4859; 1/150 Sigma,) at 4°C. The sections were washed in PBS 0.1M and incubated 1h at room temperature with a goat@mice antibody (1/500 Sigma) coupled with Alexa 555. After washing in PBS 0.1M, the sections were mounted on slides in Mowiol.

Linear density of Purkinje cells.

Images of immunostained sections were made with a fluorescence microscope (Axio Imager. M2, Zeiss) camera, monitored by the Morphostrider software. Three coronal slices from each cerebellum were analyzed (Fig. 1A). The linear density of CaBP immunolabeled PCs (Fig. 1B) was determined as the number of PCs counted along the PC monolayer using ImageJ. PCs were counted in sections from control animals (Fig. 1C) and from VPA-treated animals (Fig. 1D). PC density is given in number of PCs /mm.

Graphs and statistics.

Statistical analysis was performed with Sigma plot (version 12.5). Mean PC linear densities were compared between the different regions of the cerebellum (posterior vs anterior vs median cerebellum and lobules) using one-way ANOVA (when the distribution was normal) or one-way ANOVA on ranks (when the distribution was not normal). This revealed important variations of PC linear density among the cerebellar regions which could be related to the distinct roles of those cerebellar regions in the sensory-motor integration. Thus the above mentioned cerebellar territories were considered as distinct entities and a paired t-test (when the distribution was normal)

or a Mann-Whitney rank sum test (if the distribution was not normal) was used to analyze VPA effects on those regions. The significance threshold was set at $P < 0.05$. * $0.05 < P < 0.01$; ** $0.01 < P < 0.001$ and *** $P < 0.001$.

Results

Valproate induced regional PC loss in the cerebellar cortex of early adult (P40) male mice.

In male mice, VPA prenatal exposition significantly reduced PC linear density in the whole cerebellum from 34.9 ± 0.4 PCs/mm (n =18) for a mean length of 37.7 ± 0.7 mm to 31.0 ± 0.6 PCs/mm (n=18, $p < 0.001$) for a mean length of 37.6 ± 0.7 mm (ns compared to untreated controls) that corresponds to about a 10 % loss (Fig. 2A).

In control conditions, the PC linear density varied significantly following the cerebellar regions. The PCs linear density is significantly ($p < 0.001$) higher in the vermis (37.5 ± 0.9 PCs/mm, n = 18) compared to the hemispheres (32.9 ± 0.9 PCs/mm, n = 18, Fig 2B) and displayed a postero anterior gradient (from 33.5 ± 0.4 to 36.2 ± 0.6 PCs/mm, n = 6, p = 0.03, Fig. 2C). Similarly, between lobules the PC linear density varied with a minimum value of 27.4 ± 1.5 (n = 6) in the lobule VII and a maximum value of 44.1 ± 1.7 PCs/mm (n = 11) in the lobule VI (Fig. 2D).

The VPA-induced reduction of PC linear density was more pronounced in the vermis than in the hemispheres (Fig. 2B). In the vermis, VPA reduced PC linear density from 37.5 ± 0.9 (n = 18, for a mean length of 14.8 ± 0.7 mm) to 33.0 ± 0.9 PCs/mm (p = 0.0014, n = 18, for a mean length of 13.1 mm, ns compared to controls). In the hemispheres VPA reduced PC linear density from 32.9 ± 0.9 (n = 18, for a mean length of 22.4 ± 0.4 mm) to 30.5 ± 0.8 PCs/mm (p = 0.01, n = 18, for a mean length of 23.3 ± 0.7 mm, ns compared to controls). The VPA-induced reduction of PC linear

density was more pronounced in the posterior cerebellum than in the median and anterior parts of the cerebellum (Fig. 2C). In the posterior cerebellum VPA reduced PC linear density from 33.5 ± 0.4 (n = 6, for a mean length of 39.1 ± 1.1 mm) to 29.1 ± 0.9 PCs/mm ($p < 0.001$, n = 6, for a mean length of 38.7 ± 1.4 mm, ns compared to controls). In the median cerebellum, VPA reduced PC linear density from 34.9 ± 0.6 (n = 6, for a mean length of 36.0 ± 1.4 mm) to 31.4 ± 0.6 PCs/mm ($p = 0.002$, n = 6, for a mean length of 36.2± 0.7 mm, ns compared to controls). In the anterior cerebellum, VPA reduced the PC linear density from 36.2 ± 0.6 (n = 6, for a mean length of 38.1 ± 1.0 mm) to 32.6 ± 0.6 PCs/mm ($p = 0.032$, n = 6, for a mean length of 37.9 ± 1.4 mm, ns compared to controls).

Although PC linear density was reduced in most cerebellar lobules of VPA-treated animals (Fig. 2D), significant loss only occurred in the VIth, VIIIth, IXth and paramedian (PM) lobules. In the lobule VI, VPA reduced the PC linear density from 44.1 ± 1.7 (n = 11, for a mean length of 3.99 ± 0.24 mm) to 36.6 ± 1.4 PCs/mm ($p = 0.002$, n = 10, for a mean length of 3.88 ± 0.25 mm, ns compared to control). In the lobule VIII, VPA reduced the PC linear density from 30.0 ± 1.1 (n = 6, for a mean length of 4.85 ± 0.30 mm) to 25.0 ± 1.6 PCs/mm ($p = 0.035$, n = 6, for a mean length of 5.05 ± 0.28 mm, ns compared to controls). In the lobule IX, VPA reduced the PC linear density from 35.4 ± 1.4 (n = 12, for a mean length of 4.08 ± 0.65 mm) to 30.7 ± 1.1 PCs/mm ($p < 0.019$, n = 12, for a mean length of 3.56 ± 0.5 mm, ns compared to controls). Finally, in the PM VPA reduced the PCs linear density from 31.1 ± 0.5 (n = 12, for a mean length of 3.90 ± 0.24 mm) to 27.4 ± 1.1 PCs/mm ($p = 0.005$, n = 10, for a mean length of 3.88 ± 0.26 mm, ns compared to controls).

VPA had marginal effects on PC density in early adult (P40) female mice.

As in males, the PC linear density varied significantly between the cerebellar regions in control conditions untreated controls. The PC linear density was significantly ($p < 0.015$) higher in the vermis (35.9 ± 0.9 PCs/mm, n = 28) than in the hemispheres (34.2 ± 0.5 PCs/mm, n = 28, Fig 3B) and also displayed a postero anterior gradient (from 33.0 ± 0.9, n = 10 to 36.0 ± 0.7 PCs/mm, n = 8, p = 0.021). Similarly, between the lobules the PC linear density varied with a minimum value of 25.2 ± 1.3 (n = 6) in the lobule VII and a maximum value of 40.8 ± 1.9 PCs/mm (n = 11) in the lobule VI (Fig. 3D).

However, in female mice, VPA prenatal exposition did not significantly reduce PC linear density in the whole cerebellum (34.8 ± 0.5, n = 28 in untreated control females and 33.5 ± 0.5 PCs/mm, n = 24 in treated females, Fig. 3A) in the vermis (35.9 ± 0.9, n = 28 in controls and 34.3 ± 0.8 PCs/mm, n = 24 in treated females), in the hemispheres (34.1 ± 0.5, n = 28 in controls and 33.1 ± 0.5 PCs/mm, n = 24 in treated females, Fig 3B), in the anterior cerebellum (36.0 ± 0.7, n = 8 in controls and 34.5 ± 0.7 PCs/mm, n = 6 in treated females), in the median cerebellum (35.6 ± 0.6, n = 10 in controls and 34.6 ± 0.6 PCs/mm, n = 9 in treated females) and in the posterior cerebellum (33.0 ± 0.9, n = 10 in controls and 31.8 ± 0.6 PCs/mm, n = 9 in treated females, Fig. 3C). However, VPA-treated females exhibited a significant reduction of PC linear density in the VIth and PM lobules, but not in the remainder of their cerebella (Fig. 3D). Indeed, in the VIth lobule VPA reduced PC linear density from 41.0 ± 0.8 (n = 15, for a mean length of 5.41 ± 0.79 mm) to 36.9 ± 1.5 PCs/mm (p = 0.0165, n = 12, for a mean length of 6.48 ± 1.06 mm, ns compared to controls). In the PM, VPA reduced PC linear density from 32.6 ± 0.7 (n = 32, for a mean length of 4.22 ± 0.15 mm) to 29.4 ± 0.8 PCs/mm (p = 0.006, n = 24, for a mean length of 4.27 ± 0.24 mm, ns compared to controls).

VPA-induced PC loss occurred after P13.

The cerebellum displays major developmental alterations after P13 including the regression of the multiple climbing fibre innervation of PCs [12]. In order to determine if VPA-induced PC loss occurs before or after P13, PC linear density in the whole cerebellum of 13 day-old and 40 day-old untreated control and VPA-treated males and female mice were compared (Fig. 4). Surprisingly, VPA treatment significantly increased ($p < 0.001$) PC linear density from 42.0 ± 0.74 (n =12) to 46.2 ± 1.1 (n = 9) PCs/mmin both males and females (pooled data from males and females because no significant difference was found between genders), but this increase of PC linear density was associated with a decrease in the mean PC layer length (from 34. 4 ± 1.1 to 30.9 ± 1.7, $p = 0.031$). As described above, at P40 even when data from males and females are pooled (for establishing the comparison with P13 mice), VPA significantly decreased PC linear density from 34.5 ± 0.3 (n = 46) to 32.2 ± 0.4 PCs/mm (n= 42, $p< 0.001$). Furthermore, in untreated control mice, the PC linear density decreased from 42.0 to 34.5 PCs/mm during the P13-P40 period and was associated with a significant ($p = 0.004$) increase in the mean PC layer length from 34.4 ± 1.1 to 38.2 ± 0.6 mm. This reduction of PC density may partly be explained by the fact that numerous PCs are normally lost during postnatal development of cerebellum [13].

Discussion.

Sexual dimorphism of VPA toxicity on PCs in mice

ASD has been reported to be more prevalent in males than females with a ratio of about 4/1. However, an increasing number of studies underscore the link between sex/gender differences and autism. Several hypothesis implicating sex chromosomal

genes, as well as the prenatal hormonal environment has been proposed as protective and risk parameters of sexual dimorphism in ASD [14]. Sex steroid hormones orchestrate the sexual differentiation of the brain during perinatal development and adulthood [15] and their effects on several brain regions may impact the development of ASD. Consequently, it is important to compare the ASD-induced alterations of major brain structures in males and females [2]. The cerebellar PCs are impacted in autistic patients [4] and animal models of autism [16]. Interestingly in male and female mice, PCs display distinct electrophysiological properties [17]. Our data demonstrate that this sexual dimorphism of PC functions concerns also the PC sensitivity to prenatal exposure to VPA, indeed PCs seem less vulnerable to toxic effects of VPA in females as recently shown, but this study was confined to one part of the cerebellum [18]. 17β-estradiol (E2) is potently neuroprotective from cell stressors (CoCl2, glutamate) for female but not male neurons [14] and promotes PC dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis during neonatal life by inducing BDNF expression [19]. This mechanism may also protect female PCs against VPA neurotoxicity. For example, a critical period for PC development is mediated by local estradiol synthesis and this can be disrupted by inflammation, however long lasting consequences are only observed in males [20].

Regionalized VPA-induced PCs loss in adult P40 males

The present study showed an increased sensitivity of PCs to prenatal VPA in the posterior part of the cerebellum. Interestingly, functional neuroimaging in humans revealed that the posterior and inferior parts of the cerebellum are reliably engaged in dynamic perceptual and affective processes with no explicit motor component [21]. We additionally showed that the extent of PCs loss varied across the cerebellar lobules peaking in lobules VI, VIII XI and paramedian (PM). Along this line, a

topographic organization of motor control versus cognitive and affective processing has been observed in human cerebellum [22]. Indeed, the cerebellar motor syndrome results from lesions involving the anterior lobe and parts of lobule VI of the cerebellum whereas cognitive impairments occur when lesions of the posterior lobe affect the lobules VI and VII including the Crus I, Crus II, and lobule VIIB [22]. Furthermore, a regional alteration in PC density has been reported in autists [4]. In this study, the PCs density was decreased in lobules IV-VI, Crus I & II of the posterior lobe, and lobule X of the flocculonodular lobe of autistic patients. Nevertheless, no functional correlation between the cerebellar lobules of humans and mice has yet been established. Nevertheless, both motor and social deficits has been recently correlated with a loss of PCs in the Crus I of VPA male mice [18].

Effects of VPA on PC linear density in young mice

Whereas PC loss occurred in P40 male mice prenatally treated with VPA, increased PC linear density was shown in young (P13) male and female VPA-treated mice. Interestingly, MRI studies have shown an increase in brain size early during development of autistic children. A possible cellular mechanism could involve the presence of supernumerary neurons [23]. The increased number of PCs in young VPA mice indicates that the teratogen effect of VPA did not reduce the number of PC progenitors and that PCs loss is a late developmental process. This opens a time frame for an eventual treatment designed to impair PC loss. For example, treadmill exercise was shown to improve motor dysfunctions and inhibit PC loss in the cerebellum of VPA rats with autistic-like syndrome [24].

Conclusions and perspectives.

In conclusion, that prenatal exposition to VPA was found to affect PCs in a gender-specific way by predominantly deleting them in males. This diminution of PC linear density was significant in the posterior lobules VI, VIII, IX and PM of the cerebellum, thereby raising the question of the relevance of these particular lobules to "autistic-like" behaviours in VPA mice. We also show that the VPA-induced diminution of PC linear density occurred after P13 delineating a possible time frame for adopting a pharmacological treatment to preserve the cerebellum and improve behavioural autistic dysfunctions.

Acknowledgements : Authors acknowledge Nancy Grant for reading and the correcting the manuscript

References

1 Sharma SR, Gonda X, Tarazi FI. Autism Spectrum Disorder classification, diagnosis and therapy. Pharmacol Ther. 2018 May 12. pii: S0163-7258(18)30087-1. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.007

2 Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. Acta Neuropathol. 2017;134:537–566.

3 Koziol LF, Budding D, Andreasen N, D'Arrigo S, Bulgheroni S, Imamizu H, et al. Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition. Cerebellum 2014;13:151–177.

4 Skefos J, Cummings C, Enzer K, Holiday J, Weed K, Levy E, et al. Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. PLoS One 2014; 9:e81255.

5 Shevelkin AV., Ihenatu C, Pletnikov MV. Pre-clinical models of neurodevelopmental disorders: Focus on the cerebellum. Rev Neurosci. 2014; 25:177–194.

6 Tsai PT. Autism and cerebellar dysfunction: Evidence from animal models. Semin Fetal Neonatal Med. 2016; 21:349–355.

7 Jeong JW, Tiwari VN, Behen ME, Chugani HT, Chugani DC. In vivo detection of reduced Purkinje cell fibers with diffusion MRI tractography in children with autistic spectrum disorders. Front Hum Neurosci. 2014; 8:110.

8 Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, Thuras P, et al. Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. Cell Mol Neurobiol. 2002; 22:171–175.

9 Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. Neurotoxicol Teratol. 2000; 22:319–324.

10 Kern JK Purkinje cell vulnerability and autism: A possible etiological connection. Brain Dev. 2003; 25:377–382.

11 Stoodley CJ, D'Mello AM, Ellegood J, Jakkamsetti V, Liu P, Nebel MB, et al Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. Nat Neurosci. 2017; 20:1744–1751.

12 Dusart I., Flamant F. Profound morphological and functional changes of rodent Purkinje cells between the first and the second postnatal weeks: a metamorphosis? Frontiers in Neuroanatomy 2012;11, 6-11. doi: 10.3389/fnana.2012.00011.

13 Cragg B, Phillips S. Natural loss of Purkinje cells during development and increased loss with alcohol. Brain Res. 1985; 325 (1-2):151-60.21.

14 Cheng HY, Hung SH, Chu PJ. Rescue from Sexually Dimorphic Neuronal Cell Death by Estradiol and PI3 Kinase Activity. Cell Mol Neurobiol. 2016; 36:767–775.

15 Rosenfeld CS. Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not? Front Neurosci. 2017;11:632.

16 Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. New roles for the cerebellum in health and disease. Front Syst Neurosci. 2013 7:83. doi: 10.3389/fnsys.2013.00083.

17 Mercer AA., Palarz K.J., Tabatadze N., Woolley CS, Raman IM. Sex differences in cerebellar synaptic transmission and sex-specific responses to autism-linked Gabrb3 mutations in mice. 2016; 5:e07596.

18 Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Fernagut PO, et al. Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. Int J Neuropsychopharmacol. 2018. doi: 10.1093/ijnp/pyy043.

19 Haraguchi S, Sasahara K, Shikimi H, Honda S, Harada N, Tsutsui K. Estradiol promotes purkinje dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis during neonatal life by inducing the expression of BDNF. Cerebellum 2012; 11:416–417.

20 Hoffman JF, Wright CL, McCarthy MM. A Critical Period in Purkinje Cell Development Is Mediated by Local Estradiol Synthesis, Disrupted by Inflammation, and Has Enduring Consequences Only for Males. J Neurosci. 2016 ; 36(39):10039-10049. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1262-16.2016.

21 Nguyen VT, Sonkusare S, Stadler J, Hu X, Breakspear M, Guo CC. Distinct Cerebellar Contributions to Cognitive-Perceptual Dynamics During Natural Viewing. Cereb Cortex 2017; 27:5652–5662.

22 Stoodley CJ, Schmahmann JD. Evidence for topographic organisation in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. Cortex 2010; 46:831–844.

23 Bauman M, Schumann C. Is “bench-to-bedside”realistic for autism? An integrative neuroscience approach. Neuropsychiatry (London) 2013; 3:159–168.

24 Cho HS, Kim TW, Ji ES, Park HS, Shin MS, Baek SS. Treadmill exercise ameliorates motor dysfunction through inhibition of Purkinje cell loss in cerebellum of valproic acid-induced autistic rats. J Exerc Rehabil. 2016;12(4):293-8. doi: 10.12965/jer.

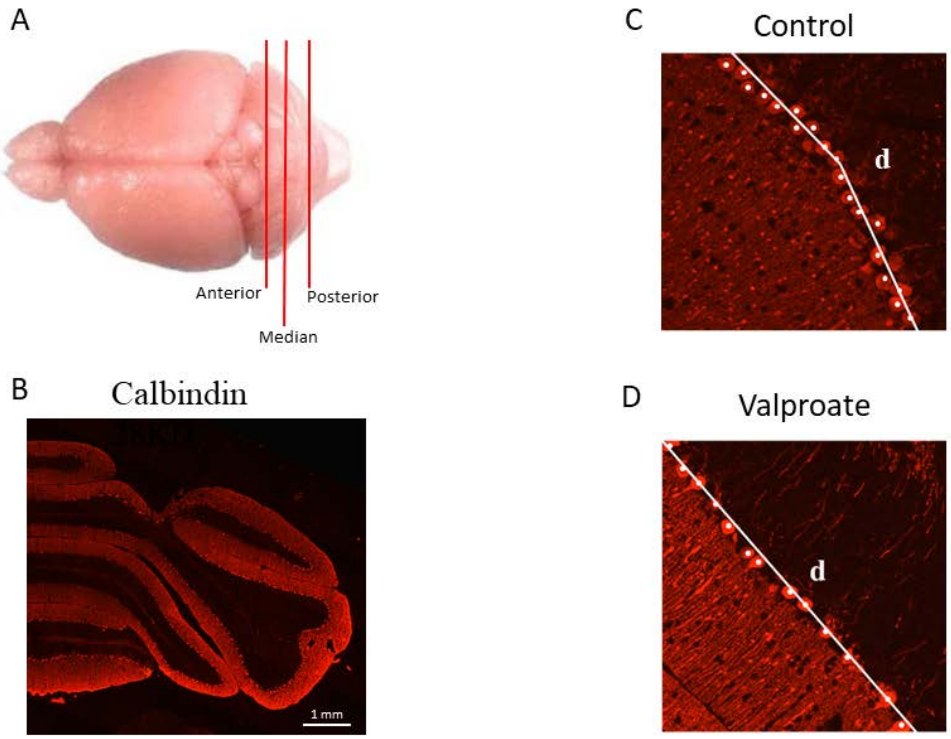


Figure 1. Measurement of PCs linear density in the mouse cerebellum.

A. Sections were cut in the anterior, median and posterior parts of the cerebellum B. PCs were visualized (in red) by immunofluorescence using an antibody against the specific PC marker calbidin (CaBP 28 KD) . PCs were count (white dots) in the PC monolayer of control (C) and VPA (D) cerebellar sections for a given distance (d). The linear density of PC is expressed as the number of PCs for 1 mm.

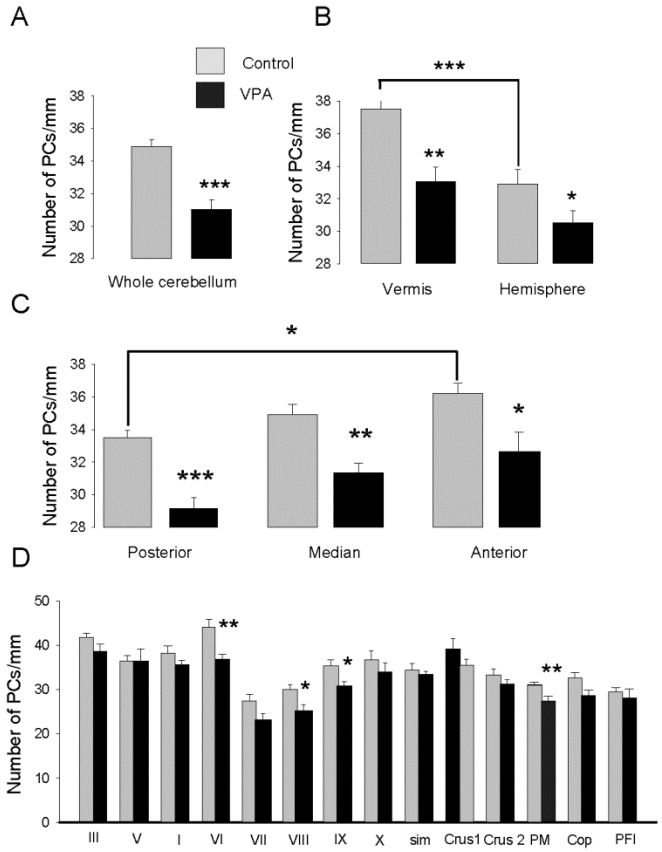
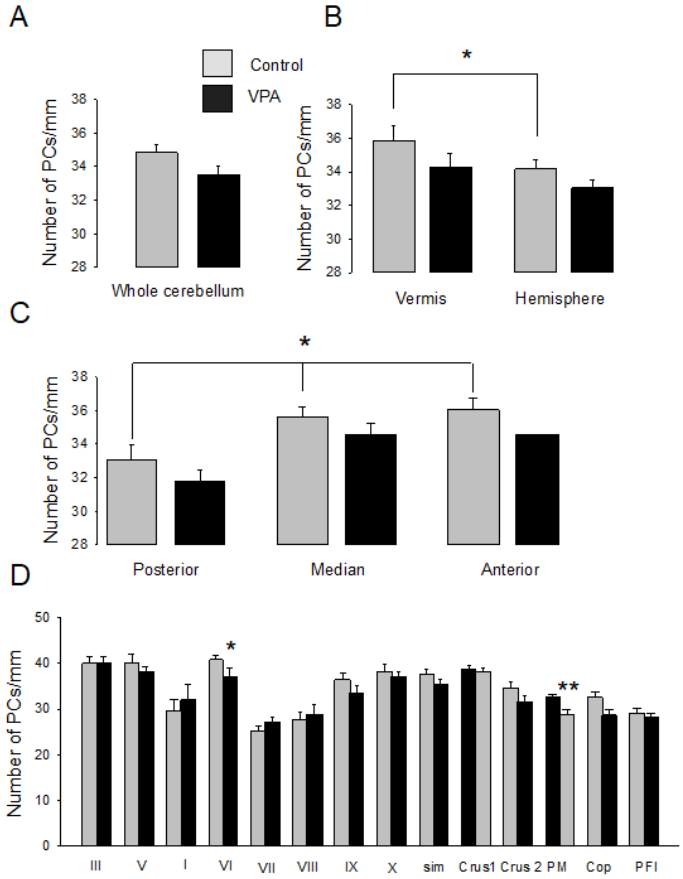


Figure 2. PCs loss in prenatally VPA-treated P40 male mice.

A. Linear density of PCs in the whole cerebellum of control and VPA-treated mice.B. Linear density of PCs in the vermis and hemispheres of control and VPA-treated mice. C. Linear density of PCs in the posterior, median and anterior cerebellum in control and VPA treated mice. D. PCs linear density in the different cerebellar lobules in control and VPA-treated P40 males. Note a significant reduction of the linear PCs density in the lobules VI, VII, VIII and PM.



3.

Figure 3. PCs linear density in prenatally VPA treated female mice.

A.Comparison of the linear density of PCs in the whole cerebellum for control female mice (blue) and VPA treated female mice (red), B in the vermis and hemispheres and C in the posterior, median and anterior cerebellum. Note the absence of significant effect of VPA treatment. D. PCs linear density in the different cerebellar lobules in control and VPA treated P40 females. Note a significant reduction of the PC linear density in the lobules VI and paramedian (PM).

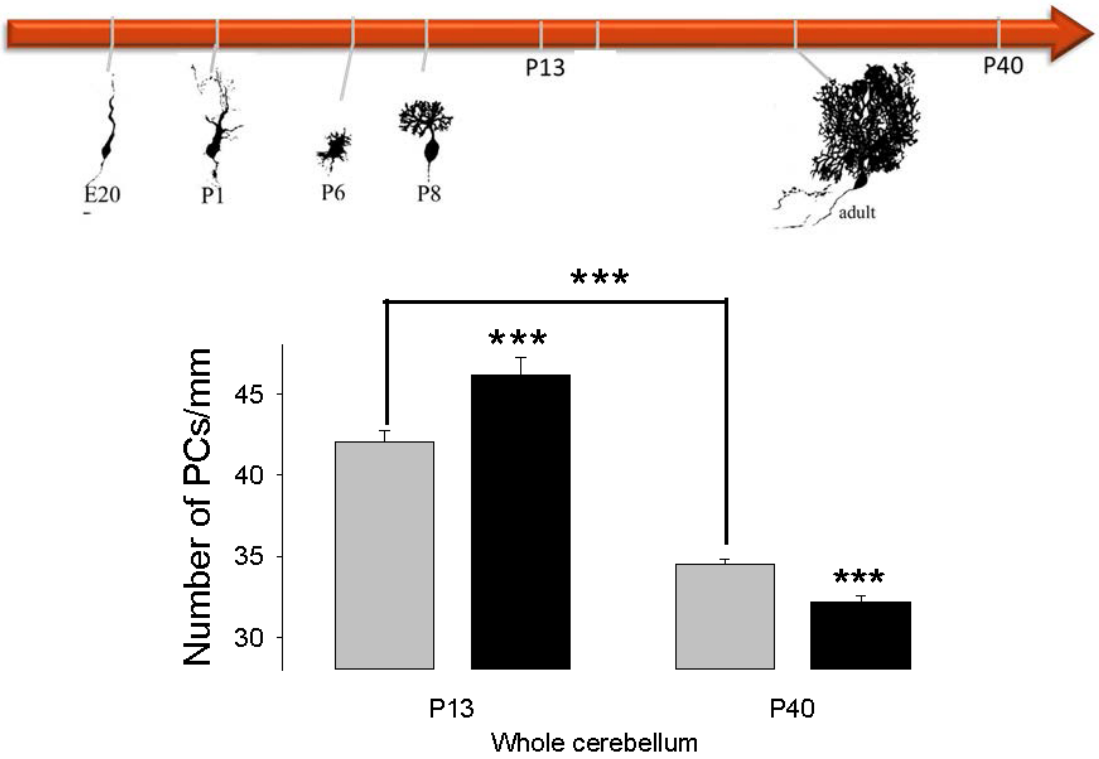


Figure 4. Prenatal VPA treatment induces an increase of PCs linear density in the whole cerebellum of young mice.

Upper part. Schematic representation of PCs development between E20-P40during the E20-P40 period. Lower part. Compares, PCs linear density at P13 and P40 measured in control mice (n= 4 for P13 and 15 for P40) and in prenatally treated mice (n=4 for P13 and 12 for P40). The data obtained in males and females are pooled. At P13, the PCs linear density is globally significantly larger in VPA-treated than controls animals. In control mice the PCs linear density is globally significantly larger at P13 than at P40.

Etude comportementale de l'influence pharmacologique d'un composé modulant le gradient des ions chlorures.

Contribution expérimentale

Au cours de ma thèse j'ai eu la chance de participer a la mise en place d'un brevet portant sur un composé modulant le gradient aux ions chlorures que je nommerai composé X. Pour ce brevet nous avons testé l'effet du composé X et du bumétanide sur les comportements autistiques de trois modèle d'autisme: les souris FMR1-, OPRM1- et SHANK3-. Dans le cadre de ma thèse je vais présenter certains des résultats auxquels j'ai participé.

Matériels et méthodes

Tests comportementaux :

Les protocoles des tests réalisés ici sont similaires à ceux réalisés dans le deuxième article.

Animaux:

Souris ne présentant pas le récpteur au opïoides mu (*Oprm1*$^{-/-}$)

La lignée des souris Oprm1$^{-/-}$ (B6.129S2-*Oprm1*$^{tm1Kff/J}$) provient de Jackson Laboratories (Farmington, USA). Les souris sont stabulées en groupe (2 à 5 par cage) et maintenue sous un cycle jour/nuit de 12 heures (jour à 7h00) à une température contrôlée à 21±1°C. La nourriture et l'eau sont disponibles ad libitum.

Souris ne présentant pas le gène *Fmr1* (*Fmr1*$^{-/-}$):

La lignée des souris Fmr1 a été fournie par Rob Willemsen (Erasmus MC, Rotterdam, Netherlands). Les souris sont stabulées en groupe (2 à 5 par cage) et maintenues sous un cycle jour/nuit de 12 heures (jour à 7h00) à une température contrôlée à 21±1°C. La nourriture et l'eau sont disponibles ad libitum.

Résultats

Dans le test de l'interaction social direct (figure 1A), le traitement avec le composé (125, 205 et 500 mg/kg versus saline) montre un effet bénéfique dépendant de la dose, augmentant, dans le modèle *Oprm1*$^{-/-}$, le **temps total passé en contact social** (effet génotype: $F_{1,127}$=16.5, p<0.0001; effet genre: $F_{1,127}$=13.9, p<0.0001; effet dose: $F_{3,127}$=30.9, p<0.0001; génotype x dose:

$F_{3,127}$=25.6, p<0.0001; génotype x genre x dose: $F_{3,127}$=5.3, p<0.01), le **nombre** le **temps** et la **durées** des **contacts aux pattes** et **aux museaux** (*nombre de contact du museaux*: effet genre: $F_{1,127}$=8.1, p<0.01; effet dose: $F_{3,127}$=10.3, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$= 9.4, p<0.0001; génotype x genre x dose: $F_{3,127}$=3.5, p<0.05; *temps passé en contact de museaux*: effet génotype: $F_{1,127}$=16.9, p< 0.0001; effet genre: $F_{1,127}$=13.2, p<0.0001; effet dose: $F_{3,127}$=27.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$=23.6, p<0.0001; génotype x genre x dose: $F_{3,127}$=5.1, p<0.001; *durée des contacts de museaux*: effet génotype: $F_{1,127}$=16.5, p<0.001; effet genre: $F_{1,127}$=13.9, p<0.0001; effet dose: $F_{3,127}$=30.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$=25.6, p<0.0001; génotype x genre x dose: $F_{3,127}$=5.3, p<0.01; *nombre de contact aux pattes*: effet génotype: $F_{1,127}$=8.9, p<0.001; effet dose: $F_{3,127}$=29.4, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$= 15.7, p<0.0001; *temps passé en contact aux patte*: effet genre: $F_{1,127}$=4.9, p<0.01; effet dose: $F_{3,127}$=23.0, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$=14.4, p<0.0001; *durée des contacts aux pattes*: effet génotype: $F_{1,127}$=48.1, p<0.0001; effet dose: $F_{3,127}$=22.3, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$= 19.9, p<0.0001) et le **nombres de poursuites** (effet dose: $F_{3,127}$=9.3, p<0.0001; génotype x genre x dose: $F_{3,127}$=2.7, p<0.05). L'administration du composé réduit aussi le **nombre de toilettages** (effet génotype: $F_{1,127}$=5.2, p<0.05; effet dose: $F_{3,127}$=19.3, p<0.0001; génotype x dose: $F_{3,127}$=5.2, p<0.01) et plus spécifiquement les **toilettages survenant directement après un contact social** (effet génotype: $F_{1,127}$=34.7, p<0.0001; effet dose: $F_{3,127}$=33.7, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,127}$=36.4, p<0.0001) dans le modèle *Oprm1*$^{-/-}$ (Figure 1A). L'effet genre indique ici que l'administration du composé aux plus hautes doses (250 et 500mg/kg) était plus efficaces pour augmenter les paramètres d'interactions sociales (temps passé en contact social, temps passé en contact de museaux, durée de ces contacts et poursuites) chez les mâles que chez les femelles *Oprm1*$^{-/-}$ dans ce test (Figure 1B). Ces résultats montrent que l'administration du composé peut restaurer l'interaction sociale directe dans le modèle des souris KO mu opioïde.

Dans les mêmes conditions, un traitement au bumétanide (0.5 mg/kg versus saline) augmente mais ne restore pas complètement, le **temps passé en contact social** (effet génotype: $F_{1,59}$=73.4, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,59}$=10.0, p<0.01), le **temps passé en contact de museaux** (effet génotype: $F_{1,59}$=68.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,59}$=9.2, p<0.001) et **la durée des contacts de museaux** (effet génotype: $F_{1,59}$=342.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,59}$=9.4, p<0.01) chez les

souris KO comparés aux contrôles. Ce traitement n'a pas d'effet significatif sur le **nombre de contact de museaux** (effet génotype: $F_{1,59}$=7.8, p<0.01; effet dose: $F_{1,59}$=5.8, p<0.001; génotype x dose: $F_{1,59}$=5.2, p<0.05) et le **nombre de contact aux pattes** (effet génotype: $F_{1,59}$=46.7, p<0.0001; effet dose: $F_{1,59}$=13.0, p<0.05; génotype x dose: $F_{1,59}$=9.6, p<0.01), **le temps passé en contact aux pattes** (effet génotype: $F_{1,59}$=22.9, p<0.0001; effet dose: $F_{1,59}$=6.0, p<0.05; génotype x dose: $F_{1,59}$=5.2, p<0.05) et la **durée des contacts aux pattes** (effet génotype: $F_{1,59}$=76.4, p<0.0001; effet dose: $F_{1,59}$=4.9, p<0.05) chez les souris mutantes. Cependant, le bumétanide normalise le **nombre de toilettage** (effet génotype: $F_{1,59}$=5.3, p<0.05; effet dose: $F_{1,59}$=21.4, p<0.0001) et le **temps passé en toilettage** (effet dose: $F_{1,59}$=11.9, p<0.01) et plus spécifiquement les **toilettages survenant directement après un contact social** (effet génotype: $F_{1,59}$=27.9, p<0.0001; effet dose: $F_{1,59}$=27.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,59}$=19.6, p<0.0001) dans le modèle *Oprm1*$^{-/-}$ (Figure 1B). Ces résultat indique qu'a cette dose le bumétanide ne restore que partiellement l'interaction sociale chez les souris *Oprm1*$^{-/-}$.

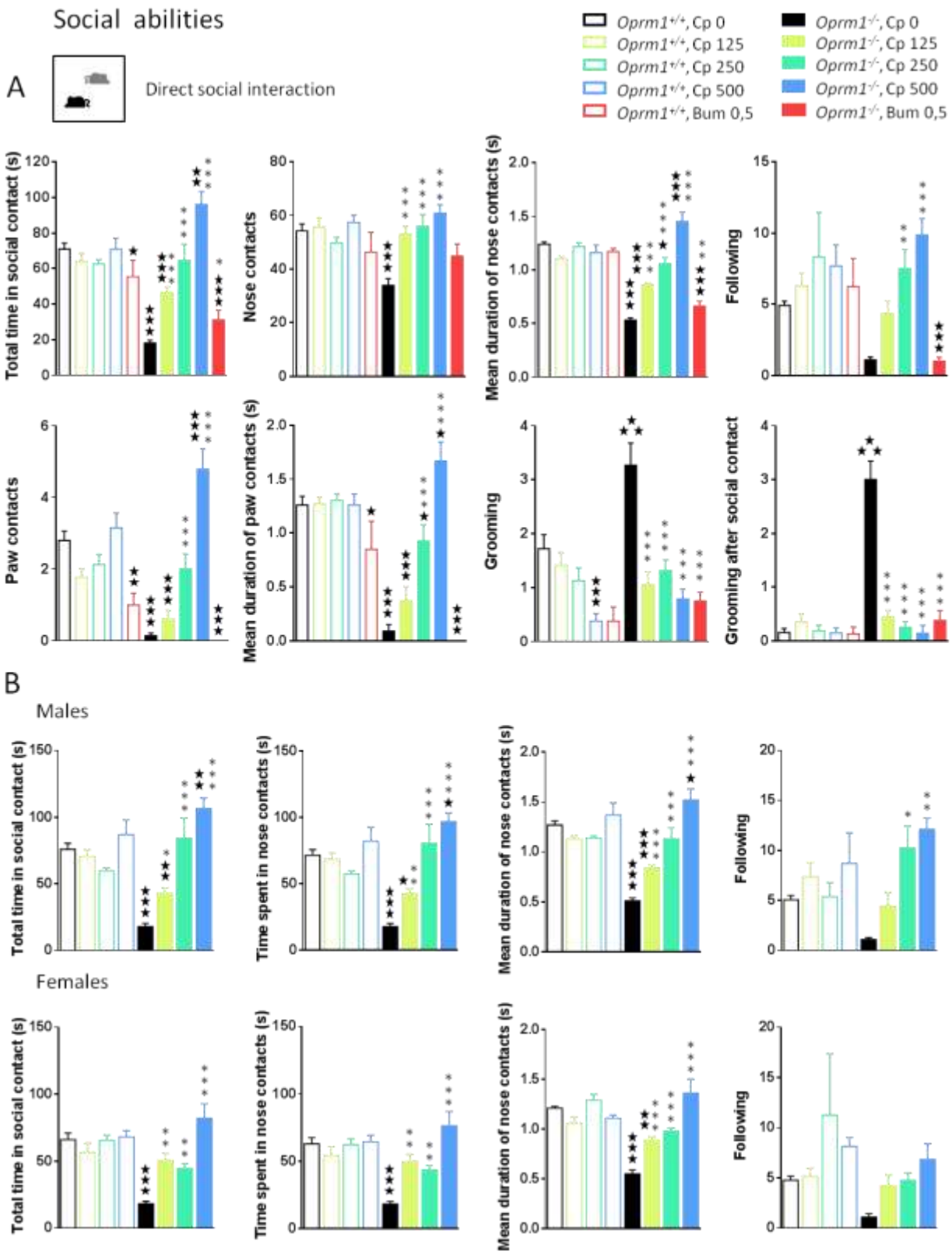

Social abilities
A
Direct social interaction
Oprm1+/+, Cp 0
Oprm1+/+, Cp 125
Oprm1+/+, Cp 250
Oprm1+/+, Cp 500
Oprm1+/+, Bum 0,5
Oprm1-/-, Cp 0
Oprm1-/-, Cp 125
Oprm1-/-, Cp 250
Oprm1-/-, Cp 500
Oprm1-/-, Bum 0,5
Total time in social contact (s)
Nose contacts
Mean duration of nose contacts (s)
Following
Paw contacts
Mean duration of paw contacts (s)
Grooming
Grooming after social contact
B
Males
Total time in social contact (s)
Time spent in nose contacts (s)
Mean duration of nose contacts (s)
Following
Females
Total time in social contact (s)
Time spent in nose contacts (s)
Mean duration of nose contacts (s)
Following

Figure 1 : effets du traitement avec le composé (125, 250, 500 mg/kg) ainsi que du Bumétanide (0.5 mg/kg) sur les principaux paramètres mesurés lors du test d'interaction sociale direct. Les données sont présentées comme moyenne ± sem. Différence par rapport aux contrôles salins : une étoile: $p<0.05$; deux étoiles: $p<0.01$; trois étoiles: $p<0.001$. Différence par rapport aux *Oprm1*$^{-/-}$ salins : une étoile: $p<0.05$; deux étoiles: $p<0.01$; trois étoiles: $p<0.001$ (three-way analysis of variance suivi d'un test post-hoc de Newman-Keules).

Le traitement avec le composé augmente le **nombre de redressements** chez tous les animaux de manière dose-dépendante (effet dose: $F_{3,121}=17.3$, $p<0.0001$). Ce traitement augmente aussi de manière dépendant de la dose le **nombre de toilettage** mais uniquement chez les animaux contrôles (effet génotype: $F_{1,121}=16.7$, $p<0.001$; effet dose: $F_{3,121}= 4.1$, $p<0.01$; génotype x dose: $F_{3,121}= 6.5$, $p<0.0001$). Cependant, l'administration du composé réduit de manière dose-dépendante le **nombre d'enfouissement** (effet génotype: $F_{1,121}=12.8$, $p<0.001$; effet dose: $F_{3,121}=6.6$, $p<0.001$), le **temps d'enfouissement** (effet génotype: $F_{1,121}=15.5$, $p<0.001$; effet dose: $F_{3,121}=9.8$, $p<0.0001$) et la **durée des enfouissements** (effet dose: $F_{3,121}=4.2$, $p<0.0001$) chez tous les animaux. Le traitement avec le composé augmente de manière dose-dépendante le **nombre d'ébrouement** chez les contrôles alors qu'il réduit leurs survenue chez les mutants (effet dose: $F_{3,121}=3.7$, $p<0.05$; génotype x dose: $F_{3,121}=14.5$, $p<0.0001$). Finalement, le composé normalise le nombre de **tour sur soi** chez les *Oprm1*$^{-/-}$ (effet dose: $F_{3,121}=3.0$, $p<0.05$; génotype x dose: $F_{3,121}=9.1$, $p<0.0001$) au niveau des contrôles (Figure 2). Ainsi, le traitement avec le composé réduit efficacement l'occurrence de deux stéréotypies motrices chez les souris *Oprm1*$^{-/-}$: les ébrouements et les tours sur soi.

Dans les mêmes conditions le traitement au bumétanide ne change pas le nombre de redressement ni de toilettage (pas d'effet significatif) chez les mutants ni chez les contrôles. Cependant, ce traitement augmente, le **nombre** (effet dose: $F_{1,55}=5.3$, $p<0.05$), **le temps passé** (effet dose: $F_{1,55}=7.7$, $p<0.01$) et la **durée** (pas d'effet significatif) des **enfouissements** chez toutes les souris. Enfin, le bumétanide supprime efficacement les **ébrouement** stéréotypés (effet génotype: $F_{1,55}=10.0$, $p<0.01$; effet dose: $F_{1,55}=13.2$, $p<0.001$; génotype x dose: $F_{1,55}=26.4$, $p<0.0001$) et les **tours sur soi** (effet dose: $F_{1,55}=14.4$, $p<0.001$; génotype x dose: $F_{1,55}=23.9$,

p<0.0001) chez les animaux mutant (Figure 2). Ainsi, le traitement au bumétanide réduit efficacement les stéréotypies motrices chez les souris *Oprm1*$^{-/-}$.

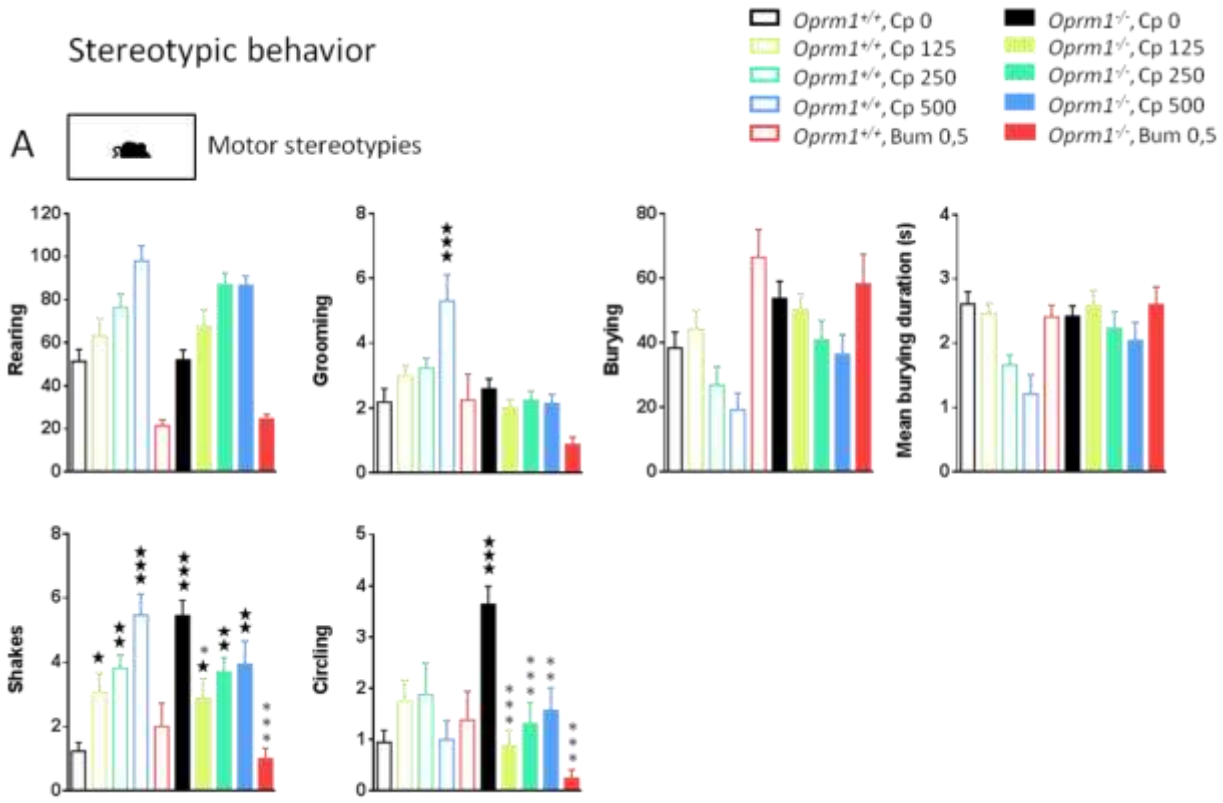


Figure 2 : **Effets du traitement avec le composé (125, 250, 500 mg/kg) ainsi que du Bumétanide (0.5 mg/kg) sur les comportements stéréotypés.** Les données sont présentées comme moyenne ± sem. Différence par rapport aux contrôles salins : une étoile: p<0.05; deux étoiles: p<0.01; trois étoiles: p<0.001. Différence par rapport aux *Oprm1*$^{-/-}$ salins : une étoile: p<0.05; deux étoiles: p<0.01; trois étoiles: p<0.001 (three-way analysis of variance suivi d'un test post-hoc de Newman-Keules).

La dose intermédiaire de 250 mg/kg a été choisi pour être tester sur d'autres modèles car elle a démontré son efficacité à soulager les symptômes autistiques chez les souris *Oprm1*$^{-/-}$. Je vais ici présenter certains résultats obtenue chez la souris Fmr1$^{-/-}$.

Dans le test d'interaction social direct (Figure 3A), le traitement avec le composé à 250 mg/kg normalise le **temps passé, en contact social direct** (effet génotype: $F_{1,30}$=31.8, p<0.0001; effet

dose: $F_{1,30}$=40.6, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,30}$=30.2, p<0.0001) et en **contact de museaux** (effet génotype: $F_{1,30}$=30.5, p<0.0001; effet dose: $F_{1,30}$=37.3, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,30}$=28.1, p<0.0001), la **durée des contact de museaux** (effet génotype: $F_{1,30}$=112.1, p<0.0001; effet dose: $F_{1,30}$=48.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,30}$=49.5, p<0.0001), le **nombre de poursuites** (effet dose: $F_{1,30}$=9.9, p<0.01; génotype x dose: $F_{1,30}$=13.7, p<0.001) et **le nombre** (effet dose: $F_{1,30}$=14.4, p<0.001; génotype x dose: $F_{1,30}$=10.7, p<0.01), **le temps passé** (effet génotype: $F_{1,30}$=9.9, p<0.05; effet dose: $F_{1,30}$=17.8, p<0.001; génotype x dose: $F_{1,30}$=10.6, p<0.01) et **la durée** (effet génotype: $F_{1,30}$=81.4, p<0.0001; effet dose: $F_{1,30}$=30.9, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,30}$=27.1, p<0.0001) des contacts aux pattes qui sont déficient chez les souris *Fmr1*. De plus, le traitement avec le composé réduit le **nombre** excessif de **toilettage** (effet génotype: $F_{1,30}$=8.6, p<0.01; effet dose: $F_{1,30}$=6.6, p<0.05; génotype x dose: $F_{1,30}$=10.9, p<0.001) et particulièrement ceux **survenant après un contact social** (effet génotype: $F_{1,30}$=47.7, p<0.0001; effet dose: $F_{1,30}$=22.4, p<0.0001; génotype x dose: $F_{1,30}$=30.1, p<0.0001) chez les souris mutantes.

Après traitement avec le composé nous n'observons aucuns effet de génotype ou de traitement chez les souris Fmr1 KO ou les contrôles sur le **nombre de redressement**, **de toilettage** ou **d'enfouissement** (aucun effet significatif). Cependant, l'administration du composé réduit le **temps passé à enfouir** (effet dose: $F_{1,30}$=5.5, p<0.05) et la **durée des enfouissements** (effet dose: $F_{1,30}$=4.9, p<0.05) chez toutes les souris. Enfin, le composé normalise le nombre d'ébrouement (génotype x dose: $F_{1,30}$=19.6, p<0.001) et de tours sur soi (effet génotype: $F_{1,30}$=7.3, p<0.05; effet dose: $F_{1,30}$=6.1, p<0.05; génotype x dose: $F_{1,30}$=11.9, p<0.01) chez les souris *Fmr1*$^{-/-}$ au niveau des contrôles. Ainsi, le composé traite efficacement l'occurrence de stéréotypie motrice chez les souris KO Fmr1.

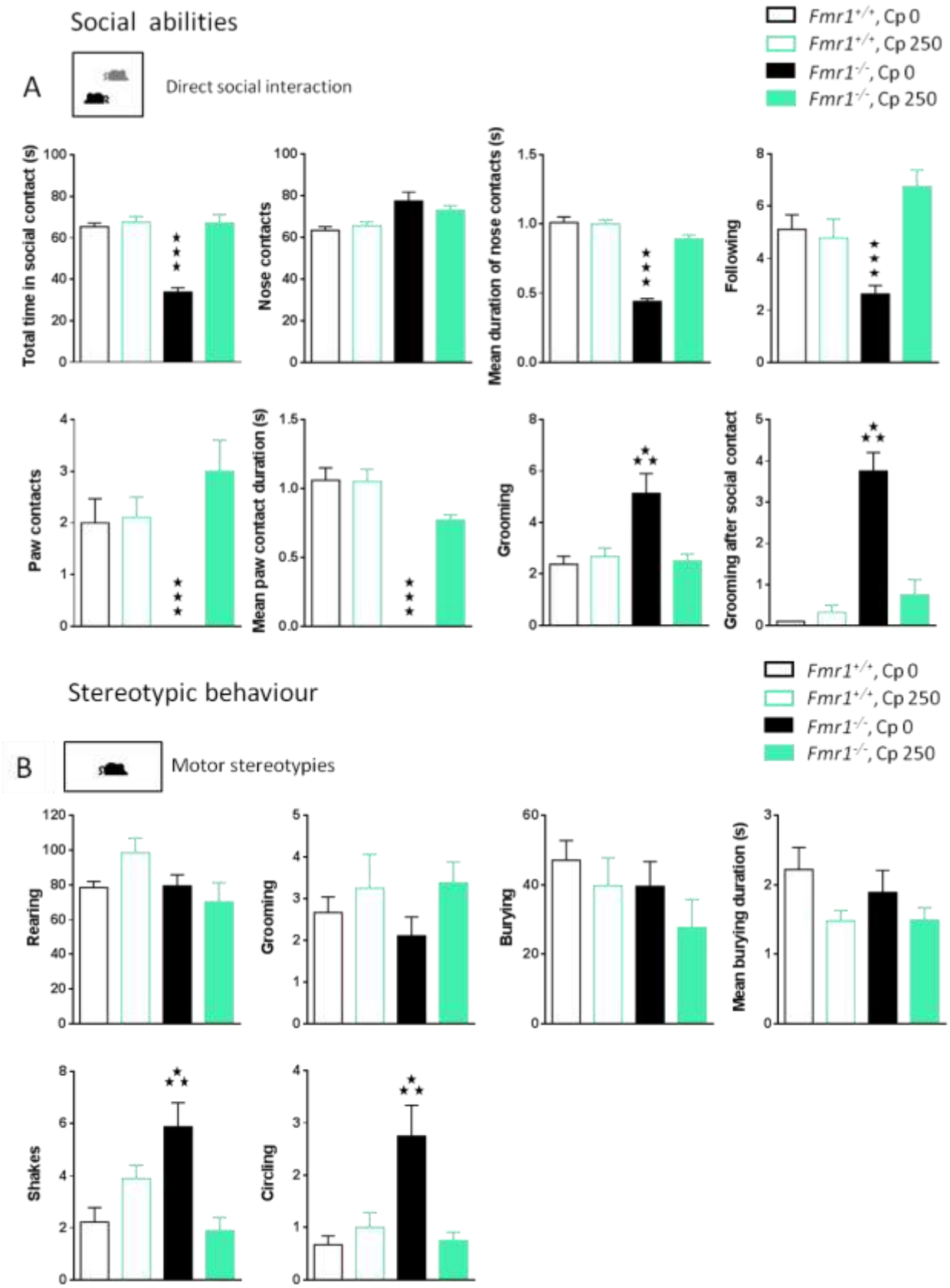

Social abilities
A
Direct social interaction
Fmr1+/+, Cp 0
Fmr1+/+, Cp 250
Fmr1-/-, Cp 0
Fmr1-/-, Cp 250
Total time in social contact (s)
Nose contacts
Mean duration of nose contacts (s)
Following
Paw contacts
Mean paw contact duration (s)
Grooming
Grooming after social contact
Stereotypic behaviour
B
Motor stereotypies
Fmr1+/+, Cp 0
Fmr1+/+, Cp 250
Fmr1-/-, Cp 0
Fmr1-/-, Cp 250
Rearing
Grooming
Burying
Mean burying duration (s)
Shakes
Circling

Figure 3 : **Effets du traitement avec le composé (250 mg/kg) (A) sur l'interaction sociales direct et (B) sur les comportements stéréotypés chez les souris *Fmr1*$^{-/-}$.** Les données sont présentées comme moyenne ± sem. Différence par rapport aux contrôles salins : une étoile: $p<0.05$; deux étoiles: $p<0.01$; trois étoiles: $p<0.001$. (three-way analysis of variance suivi d'un test post-hoc de Newman-Keules).

Conclusion

Ces résultats montrent que l'administration du composé améliore significativement l'interaction sociale et réduit efficacement les stéréotypies motrices chez les souris *Oprm1*$^{-/-}$. Le traitement au bumétanide supprime les stéréotypies mais améliore moins significativement les comportements sociaux dans ce modèle. Ces résultats montrent également que le traitement avec le composé peut améliorer significativement l'interaction sociale et les stéréotypies motrices chez les souris *Fmr1*$^{-/-}$.

Ainsi, le composé peut améliorer les comportements sociaux et les stéréotypies qui sont les deux symptômes des TSA. De plus, nous avons constaté cette amélioration dans deux modèles génétique de l'autisme différents ce qui laisse entrevoir un fort potentiel translationnel pour le composé.

Partie 3 : Discussion générale et perspectives

Au cours de ma thèse j'ai pu caractériser le développement du gradient des ions chlorures et des conductances $GABA_A$ majoritaires dans les cellules de Purkinje, mais aussi l'impact d'une exposition prénatale au VPA sur l'histologie cérébelleuse et sur les comportements de type autistiques. Au cours de ces études, les dimorphismes sexuels ont souvent été source de nombreuses questions que je vais essayer de rendre compte ici.

La différence mâle/femelle dans l'autisme

L'une des observations épidémiologiques la plus souvent rapportée pour l'autisme concerne l'occurrence d'un ratio de ¼ entre femmes et hommes dans l'établissement du diagnostique (Fombonne, 2003; Kim et al., 2011). Cependant, plusieurs études tendent à montrer que les symptômes sont exprimés différemment en fonction du genre et que ces différences pourraient expliquer la sous-représentation de femmes dans la population autistique (Mandy et al., 2012). En effet, plusieurs arguments sont avancés, comme la capacité inhérente aux filles de mieux dissimuler les symptômes ou même, plus simplement, l'existence d'un biais du diagnostique, celui-ci ayant été établit pour les garçons et n'étant pas entièrement pertinent pour les filles.

Différentes études ont porté sur les différences entre filles autistes et garçons autistes, notamment au niveau des symptômes centraux de l'autisme et les résultats sont hétérogènes. La plupart des études montrent une présence de stéréotypies plus importante chez les garçons, tandis que certaines d'entre elles ne montrent pas de dimorphisme sexuel pour ce symptôme et d'autres encore notent même plus de stéréotypies chez les filles. Cette disparité se retrouve également pour les troubles sociaux et les altérations de la communication. Une méta-analyse de ces données a cependant pu montrer que les différences entre filles et garçons ne ressortaient significativement qu'en ce qui concernait les stéréotypies (Supekar and Menon, 2015). Ce symptôme étant peut-être le plus facilement observable, cela pourrait expliquer que les filles ne soient pas souvent diagnostiquées. Ce symptôme repose essentiellement sur des altérations de structures impliquées dans la gestion de processus moteurs, tels que le striatum et le cervelet. Cette même étude montre qu'effectivement un dimorphisme sexuel peut-être observé à un niveau anatomique dans le cervelet et que ce dimorphisme serait la seul base

anatomique permettant de différencier avec suffisamment de certitude les filles avec un TSA des garçons avec un TSA. De manière intéressante, ils montrent que les stéréotypies chez les filles seraient corrélées aux différences observées dans le cervelet, tandis que les stéréotypies chez les garçons seraient corrélées à des différences dans le striatum.

Différence dans le gradient aux ions chlorures

Comme nous l'avons discuté dans l'article 1, un pic de testostérone durant le développement modifie les niveaux d'expression de NKCC1 et de KCC2 et amène le switch GABAergique à survenir plus tardivement chez les mâles que chez les femelles (Jaylyn Waddell and Margaret M. McCarthy, 2012). J'ai cependant observé l'inverse dans les CP. Nous avons proposé (article 1) une hypothèse ou ces mécanismes seraient dépendant de l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) dans le cervelet et qui expliquerait les observations faites sur le développement post-natal de cette structure.

Mir et al,. (2016) rapportent que des différences mâles/femelles sont déjà observables dans les réponses GABAergiques dans des cultures de cellules hippocampiques prélevées à E16, avant le pic testostérone (Mir et al., 2016). Cela suggère l'existence d'autres mécanismes jouant un rôle antérieur à ceux actuellement proposés et probablement intrinsèques au développement de chaque sexe. Cependant, le cervelet se développant plus tardivement que l'hippocampe et sachant que le développement du gradient aux ions chlorures n'est pas le même dans le cervelet (article 1), il est possible que ces mécanisme précoces n'y aient pas lieux.

Je montre dans mes études que les souris VPA présentent une modification du développement du gradient aux ions chlorures dans les CP. Or, compte tenu de la littérature rapportant l'implication du cervelet et de ce gradient dans les troubles autistiques, je suppose que cette modification joue un rôle dans les troubles observés. La perte en CP présente chez le mâle pourrait laisser penser qu'elle est responsable de la part du cervelet dans les déficits comportementaux. Cependant, cette perte n'étant pas présente chez les femelles et celles-ci présentant les mêmes comportements que les mâles, nous savons que la perte en CP n'est pas responsable des comportements que nous observons. De plus, je montre que, bien que décalé

dans le temps, le switch GABAergique survient bel et bien dans les CP des souris VPA. Une étude (Deidda et al., 2014) a montré que des altérations dans la signalisation GABAergique tôt dans le développement avait des conséquences à long terme sur la plasticité synaptique. Au vu de ces données, il est possible que la plasticité synaptique soit altérée dans le cervelet des souris VPA et que cela influe sur la difficulté qu'ont ces souris à mettre en place des comportements appropriés notamment lors de l'apprentissage moteur.

Il est intéressant de noter dans cette dernière étude que l'effet de la modification de la signalisation GABAergique serait médiée par le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Or, comme que nous l'avons rapporté dans l'article 1, le BDNF intervient dans des processus liés à l'autisme et notamment dans le gradient en ions chlorures en exerçant une activité inhibitrice sur KCC2 dans les CP (Huang et al., 2013). Le BDNF aurait donc pour conséquence d'augmenter la concentration intracellulaire aux ions chlorures ainsi que nous l'avons observé dans les CP des souris VPA. Or, l'expression du BDNF est augmentéé dans le modèle VPA (Almeida et al., 2014) et ce, de façon plus importante chez la femelle que chez le mâle (Konopko et al., 2017). Cette étude propose, sur la base de ce dimorphisme sexuel, un rôle protecteur au BDNF. L'ensemble de ces données pourrait expliquer le délai dans la survenue du switch GABAergique chez les souris VPA ainsi que le dimorphisme sexuel que j'ai observé dans la perte en CP.

Une autre piste intéressante révélée par Leonzino et al., (2016) montre l'implication de l'ocytocine sur le moment de l'inversion GABAergique en entrainant l'expression de KCC2 (Leonzino et al., 2016). L'ocytocine montrant des effet positifs dans le traitement de l'autisme (Benner and Yamasue, 2017) et ayant des récepteurs exprimés dans le cortex cérébelleux, il est possible qu'une partie des effets bénéfiques de cette neurohormone passe par une action sur le gradient aux ions chlorures dans le cervelet.

Lors de mes observations histologiques, j'ai remarqué un dimorphisme sexuel dans la perte en CP chez les souris VPA.

Perez-Pouchoulen et al (2016) ont observés que l'exposition prénatale au VPA modifie l'expression des récepteurs aux androgènes, de façon dépendante de l'âge et de la localisation,

dans le cervelet de rats mâles et femelles. Ils rapportent chez le mâle une sous-expression dans le lobule 8 à P7 et une surexpression à P14, et chez les femelles à P14 une sous-expression dans le lobule 6 et une surexpression dans le lobule 9. De manière générale, ils notent une diminution progressive de l'expression des récepteurs aux androgènes au cours du développement, toutefois plus marquée chez les femelles que chez les mâles (Perez-Pouchoulen et al., 2016). Il est intéressant de constater ici que les lobules sortant comme significativement touchés dans cette étude sont les mêmes que ceux où nous avons nous-mêmes rapporté des atteintes (article 2). Nunez et al,. (2008) ont montrée sur des cultures de cellules hippocampiques, que l'excitotoxicité déclenchée par l'activation des récepteurs $GABA_A$ était plus importante chez les mâles que chez les femelles. Cette différence serait due à un mécanisme non identifié qui, chez les femelles, atténuerait l'influx calcique suite à des stimulations répétées et serait aboli par application d'androgènes (Joseph L. Nuñez and Margaret M., 2008). Ces données vont dans le sens de nos résultats obtenus dans le cervelet et, à la lumières des données de Perez-Pouchoulen, pourraient expliquer la perte de CP plus importante chez le mâle que chez la femelle.

L'effet des androgènes rapporté par Perez-Pouchoulen et al,. (2016) serait dû à une diminution de l'expression de la sous-unité gamma2 du récepteur $GABA_A$ qui jouerait un rôle de senseur et interviendrait dans la désensibilisation du récepteur. Huang et al. (2013) montrent que l'effet du BDNF sur KCC2 est dépendant du couplage de ce dernier avec le récepteur $GABA_A$ et avance l'hypothèse que ce couplage serait sous la dépendance de la composition en sous-unités du récepteur $GABA_A$. Lors de nos observations (article 1), nous avons noté une évolution de la conductance $GABA_A$ qui suggère une évolution de la composition en sous-unités de ce récepteur. Nous avons également observé que cette évolution était altérée dans le modèle VPA. Au vu de ces observations et de l'importance que revêt la composition du récepteur $GABA_{A,}$ il est probable que celle-ci soit altérée dans le modèle VPA, ce qui expliquerait nos observations.

Ainsi que le rapporte Pelissier et al., (2017), le circuit de la récompense pourrait occuper un rôle prépondérant dans les TSA. Il est donc possible que des atteintes, par exemple dans le noyau accumbens, soit présentes chez les souris VPA.

Comprendre les origines des TSA ne signifiera pas nécessairement trouver un traitement. En effet, l'extrême diversité des atteintes et des symptômes observés m'incite à penser qu'un traitement ne sera possible qu'en identifiant un mécanisme commun vers lequel convergeraient tous les facteurs de risques. Une autre solution serait d'identifier, sur la base de caractères génétiques, physiologiques, fonctionnels ou même symptomatiques, des sous-groupes dans les TSA auxquels il serait possible d'adresser des stratégies thérapeutiques spécifiques.

Perspectives

A travers l'ensemble de la littérature portant sur le sujet, l'implication du cervelet dans l'autisme semble claire. Elle n'est cependant pas simple. En effet, nos études ont montré qu'une simple perte en CP n'influait pas sur les comportements autistiques, suggérant ici une influence plus fine, que ce soit au niveau de la localisation de la perte ou de la modification dans l'activité du réseau cérébelleux. Différentes expériences pourraient être réalisées afin d'affiner notre compréhension du développement cérébelleux et des impacts d'une modification de celui-ci, des origines et des conséquences du dimorphisme sexuel observées dans ce développement et des fonctions spécifiques associées à chaque lobules. Notre modèle nous offre également l'occasion de tester des traitements et d'observer leurs effets dans une structure et sur un mécanisme spécifique, mais également à un niveau globale sur le comportement.

Nous avons noté dans nos études un retard dans le développement du gradient des ions chlorures. Des modifications de ce développement pouvant avoir des conséquences à long terme sur la plasticité synaptique, il serait intéressant de tester celle-ci dans le cortex cérébelleux de souris VPA. Nous pourrions également tenter de rétablir pharmacologiquement le switch GABAergique en ciblant la période d'inversion que nous avons définie (P14-P15) avec, par exemple, le composé X. Cela nous permettrait d'observer les conséquences sur la plasticité synaptique, mais aussi sur le comportement à plus long terme

Il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression en sous-unités $GABA_A$ dans les CP entre mâles et femelles et entre souris VPA et souris contrôles. Les différences entre ces conditions pourraient nous en apprendre beaucoup sur le rôle du récepteur $GABA_A$ dans le

développement et le fonctionnement du cervelet. La construction de modèles génétiquement modifiés de plus en plus accessible, il est imaginable d'en construire un reproduisant les modifications observées dans la composition en sous-unités du récepteur $GABA_A$ chez les souris VPA, afin d'étudier les conséquences sur le développement du cervelet et sur les comportements autistiques.

Stoodley et al., (2017) ont montrée qu'une inhibition spécifique des CP dans un lobule (Crus 1) pouvait générer des comportements autistiques. Cette approche, appliquée à chacun des lobules, permettrait de comprendre les fonctions spécifiques de ceux-ci dans les modèles employés et aiderait à comprendre l'implication de modifications régionalisées.

Nos résultats mettent en avant plusieurs atteintes cérébelleuses dans le cervelet d'un modèle d'étude de l'autisme que sont les souris VPA. Nos expériences pourraient être réalisées dans d'autres modèles autistiques afin de voir si les atteintes que nous observons sont généralisables et pourraient être des facteurs communs à différents modèles.

Comme nous en discutions dans l'article 2, d'autres structures que le cervelet pourrait être à l'origine du phénotype autistique que nous observons dans le modèles VPA. Nous pourrions étudier l'influence d'une exposition prénatale au VPA sur le développement du gradient des ions chlorures dans d'autres structures, comme le noyau accubens, et les effets que peut y avoir une manipulation pharmacologique de ce dernier.

Bibliographie

Aavani T, Rana SA, Hawkes R, Pittman QJ (2015) Maternal Immune Activation Produces Cerebellar Hyperplasia and Alterations in Motor and Social Behaviors in Male and Female Mice. The Cerebellum 14:491–505.

Allman JM, Tetreault NA, Hakeem AY, Manaye KF, Semendeferi K, Erwin JM, Park S, Goubert V, Hof PR (2010) The von Economo neurons in frontoinsular and anterior cingulate cortex in great apes and humans. Brain Struct Funct 214:495–517.

Almeida LEF, Roby CD, Krueger BK (2014) Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. Mol Cell Neurosci 59:57–62.

Alvarez-Leefmans FJ, León-Olea M, Mendoza-Sotelo J, Alvarez FJ, Antón B, Garduño R (2001) Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. Neuroscience 104:569–582.

American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.

Arion D, Lewis DA (2011) Altered expression of regulators of the cortical chloride transporters NKCC1 and KCC2 in schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 68:21–31.

Atladóttir HÓ, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET (2010) Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. J Autism Dev Disord 40:1423–1430.

Banerjee S, Riordan M, Bhat M a (2014) Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. Front Cell Neurosci 8:58.

Baron-Cohen (2002) The extreme male brain theory of autism. Trends Cogn Sci 6:248–254.

Baron-Cohen S (1995) Mindblindness: An Essay on Autism and Theory of Mind. MIT Press.

Bastian AJ (2006) Learning to predict the future: the cerebellum adapts feedforward movement control. Curr Opin Neurobiol 16:645–649.

Baumann O, Borra RJ, Bower JM, Cullen KE, Habas C, Ivry RB, Leggio M, Mattingley JB, Molinari M, Moulton EA, Paulin MG, Pavlova MA, Schmahmann JD, Sokolov AA (2015) Consensus Paper: The Role of the Cerebellum in Perceptual Processes. Cerebellum 14:197–220.

Becker EBE, Stoodley CJ (2013) Autism spectrum disorder and the cerebellum, 1st ed. Elsevier Inc.

Becker J a J, Clesse D, Spiegelhalter C, Schwab Y, Le Merrer J, Kieffer BL (2014) Autistic-like syndrome in mu opioid receptor null mice is relieved by facilitated mGluR4 activity. Neuropsychopharmacology 39:2049–2060.

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

Ben-Ari Y (2007) GABA excites and sculpts immature neurons well before delivery: modulation by GABA of the development of ventricular progenitor cells. Epilepsy Curr 7:167–169.

Benner S, Yamasue H (2017) Clinical potential of oxytocin in autism spectrum disorder. Behav Pharmacol:1.

Bostan AC, Dum RP, Strick PL (2013) Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. Trends Cogn Sci 17:241–254.

Bourgeron T (2015) From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. Nat Publ Gr 16:551–563.

Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron 35:625–641.

Cahill L, Babinsky R, Markowitsch HJ, McGaugh JL (1995) The amygdala and emotional memory. Nature 377:295–296.

Catani M, Jones DK, Daly E, Embiricos N, Deeley Q, Pugliese L, Curran S, Robertson D, Murphy DGM (2008) Altered cerebellar feedback projections in Asperger syndrome. Neuroimage

41:1184–1191.

Cerminara (2016) Re-defining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. Neurosci, Nat Rev 16:79–93.

Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends Neurosci 14:515–519.

Christensen J (2013) Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders. 309.

D'Angelo E, Casali S (2012) Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. Front Neural Circuits 6:116.

De Rubeis S et al. (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. Nature 515:209–215.

Deidda G, Allegra M, Cerri C, Naskar S, Bony G, Zunino G, Bozzi Y, Caleo M, Cancedda L (2014) Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex. Nat Neurosci 18:87–96.

DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ (2006) The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. J Neurosci 26:6897–6906.

Dzhala V, Staley K (2015) Acute and chronic efficacy of Bumetanide in an in vitro model of post-traumatic epileptogenesis. CNS Neurosci Ther 21:173–180.

Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? Neuron 23:209–226.

Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman4 ML, Blaha CD, Blatt GJ, Chauhan A, Chauhan V, Dager SR, Dickson PE, Estes AM, Goldowitz D, Heck DH, Kemper TL, Welsh JP (2012) Consensus Paper: Pathological Role of the Cerebellum in Autism. 11:777–807.

Folstein SE, Rosen-Sheidley B (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. Nat Rev Genet 2:943–955.

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

Fuccillo M V (2016) Striatal Circuits as a Common Node for Autism Pathophysiology. 10.

Gadad BS, Hewitson L, Young K a, German DC (2013) Neuropathology and animal models of autism: genetic and environmental factors. Autism Res Treat 2013:731935.

Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N (1997) Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. Curr Opin Neurobiol 7:40–47.

Hewitt SA, Wamsteeker JI, Kurz EU, Bains JS (2009) Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. Nat Neurosci 12:438–443.

Huang Y, Wang J-J, Yung W-H (2013) Coupling between GABA-A receptor and chloride transporter underlies ionic plasticity in cerebellar Purkinje neurons. Cerebellum 12:328–330.

Ito M (2002) Historical review of the significance of the cerebellum and the role of purkinje cells in motor learning. Ann N Y Acad Sci 978:273–288.

Jaylyn Waddell and Margaret M. McCarthy (2012) Sexual Differentiation of the Brain and ADHD: What Is a Sex Difference in Prevalence Telling Us? Curr T op Beha Curr T Author Manuscr Author manuscript; available PMC 2016 April 22 v Neurosci op Beha v Neurosci 2:289–320.

Joseph L. Nuñez and Margaret M. (2008) Androgens predispose males to GABAA -mediated excitotoxicity in the developing hippocampus. Exp Neurol 210:699–708.

Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 15:637–654.

Kalkbrenner AE, Schmidt RJ, Penlesky AC (2014) Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 44:277–318.

Kana RK, Maximo JO, Williams DL, Keller T a, Schipul SE, Cherkassky VL, Minshew NJ, Just MA (2015) Aberrant functioning of the theory-of-mind network in children and adolescents with autism. Mol Autism 6:59.

Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T (2011) Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. Int J Neuropsychopharmacol:1–13.

Kim YS, Leventhal BL, Koh Y-J, Fombonne E, Laska E, Lim E-C, Cheon K-A, Kim S-J, Kim Y-K, Lee H, Song D-H, Grinker RR (2011) Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample. Am J Psychiatry 168:904–912.

Konopko MA, Densmore AL, Krueger BK (2017) Sexually Dimorphic Epigenetic Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Fetal Brain in the Valproic Acid Model of Autism Spectrum Disorder. Dev Neurosci 21201.

Lee BK, Magnusson C, Gardner RM, Blomström Å, Newschaffer CJ, Burstyn I, Karlsson H, Dalman C (2015) Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. Brain Behav Immun 44:100–105.

Lefort JM, Rochefort C, Rondi-Reig L (2015) Cerebellar Contribution to Spatial Navigation: New Insights into Potential Mechanisms. Cerebellum 14:59–62.

Lemonnier E, Ben-Ari Y (2010) The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects. Acta Paediatr Int J Paediatr 99:1885–1888.

Lemonnier E, Degrez C, Phelep M, Tyzio R, Josse F, Grandgeorge M, Hadjikhani N, Ben-Ari Y (2012) A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children.

Transl Psychiatry 2:e202–e202.

Leonzino M, Busnelli M, Antonucci F, Verderio C, Mazzanti M, Chini B, Leonzino M, Busnelli M, Antonucci F, Verderio C, Mazzanti M, Chini B (2016) The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. CellReports 15:96–103.

Mandy W, Chilvers R, Chowdhury U, Salter G, Seigal A, Skuse D (2012) Sex differences in autism spectrum disorder: Evidence from a large sample of children and adolescents. J Autism Dev Disord 42:1304–1313.

Manto M, Habas C (2013) Le cervelet. Paris: Springer Paris.

Markram H, Rinaldi T, Markram K (2007) The intense world syndrome--an alternative hypothesis for autism. Front Neurosci 1:77–96.

Markram K, Markram H (2010) The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism. Front Hum Neurosci 4:224.

Maurin T, Zongaro S, Bardoni B (2014) Fragile X Syndrome: from molecular pathology to therapy. Neurosci Biobehav Rev 46 Pt 2:242–255.

Mikawa S, Wang C, Shu F, Wang T, Fukuda A, Sato K (2002) Developmental changes in KCC1 , KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. 136:93–100.

Miller EK, Cohen JD (2001) An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. Annu Rev Neurosci 24:167–202.

Mir FR, Carrer HF, Cambiasso MJ (2016) Sex differences in depolarizing actions of $GABA_A$ receptor activation in rat embryonic hypothalamic neurons. Eur J Neurosci:1–7.

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

Monti B, Polazzi E, Contestabile A (2009) Biochemical , Molecular and Epigenetic Mechanisms of Valproic Acid Neuroprotection. :95–109.

Murray RJ, Brosch T, Sander D (2014) The functional profile of the human amygdala in affective processing: Insights from intracranial recordings. Cortex 60:10–33.

Parker KL, Narayanan NS, Andreasen NC (2014) The therapeutic potential of the cerebellum in schizophrenia. Front Syst Neurosci 8:1–11.

Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation–chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. Trends Neurosci 26:199–206.

Pellissier LP, Gandia J, Laboute T, Becker JA, Le MJ (2017) Mu opioid receptor, social behaviour and autism spectrum disorder: reward matters. BrJPharmacol.

Perez-Pouchoulen M, Miquel M, Saft P, Brug B, Toledo R, Hernandez ME, 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 53:46–52.

Phillips JR, Hewedi DH, Eissa AM, Moustafa AA (2015) The Cerebellum and Psychiatric Disorders. Front Public Heal 3:1–8.

Price TJ, Cervero F, de Koninck Y (2005) Role of Cation-Chloride-Cotransporters (CCC) in Pain and Hyperalgesia. Curr Top Med Chem 5:547–555.

Rahmati N, Fernanda M, Veloz V, Xu J, Barone S, Ben NR, Schonewille M, Hoebeek FE, Soleimani M, De Zeeuw CI (2016) SLC26A11 (KBAT) in Purkinje Cells Is Critical for Inhibitory Transmission and Contributes to Locomotor Coordination. eNeuro 11:1–16.

Reeber SL, Otis TS, Sillitoe R V (2013) New roles for the cerebellum in health and disease. Front Syst Neurosci 7:83.

Richetto J, Calabrese F, Riva MA, Meyer U (2014) Prenatal immune activation induces

maturation-dependent alterations in the prefrontal GABAergic transcriptome. Schizophr Bull 40:351–361.

Ritvo R, Freeman BJ, Ph D, Scheibel B, Sullivan R (1986) in the Cerebella of Four Autistic Subjects : Initial Findings of Report. :862–866.

Roche (2018) FDA grants Breakthrough Therapy Designation for Roche's balovaptan in autism spectrum disorder.

Rochefort C, Lefort J, Rondi-Reig L (2013) The cerebellum: a new key structure in the navigation system. Front Neural Circuits 7:1–12.

Rogers TD, McKimm E, Dickson PE, Goldowitz D, Blaha CD, Mittleman G (2013) Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and pre-clinical research. Front Syst Neurosci 7:15.

Rubenstein JLR (2010) Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. Curr Opin Neurol 23:118–123.

Rubenstein JLR, Merzenich MM (2003) Model of autism : increased ratio of excitation / inhibition in key neural systems. 2:255–267.

Sacco R, Gabriele S, Persico AM (2015) Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. Psychiatry Res - Neuroimaging 234:239–251.

Schlerf J, Ivry RB, Diedrichsen J (2012) Encoding of Sensory Prediction Errors in the Human Cerebellum. J Neurosci 32:4913–4922.

Schmahmann JD (2004) Disorders of the Cerebellum: Ataxia, Dysmetria of Thought, and the Cerebellar Cognitive Affective Syndrome. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 16:367–378.

Schmahmann JD, Sherman JC (1998) The cerebellar cognitive affective syndrome. Brain 121:561–579.

Schmidtova E, Kelemenova S, Celec P, Ficek A, Ostatnikova D (2010) Polymorphisms in genes involved in testosterone metabolism in Slovak autistic boys. Endocrinologist 20:245–249.

Shea V (2009) Revue commentée des articles consacrés à la méthode Aba (eibi : early intensive behavioral intervention) de Lovaas, appliquée aux jeunes enfants avec autisme. Psychiatr Enfant 52:273.

Shevelkin A V., Ihenatu C, Pletnikov M V. (2014) Pre-clinical models of neurodevelopmental disorders: Focus on the cerebellum. Rev Neurosci 25:177–194.

Siuda K, Chrobak AA, Starowicz-Filip A, Tereszko A, Dudek D (2014) [Emotional disorders in patients with cerebellar damage--case studies]. Psychiatr Pol 48:289–297.

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.

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.

Strata P (2015) The Emotional Cerebellum. Cerebellum.

Supekar K, Menon V (2015) Sex differences in structural organization of motor systems and their dissociable links with repetitive/restricted behaviors in children with autism. Mol Autism 6:50.

Takarae Y, Minshew NJ, Luna B, Sweeney JA (2007) Atypical involvement of frontostriatal systems during sensorimotor control in autism. Psychiatry Res - Neuroimaging 156:117–127.

Tang X, Kim J, Zhou L, Wengert E, Zhang L, Wu Z, Carromeu C, Muotri AR, Marchetto MCN, Gage FH, Chen G (2016) KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 113:1524013113-.

Therrien AS, Bastian AJ (2015) Cerebellar damage impairs internal predictions for sensory and motor function. Curr Opin Neurobiol 344:1173–1178.

Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG (2012) Autistic-like behavior and cerebellar dysfonction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. 488:647–651.

Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner C a, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. Science 314:1788–1792.

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

Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR (2017) Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. Acta Neuropathol 134:537–566.

Voogd J (2014) What we do not know about cerebellar systems neuroscience. Front Syst Neurosci 8:1–14.

Watanabe M, Fukuda A (2015) Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. Front Cell Neurosci 9:371.

Wing L, Gould J (1979) Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: Epidemiology and classification. J Autism Dev Disord 9:11–29.

Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004) Cl- uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. J Physiol 557:829–841.

Yamasue H, Yee JR, Hurlemann R, Rilling JK, Chen FS, Meyer-Lindenberg A, Tost H (2012)

Integrative Approaches Utilizing Oxytocin to Enhance Prosocial Behavior: From Animal and Human Social Behavior to Autistic Social Dysfunction. J Neurosci 32:14109–14117a.

Zhang W, Schmelzeisen S, Parthier D, Frings S, Mohrlen F (2015) Anoctamin calcium-activated chloride channels may modulate inhibitory transmission in the cerebellar cortex. PLoS One 10:1–23.

Sébastien ROUX

Autisme et cervelet : le gradient en ions chlorures en question

Les objectifs de ma thèse ont été de caractériser le développement du gradient en ions chlorures dans les cellules de Purkinje dans un modèle d'étude de l'autisme : les souris exposées de façon prénatale au valproate de sodium. A cette fin, j'ai effectué des mesures éléctrophysiologiques de courants GABAergiques au cours du développement post-natal de ces animaux et des observations histologiques de la densité linéaire en cellules de Purkinje. D'autre part, j'ai participé à une étude comportementale visant à étudier l'influence d'un composé modulant le gradient en ions chlorures dans deux modèles génétiques d'étude de l'autisme : les souris Oprm1$^{-/-}$ et les souris Fmr1$^{-/-}$.

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence un retard du développement du gradient en ions chlorures. J'ai également montré qu'une exposition prénatale au valproate de sodium induisait une perte post-natale en cellules de Purkinje. Enfin, le composé avec lequel j'ai travaillé améliore le phénotype autistique et laisse entrevoir un fort potentiel translationnel.

Mots clés: autisme ; cervelet ; cellules de Purkinje ; GABA ; ions chlorures

The aims of my PhD were to characterize the development of the chloride gradient in Purkinje cells in a model of autism: mice prenatally exposed to sodium valproate. To this end, I measured GABAergic currents along the post-natal development of these mice and made histological observations of the Purkinje cells linear density. Secondly, I took part of a behavioral study to test the influence of a compound acting on the chloride gradient in two genetic models of autism: Oprm1$^{-/-}$ and Fmr1$^{-/-}$ mice.

During my thesis I showed a delay in the development of the chloride gradient. I also observed that a prenatal exposition of sodium valproate induced a post-natal Purkinje cells loss. Finally, the compound I worked with improves the autistic phenotype and opens the perspective for translational potential.

Key words: autism; cerebellum; Purkinje cells; GABA; chloride