HAL
open science

Etude des hypoxies périnatales : conception d'outils et effets sur le développement du cervelet chez la souris.

Sarah Leroux

To cite this version:

Sarah Leroux. Etude des hypoxies périnatales : conception d'outils et effets sur le développement du cervelet chez la souris.. Neurobiologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR100 . tel-03059707

HAL Id: tel-03059707

https://theses.hal.science/tel-03059707

Submitted on 13 Dec 2020

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Etude des hypoxies périnatales : conception d'outils et effets sur le développement du cervelet chez la Souris

Présentée et soutenue par
Sarah LEROUX

Thèse soutenue publiquement le 12 décembre 2019 devant le jury composé de		
Mme Micaela GALANTE	Maître de Conférences à l'Université Paris Sud	Rapporteur
Mme Rachel SHERRARD	Professeure à l'Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M. Arnaud CHEVALIER	Chargé de Recherche au CNRS, Université Paris-Saclay	Examinateur
Mme Marisol CORRAL-DEBRINSKI	Directrice de Recherche au CNRS, Université Pierre et Marie Curie	Examinateur
M. Stéphane MARRET	Professeur au sein du Service de pédiatrie néonatale et réanimation, CHU de Rouen Normandie	Examinateur
Mme Delphine BUREL	Maître de Conférences à l'Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Julien CHUQUET	Maître de Conférences à l'Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse

Thèse dirigée par le Dr. Delphine BUREL, laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Inserm U1239 DCZN

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Study of perinatal hypoxia: development of tools and effects on the maturation of the cerebellum in Mice

Présentée et soutenue par
Sarah LEROUX

Thèse soutenue publiquement le 12 décembre 2019 devant le jury composé de		
Mme Micaela GALANTE	Maître de Conférences à l'Université Paris Sud	Rapporteur
Mme Rachel SHERRARD	Professeure à l'Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M. Arnaud CHEVALIER	Chargé de Recherche au CNRS, Université Paris-Saclay	Examinateur
Mme Marisol CORRAL-DEBRINSKI	Directrice de Recherche au CNRS, Université Pierre et Marie Curie	Examinateur
M. Stéphane MARRET	Professeur au sein du Service de pédiatrie néonatale et réanimation, CHU de Rouen Normandie	Examinateur
Mme Delphine BUREL	Maître de Conférences à l'Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Julien CHUQUET	Maître de Conférences à l'Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse

Thèse dirigée par le Dr. Delphine BUREL, laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Inserm U1239 DCZN

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'Université de Rouen, dans le laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, INSERM U1239, dirigé par le Dr. Youssef Anouar. Je voudrais tout d'abord remercier les membres du Jury :

Le **Dr. Micaela Galante**, Maître de Conférences à l'Université Paris Sud me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je la remercie sincèrement pour l'intérêt qu'elle témoigne ainsi à nos recherches.

Le **Pr. Rachel Sherrard**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, a accepté la charge de rapporteur. Consciente de la faveur qu'elle m'accorde, je souhaite lui témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Le **Dr. Arnaud Chevalier**, Chargé de Recherche au CNRS, a bien voulu examiner ce travail. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'évaluation de ce manuscrit.

Le **Dr. Marisol Corral-Debrinski**, Directeur de Recherche au CNRS, a accepté d'examiner ce manuscrit. Je lui sais gré d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger les travaux présentés dans ce mémoire.

Le **Pr. Stéphane Marret**, Professeur au service de pédiatrie néonatale et réanimation au CHU de Rouen, a accepté de siéger dans ce jury. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour l'intérêt qu'il porte à nos recherches.

Je souhaite remercier le **Dr. Youssef Anouar**, Directeur de l'unité INSERM 1239, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir mis à disposition les moyens nécessaires au déroulement de ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement le **Dr. David Vaudry**, Chargé de Recherche à l'INSERM, de m'avoir intégrée au sein de son équipe et de nous fournir au jour le jour des bonnes conditions de travail, sur les plans à la fois technique et humain. Je le remercie pour sa disponibilité permanente et ses conseils, au cours de la rédaction de ce manuscrit et de ma thèse en général.

Je tiens à présent à remercier le **Dr. Delphine Burel** de m'avoir encadrée tout au long de ma thèse. Au cours de ces années, tu as su être toujours disponible lorsque j'avais besoin de toi, ce malgré ton emploi du temps parfois chargé, mais également m'offrir une autonomie parfaitement dosée. Merci pour la confiance que tu m'as donnée dans ce projet, et qui m'a beaucoup apporté. J'ai souvent répété que j'avais « la meilleure chef du labo » et après ces 3 ans je mesure encore la chance que j'ai eue. J'ai énormément appris grâce à toi et te remercie pour le soutien dont tu as toujours fait preuve, et sans lequel j'aurais certainement vécu ces années différemment.

Je souhaite également remercier le **Dr. Julien Chuquet** qui m'a co-encadrée au cours de cette thèse. Si des problèmes techniques ont fait que nous n'avons malheureusement pas pu mener à bien tout ce que nous avions prévu, je te remercie pour les conseils, encouragements et critiques toujours constructives que tu as m'a donnés pendant ces nombreuses années.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 2 pour leur aide et leurs conseils. **Magali**, merci pour toutes les relectures de ce manuscrit, pour ton aide, et pour ta patience quand on vient toutes les deux minutes dans ton bureau ! **Marjo**, tu es sans doute une des personnes qui a le plus égayé ma thèse, sans toi et tes anecdotes nos midis auraient été beaucoup moins joyeux. Merci pour ta bonne humeur constante, ton aide dans les manips et surtout, *surtout*, merci pour le DAPI !

Comment ne pas remercier **Catherine**, la maman du labo ? Merci pour ta bienveillance sans faille, tes encouragements, pour les cookies, ton soutien lorsqu'on arrive en pleine détresse dans ton bureau, et pour ton sourire permanent.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du service de ressources biologiques, et notamment le **Dr. Arnaud Arabo** pour son aide face à nos nombreux essais de la chambre d'hypoxie, mais aussi pour ses avis et ses conseils sur les tests comportementaux. Je remercie également **Julie** pour sa disponibilité et sa bonne humeur. Enfin, merci à **Dominique** et **David** de s'occuper au jour le jour des souris et d'être venus m'aider lorsque je faisais face à des bouteilles de gaz récalcitrantes !

En parlant de chambre d'hypoxie, je tiens bien entendu à remercier le personnel de l'Institut Universitaire de Technologie de l'Université de Rouen, et en particulier **Mr. Franck Bénard** et **Mr. François Chadelaud**, sans qui nous n'aurions jamais eu cette chambre d'hypoxie. Merci de m'avoir appris tant de choses sur les électrovannes, les résistances, les circuits de gaz et j'en passe.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe du **Pr. Pierre-Yves Renard** de nous avoir offert la possibilité de travailler sur ce projet plus qu'intéressant en nous fournissant les différentes sondes.

J'aimerais remercier l'équipe de **PRIMACEN** pour leur aide tout au long de ces années. Je remercie également l'ensemble des membres de l'unité **INSERM 1239**. Je ne peux citer tout le monde mais merci à toutes les personnes qui ont pu m'aider et contribuer à l'ambiance au sein du laboratoire.

Que serait la thèse sans les autres doctorants ? Je remercie tout d'abord mes collègues d'équipe : **Ilhem**, merci pour les 10 kg que j'ai pris à tes côtés et merci de m'avoir supporté dans le bureau pendant plus de 2 ans. **Michael**, merci de ne pas m'avoir supporté dans le bureau, mais heureusement les paquets de chips te sauvent ! **Agalic**, je compte sur toi pour reprendre ce projet que j'ai vu grandir au cours de ces nombreuses années ! **Roxane** et **Mahmoud**, qui sont dans le même bateau que moi actuellement, allez, courage, on y est presque !

J'ai également une pensée pour tous les anciens, **Pierre-Michaël**, **Ophélie**, **Benji** (préjent !), **Julie**, **Alexis**, **Auriane**, **Karima** et tous les autres pour leur bonne humeur et leur aide durant mes premières années au labo !

En parlant « d'anciens », **Audrey** et **Marion**, merci pour tous ces midis sur la terrasse, ces café-canap, les conseils sur la rédaction de thèse et les chabada !

Pour ceux qui sont encore là : **Paulo**, **Emmanuelle**, **Marie-Anne**, **Mouna**, **Saloua**, **Emilie**, … bon courage pour la suite, le labo compte sur vous pour mettre l'ambiance !

Je pense aussi au bureau Normadoc, **Laetitia**, **Edouard**, **Marc** et **Camille**, cette année d'asso avec vous aura été pleine de réunions et d'afterworks (surtout d'afterworks). **Nico**, entre l'asso et nos formations, merci d'avoir tenté de rehausser mon niveau au baby !

Je suis obligée d'avoir une pensée pour **Camille** et **Beber**, mes binômes de Master (CLIC). Je suis sûre que nos multiples heures de PowerPoint les dimanches après-midi me serviront pour ma soutenance (CLIC). Je n'oublie bien sûr pas **Erwan**, sans qui les heures passées devant le vibratome m'ont paru moins musicales pendant cette thèse.

Enfin, qu'aurait été cette thèse sans le trio infernal ? **Alex** et **Hugo**, dans la même galère du début à la fin. Les JED, le bac (c'est bon vous l'avez dans la tête ?), les congrès, Lille, le razor, et j'en passe… Alex pour avoir fait de moi une pseudo-experte Marvel, et surtout pour cette partie de Mölkky perdue, non je n'oublie pas ! Hugo, pour le soutien psychologique depuis le M2, pour les pauses café de « 5 minutes », Thierry Henry (indice : aucun rapport avec le foot), les brainstormings affiches, et je m'arrête là sinon la liste va être longue !

Je n'oublie pas les extérieurs au labo qui me suivent depuis la licence : **Mamie Pauline**, **Bournoudette** et tous ces moments qui m'ont aidée à tenir jusqu'au bout de cette thèse (avec des planches et des mozza sticks la vie est toujours plus simple !). Et merci à toi **Trutru** d'être si crue, même si tu me prends aujourd'hui pour une psychopathe !

Merci à **Morgane**, qui même à 1000 km sait tout ce que j'ai vécu tout au long de cette thèse grâce aux « 99+ messages », aux milliards de gifs et aux dénonces FM qui n'en finissent pas (mais ça ça date du GATH, oui nous sommes vieilles). Et oui, je vais ENFIN avoir le temps de regarder toute la liste de séries que j'accumule depuis 3 ans à cause de toi (sense8 here I come !).

Je remercie **mes frères**, **Jean**, **Maxime** et **Romain**, ainsi que **Lauriane** et **Alice** pour leur soutien tout au long de ma thèse. Je remercie également **Claudie** et **Robert** pour leurs encouragements et pour ces weekends en Bretagne qui auront été des bouffées d'air frais pendant ma thèse.

Maman, **Papa**, vous me connaissez, les grands discours ce n'est pas trop mon truc. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et apporté depuis toujours, pour être toujours fiers de moi quoiqu'il arrive, pour vos encouragements et tous les sacrifices que vous avez pu faire pour que j'en arrive là. Vous avez toujours cru en moi et c'est grâce à cela que j'en suis là aujourd'hui.

Enfin, merci à **Maxime** d'avoir rendu cette thèse plus facile. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir souvent redonné confiance. Merci de m'avoir supportée dans mes jours avec et mes jours sans (surtout les jours sans !), et d'avoir traversé tout cela avec moi car comme tu le dis « cette thèse, on l'a vécu à deux ».

ABSTRACT

The cerebellum is involved in major motor functions such as coordination and equilibrium. Recently, it has also been shown to play a role in cognitive abilities like language, attention or learning. At birth, the development of the cerebellar cortex in human is not completed and continues until the first postnatal months. Thereby, this structure appears to be particularly vulnerable to various perinatal injuries, such as hypoxic incidents. Perinatal hypoxia (HP) represents a common pathology responsible for neurodevelopmental disorders and is involved in 1/3 of neonatal deaths. It could be induced by different events such as looping of umbilical cord (continuous hypoxia) or apnea of prematurity (intermittent hypoxia) and affects many cerebral regions. However, its impact on the cerebellum has not been investigated in detail. Yet, a correlation between the functions controlled by the cerebellum and the deficits observed in children affected by an oxygen (O_2) deficiency at birth has been demonstrated. Taken together, these data suggest that perinatal hypoxia may lead to modifications in the cerebellar circuit organization and induce functional alterations.

Thus, this study aims to identify the effects of two types of HP on the cerebellar development; *(i)* an intermittent hypoxia (HI) consisting of 2-minute cycles of hypoxia and reoxygenation repeated over 6 hours on mice during 10 days from postnatal day 2 (P2), referring to apnea of prematurity, and *(ii)* a continuous hypoxia (HC) of 5% of O_2 during 40 minutes on P6, P12 and P21 mice, mimicking a perinatal respiratory delay.

Firstly, we studied the oxidative stress and showed that ROS production increases in P12 mice after both protocols, indicating that hypoxia affects the cerebellum. In HC, this oxidative stress is associated with a moderate increase in apoptosis without histological and behavioral consequences in the short or long term. However, IH induces a significant delay in histogenesis, leading to a decrease in the thickness of the cerebellar cortex layers. This disorganization of the cerebellum is accompanied by deficits in reflex acquisition. Our results suggest that IH may induce a long-term protective mechanism *via*, at least, an anti-apoptotic effect which compensates histological alterations from P21. However, this compensatory process is insufficient and defaults in motor coordination and cognition persist in adult mice.

In order to study more precisely hypoxia and report its effects *in vivo* in real time, we also characterized 7 probes derived from sulforhodamine-101 and sensitive to a lack of oxygen. The emission and excitation spectra obtained demonstrate that 5 of these molecules are excitable in the infrared, and can thus be detectable by two-photon microscopy. In addition, we demonstrated that they are not degraded, confirming that they are usable for *in vivo* imaging.

Thus, this work validates our two hypoxia models but shows that each type of hypoxia has specific effects on the developing cerebellum: continuous hypoxia acts in the short-term while intermittent hypoxia leads to profound structural and functional impacts. In the long term, our data aim to determine the precise mechanisms underlying the deleterious effects of HP with fluorescent dies sensitive to hypoxia, and to correlate the functional deficits observed in children who have suffered from perinatal hypoxia with cerebellum alterations to improve their health care.

RESUME ETENDU

Le cervelet est une région du système nerveux central, située à l'arrière du cerveau et impliquée dans de nombreuses fonctions motrices telles que la coordination ou encore l'équilibre. Des études plus récentes ont également permis de mettre en évidence son implication dans plusieurs fonctions cognitives comme le langage et les processus d'apprentissage. Le cervelet est constitué d'une substance blanche interne et d'une substance grise périphérique appelée cortex cérébelleux. Ce dernier est composé de 4 différentes couches cellulaires lors de la période fœtale : la couche granulaire externe (CGE) dans laquelle prolifèrent les précurseurs des cellules en grain ; la couche moléculaire constituée majoritairement les fibres de Bergmann et des arbres dendritiques des cellules de Purkinje sur lesquels se connectent les fibres parallèles ; la couche des cellules de Purkinje contenant également les corps cellulaires de la glie de Bergmann ; et la couche granulaire interne dans laquelle se différencient les neurones en grain. Le cortex embryonnaire poursuit son développement jusqu'à la période postnatale. Puis la CGE disparaît peu à peu et à l'adolescence, le cervelet mature n'est plus constitué que de 3 couches corticales.

Du fait de son immaturité à la naissance, cette structure est potentiellement vulnérable aux incidents périnataux, tels que des hypoxies. Les hypoxies périnatales peuvent être provoquées soit par un événement ponctuel (hypoxie continue = HC) correspondant par exemple à des retards de respiration spontanée ou à une compression du cordon ombilical, soit par des pathologies chroniques telles que l'apnée du prématuré (hypoxie intermittente = HI). Elles sont de fait relativement fréquentes et responsables d'un tiers des morts néonatales, mais entraînent également des déficits neurodéveloppementaux persistants à long terme. L'impact des hypoxies périnatales sur le cervelet a longtemps été mis de côté au profit du cortex cérébral ou de l'hippocampe, plus facilement accessibles par l'imagerie médicale. Cependant, de plus en plus de méta-analyses révèlent une corrélation entre les fonctions que contrôle le cervelet et les déficits observés chez les enfants ayant subi une hypoxie périnatale, suggérant que cette structure participe aux effets délétères induits lors d'un manque d'oxygénation à la naissance.

En se basant sur ces données, le premier objectif de cette thèse était de concevoir une enceinte capable de modéliser les différents types d'hypoxie observés chez l'Homme. Une collaboration avec l'Institut Universitaire de Technologie de l'Université de Rouen Normandie nous a permis de créer une chambre d'hypoxie avec un volume compatible avec les cycles d'HI, un contrôle automatisé des injections gazeuses d'azote, d'oxygène et d'air, mais aussi une surveillance en temps

réel des paramètres environnementaux tels que la température, la pression atmosphérique et l'hygrométrie.

Les premières expérimentations *in vivo* ont été réalisées sur un modèle d'hypoxie continue, consistant en une hypoxie de 40 minutes à 5 % d'oxygène chez des animaux âgés de 6, 12 ou 21 jours postnataux (P6, P12, P21). Cette étude nous a permis de démontrer qu'une hypoxie périnatale aiguë induit un stress oxydatif chez les animaux âgés de 6 et 12 jours immédiatement après l'hypoxie, accompagné d'une augmentation de l'activité enzymatique des caspases pro-apoptotiques 24 heures après la fin du protocole. Les études immunohistochimiques réalisées à P12 révèlent que l'HC cible principalement les cellules en grain différenciées car les cellules apoptotiques se situent majoritairement dans la CGI. A P21, cette activité pro-apoptotique reste plus élevée chez les souris hypoxiques que chez les animaux contrôles, malgré l'absence de marqueur de stress oxydatif. Par ailleurs, l'ensemble des altérations cellulaires induites par une HC semble être la cible de mécanismes compensatoires, puisqu'aucune altération de l'organisation structurale du cervelet n'est observée sur le long terme.

Par ailleurs, nous avons cherché à déterminer les effets d'un autre type d'hypoxie, l'apnée du prématuré (ADP), sur le développement du cervelet en se basant sur un modèle d'hypoxies intermittentes. Ainsi, des cycles de 2 minutes comprenant 20 secondes d'hypoxie à 5 % d'oxygène ont été répétés 6 heures par jour pendant 10 jours chez des animaux âgés de 2 jours postnataux. Nous avons pu observer que l'hypoxie périnatale intermittente induit, comme l'HC, un stress oxydatif au sein du cervelet. Cependant, celui-ci est cette fois associé à une réduction du volume cortical et à une désorganisation des couches du cortex cérébelleux. De plus, les souriceaux présentent un retard de croissance et des troubles développementaux dans l'acquisition de différents réflexes moteurs au cours des deux premières semaines postnatales. Il semble que des mécanismes protecteurs, incluant une diminution de la mort apoptotique, soient induits pour tenter de pallier ces déficits. En effet, les altérations histologiques observées à P12 ne sont plus significatives à P21, témoignant de la mise en place d'un processus de compensation. Ce dernier s'avère cependant insuffisant pour permettre une récupération locomotrice. En effet, à l'âge adulte, les souris présentent toujours des déficits moteurs liés à la coordination motrice, mais aussi des troubles importants de l'apprentissage spatial. Nos résultats indiquent donc que le cervelet pourrait effectivement participer aux défauts comportementaux observés à long terme chez les patients ayant souffert d'ADP au cours de la période postnatale.

Une étude plus approfondie des mécanismes cellulaires responsables de ces séquelles pourrait être envisagée grâce à l'utilisation de marqueurs *in vivo* permettant de détecter l'hypoxie en temps réel chez l'animal. Pour ce faire, nous avons étudié différentes sondes fluorescentes sensibles à l'hypoxie. Ces dernières sont en effet pourvues d'un groupement agissant comme un quencher, qui est clivé en condition hypoxique pour permettre l'émission d'une fluorescence proportionnelle à la carence en oxygène. De plus, ces sondes ont été développées à partir de la sulforhodamine-101 (SR101). Cette molécule représente le marqueur le plus couramment utilisé en imagerie biphotonique car il n'est pas toxique *in vivo* et permet d'observer par contraste les astrocytes et les neurones au sein d'un tissu. Nous avons tout d'abord utilisé la SR101 en tant que contrôle afin de mettre au point un protocole d'anesthésie et de chirurgie compatible avec la microscopie biphotonique du cervelet d'un souriceau. Après optimisation, nos premières images démontrent qu'il est possible de distinguer différents types cellulaires tels que les cellules en grain, les cellules de Purkinje ou les cellules de Bergmann *in vivo* à P10 et P21. Cependant, l'utilisation des sondes en microscopie biphotonique implique de réaliser leur caractérisation spectrale afin de s'assurer qu'elles sont excitables et détectables dans le domaine de l'infrarouge. Grâce aux différents profils d'excitation et d'émission, nous avons ainsi éliminé deux sondes inutilisables en imagerie biphotonique, alors que les 5 autres ont des caractéristiques proches de la SR101 et sont stables au cours du temps. Elles pourront donc à terme être utilisées *in vivo* pour l'étude en temps réel des mécanismes cellulaires liés à l'hypoxie.

À terme, les données concernant l'impact d'une hypoxie périnatale sur les mécanismes cellulaires au sein du cervelet seront comparées avec la physiopathologie des enfants prématurés afin d'apporter quelques éléments de réponse quant aux conséquences neurodéveloppementales de l'ADP et d'améliorer la prise en charge de l'enfant prématuré.

Mots clés : cervelet, développement, hypoxie, périnatal, apnée du prématuré, chambre d'hypoxie, histologie, apoptose, stress oxydatif, comportement, sondes fluorescentes

Keywords: cerebellum, development, hypoxia, perinatal, apnea of prematurity, hypoxia chamber, histology, apoptosis, oxidative stress, behavior, fluorescent probes

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations **17**

Liste des figures & des tables **21**

Introduction **25**

Chapitre I : Le cervelet **27**

1. Organisation structurelle du cervelet 27
   1.1 Présentation générale 27
   1.2 Le cortex cérébelleux 30
      1.2.1 La couche granulaire 30
      1.2.2 La couche des cellules de Purkinje 32
      1.2.3 La couche moléculaire 34
   1.3 Les noyaux profonds 36
   1.4 La substance blanche 37
   1.5 L'organisation intracorticale 39
2. Organisation fonctionnelle du cervelet 43
   2.1 Les fonctions motrices 43
      2.1.1 Le spinocervelet 43
      2.1.2 Le corticocervelet 45
      2.1.3 Le vestibulocervelet 46
   2.2 Les fonctions non motrices 48
      2.2.1 Mise en évidence des fonctions non motrices 48
      2.2.2 Cervelet & fonctions exécutives 48
      2.2.3 Cervelet & fonctions spatiotemporelles 49
      2.2.4 Cervelet & langage 50
      2.2.5 Cervelet, mémoire & apprentissage 50
      2.2.6 Cervelet & émotions 51
      2.2.7 Cervelet & douleur 52
      2.2.8 Topographie des fonctions cognitives cérébelleuses 52
3. Développement du cervelet 54
   3.1 Ontogenèse générale 54
   3.2 Développement des cellules de Purkinje 57
   3.3 Développement des cellules en grain 58

3.4 Développement des interneurones 60
Chapitre II : L'hypoxie 61
1. Définition & généralités 61
2. Les réponses cellulaires à l'hypoxie 62
2.1 Les réponses systémiques 62
2.2 Les réponses cérébrales 65
2.2.1 Effets sur le métabolisme 65
2.2.2 Excitotoxicité & morts cellulaires 67
2.2.3 Stress oxydatif 69
2.2.4 Transmission synaptique 70
2.2.5 Modifications transcriptionnelles 72
2.2.6 Neuroinflammation 75
3. L'hypoxie périnatale 76
3.1 Les conséquences de l'hypoxie pendant le développement 76
3.2 L'apnée du prématuré 77
3.2.1 Définition & épidémiologie 77
3.2.2 Pathophysiologie de l'ADP 78
3.2.3 Les conséquences cérébrales à court & long termes 81
3.2.4 Les traitements de l'ADP 82
4. Techniques d'imagerie de l'hypoxie 84
Objectifs 89
Matériels et méthodes 93
Résultats 105
Partie I – Validation technique et *in vivo* de la chambre d'hypoxie 107
1. Description générale de la chambre d'hypoxie 107
2. Validation technique de la chambre d'hypoxie 108
3. Validation physiologique de la chambre d'hypoxie : Effet d'une hypoxie périnatale aiguë sur le cervelet au cours du développement 110
Partie II – Effets de l'apnée du prématuré sur le développement du cervelet : étude d'un modèle d'hypoxie périnatale intermittente chez la Souris 117
Partie III – Caractérisation de sondes fluorescentes pour l'étude de l'hypoxie *in vivo* en temps réel 143
1. Caractérisation spectrale des différentes sondes 143
2. Imagerie intravitale du cortex cérébelleux en développement 146

Discussion **149**

Partie I – Effets différentiels de différentes hypoxies périnatales sur le développement du cervelet **151**

1. Développement de la chambre d'hypoxie 151
2. Effets d'une hypoxie périnatale aiguë sur le développement 153
3. Effets de l'hypoxie intermittente sur le cervelet : modèle murin d'ADP 154

Partie II – Sélection de sondes fluorescentes pour l'étude de l'hypoxie *in vivo* en temps réel **157**

Conclusion & Perspectives **158**

Références bibliographiques **158**

LISTE DES ABREVIATIONS

$^{\cdot}OH$	Hydroxyle
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Apnée du prématuré
AIF	*Apoptosis inducing factor*
AMPA	*Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
ARNm	Acide ribonucléique messager
Atoh1	*Atonal homolog 1*
ATP	Adénosine triphosphoate
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
BDNF	*Brain-derived neurotrophic factor*
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BOLD	*Blood-oxygen-level dependant*
BNIP3	*Bcl2 interacting protein 3*
BrdU	Bromodésoxyuridine
Ca^{2+}	Calcium
CaMKII	Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante II
CAT	Catalase
CBP	*CREB-binding protein*
CG	Couche granulaire
CGE	Couche granulaire externe
CGI	Couche granulaire interne
CM	Couche moléculaire
CO_2	Dioxyde de carbone
CP	Couche des cellules de Purkinje
CR3	Récepteur au complément 3
DAM	*Donkey anti-mouse*
DAMPs	*Damage-associated molecular patterns*

DAPI	4’,6’-diamidino-2-phénylindole
DCF	*2’,7’-dichlorofluorescein*
DCFDA	*2’,7’-dichlorofluorescein diacetate*
DAR	*Donkey anti-rabbit*
DAS	*Donkey anti-sheep*
DMEM	*Dulbecco’s modified Eagle medium*
Egf	*Epidermal growth factor*
eIF4E	*Eukaryotic translation initiation factor 4E*
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
ENT1	*Equilibrative nucleoside transporter 1*
EX	Jour embryonnaire X
Fgf8	*Fibroblast growth factor 8*
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GFAP	*Glial fibrillary acidic protein*
GLAST-1	*Glutamate aspartate transporter 1*
GLT-1	*Glutamate transporter 1*
GluR1	*Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1*
GLUT	Transporteur de glucose
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
H_2O	Eau
H_2O_2	Peroxyde d’hydrogène
HC	Hypoxie continue
HI	Hypoxie intermittente
HIF	*Hypoxia inducible factor*
HP	Hypoxie périnatale
HRE	*Hypoxia response element*
IκBα	*Nuclear factor-kappa B inhibitor alpha*
IKK	*IκB kinase*
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IRM	Imagerie par résonnance magnétique

K^+	Potassium
LR	Lèvre rhombique
LTD	*Long term depression*
LTP	*Long term potentiation*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MAR	Mono-azo rhodamine
MDA	Malondialdéhyde
mGluR	Récepteur métabotropique du glutamate
MLC-P	*Phosphorylated myosin light chain*
MLCK	*Myosin light chain kinase*
mtNOS	Oxyde nitrique synthase mitochondriale
mTORC1	*Mechanistic target of rapamycin complex 1*
MyD88	*Myeloid differentiation primary response 88*
Na^+	Sodium
NC	Normoxie continue
NDS	*Normal donkey serum*
NF-κB	*Nuclear factor-kappa B*
NI	Normoxie intermittente
NMDA	*N*-méthyl-D-aspartate
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NO^{2-}	Nitrite
NO^{3-}	Nitrate
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOX	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
O_2	Dioxygène
$O_2^{\cdot -}$	Radical superoxyde
$ONOO^-$	Ion peroxynitrite
Pa	Pression partielle
PAX	*Paired box*
PBS	*Phosphate buffer saline*
PDGF	*Pplatelet-derived-growth-factor*

PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPn	Pression expiratoire positive par voie nasale
PFA	Paraformaldéhyde
PFK-1	Phosphofructokinase-1
PFK-2	Phosphofructokinase-2
PHD	Prolyl-hydroxylase
PI3K-III	*Class III phosphatidylinositol 3-kinase*
PKA	Protéine kinase A
Ptf1α	*Pancreas associated transcription factor 1 alpha*
Pvs	Paravermis
PX	Jour postnatal X
RNS	Espèces réactives de l'azote
RORα	*Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor alpha*
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDF-1α	*Stromal cell-derived factor 1 alpha*
SG	Semaine de gestation
Shh	*Sonic hedgehog*
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
SR101	Sulforhodamine-101
SST	Somatostatine
TAK1	*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*
TEP	Tomographie par émission de positons
TLR4	*Toll like receptor 4*
TNFα	*Tumor necrosis factor alpha*
TrkB	*Tropomyosin receptor kinase B*
Ub	*Ubiquitine*
ULK	*Uncoordinated-51-like autophagy activating kinase*
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VHL	Von Hippel-Lindau
XO	Xanthine oxydase
ZV	Zone ventriculaire

LISTE DES FIGURES & DES TABLES

Figure 1 ◆ Anatomie générale du cervelet chez l'Homme....27

Figure 2 ◆ Organisation interne du cervelet chez l'Homme....28

Figure 3 ◆ Vascularisation artérielle du cervelet....29

Figure 4 ◆ Vascularisation veineuse du cervelet....30

Figure 5 ◆ Représentation schématique des cellules de la couche granulaire du cervelet....31

Figure 6 ◆ Représentation schématique des cellules de la couche des cellules de Purkinje....33

Figure 7 ◆ Représentation schématique des interneurones de la couche moléculaire et de leurs connexions avec les cellules de Purkinje....35

Figure 8 ◆ Représentation schématique des noyaux profonds du cervelet chez l'Homme en coupe horizontale.....37

Figure 9 ◆ Représentation schématique des réseaux neuronaux au sein du cortex cérébelleux....40

Figure 10 ◆ Représentation schématique des boucles anatomo-fonctionnelles du spinocervelet médian (A) et intermédiaire (B)....44

Figure 11 ◆ Représentation schématique des boucles anatomo-fonctionnelles du corticocervelet....46

Figure 12 ◆ Représentation schématique des boucles anatomo-fonctionnelles du vestibulocervelet 47

Figure 13 ◆ Représentation schématique des vésicules cérébrales primitives (A) et secondaires (B) au stade embryonnaire....54

Figure 14 ◆ Représentation schématique des zones germinatives....55

Figure 15 ◆ Représentation de la croissance du cervelet de la 13ème semaine de gestation à la naissance chez l'Homme....56

Figure 16 ◆ Représentation schématique de la maturation des cellules en grain....59

Figure 17 ◆ Représentation schématique d'une hypoxie continue (A) et d'une hypoxie intermittente (B)....61

Figure 18 ◆ Représentation des mécanismes de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique....63

Figure 19 ◆ Représentation des mécanismes de réponse des chémorécepteurs périphériques....64

Figure 20 ◆ Représentation de la cascade glycolytique induite en hypoxie....66

Figure 21 ◆ Représentation des cascades nécrotiques et apoptotiques....68

Figure 22 ◆ Représentation schématique des cascades déclenchées par la fixation de l'adénosine sur ses récepteurs A_1 (A) et A_{2A} (B) en hypoxie....71

Figure 23 ◆ Représentation schématique de la régulation du facteur de transcription HIF-1α en normoxie et en hypoxie....73

Figure 24 ◆ Représentation schématique de la régulation du facteur de transcription NF-κB en hypoxie....74

Figure 25 ◆ Illustrations de techniques d'imagerie de l'hypoxie....85

Figure 26 ◆ Mécanisme de clivage de la sonde MAR (A) et illustration de la fluorescence émise en hypoxie (B) 86

Figure 27 ◆ Structure de la sonde PtP-C343 et de son excitation menant à l'émission de fluorescence par le cœur de la molécule 87

Figure 28 ◆ Structure de la sulforhodamine-101 (A) et mécanisme de clivage de la SR101-NaphtNH$_2$-Hyp-X en hypoxie (B) 88

Figure 29 ◆ Images comparatives de la fluorescence émise par la SR101-NaphtNH$_2$-Hyp-diMe et de la MASR en normoxie et en hypoxie 88

Table 1 ◆ Tableau récapitulatif des marqueurs immunohistochimiques utilisés 97

Figure 30 ◆ Frise chronologique récapitulative des études comportementales réalisées chez la souris en développement et adulte 98

Figure 31 ◆ Illustration du protocole du test de réflexe de retournement chez le souriceau 99

Figure 32 ◆ Illustration du protocole du test de réflexe d'agrippement chez le souriceau 99

Figure 33 ◆ Illustration du test du labyrinthe en croix surélevé 100

Figure 34 ◆ Illustration du test du labyrinthe aquatique de Morris 101

Figure 35 ◆ Photographie de la chambre d'hypoxie conçue au sein de l'Université de Rouen Normandie 107

Figure 36 ◆ Représentation schématique de la chambre d'hypoxie et de ses différents composants 108

Figure 37 ◆ Représentation d'une hypoxie continue (A) et des cycles d'hypoxie intermittente (B)...108

Figure 38 ◆ Evolution de la température (A) et de la pression atmosphérique (B) en fonction du temps au cours des cycles d'hypoxie....109

Figure 39 ◆ Evolution du taux d'humidité et du niveau d'oxygène en fonction du temps au cours des cycles d'hypoxie intermittente 109

Figure 40 ◆ Evolution de la puissance acoustique et du niveau d'oxygène en fonction du temps au cours des cycles d'hypoxie intermittente 110

Figure 41 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la survie des souris en fonction de leur âge 111

Figure 42 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la masse corporelle des souris 111

Figure 43 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la production d'espèces réactives de l'oxygène dans le cervelet 112

Figure 44 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur l'activité enzymatique des caspases-3/7 dans le cervelet 113

Figure 45 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la densité de cellules apoptotiques dans le cervelet de souris 114

Figure 46 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur l'organisation histologique du cervelet de souris....113

Figure 47 ◆ Structure de la sulforhodamine-101 et de ses dérivés clivés fluorescents 143

Figure 48 ◆ Profils d'excitation de la SR101 et de ses dérivés dans le domaine de l'infrarouge entre 720 et 1040 nm 144

Figure 49 ◆ Profils d'émission de la SR101 et de ses dérivés dans le domaine du visible à une longueur d'excitation de 815 nm 144

Figure 50 ◆ Etude de dégradation de la SR101 et de ses dérivés au cours du temps 145

Figure 51 ◆ Représentation du cortex cérébelleux de souris observé en temps réel en microscopie biphotonique 147

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE CERVELET

1. ORGANISATION STRUCTURELLE DU CERVELET

1.1 PRESENTATION GENERALE

Le cervelet est une structure impaire du système nerveux central (SNC), située au sein de la fosse crânienne postérieure, en arrière du tronc cérébral. Il se localise sous les hémisphères cérébraux dont il est séparé par la tente du cervelet, un épais repli de dure-mère. Les deux autres méninges le recouvrant, l'arachnoïde et la pie-mère, sont séparées par un espace sous-arachnoïdien. Ce dernier forme de larges cavités appelées citernes, au sein desquelles circule le liquide céphalo-rachidien.

Le cervelet présente une structure hautement repliée et organisée en différentes subdivisions, à savoir les lobes, lobules, lames et lamelles. En effet, il se compose de 3 lobes délimités par 2 fissures dans l'axe antéropostérieur : la fissure primaire, qui départage le lobe antérieur et le lobe postérieur, et la fissure postéro-latérale qui sépare les lobes postérieur et flocculo-nodulaire (Figure 1A). Ces 3 lobes peuvent eux-mêmes être segmentés par d'autres fissures en différents lobules : les lobules I à V localisés au sein du lobe antérieur, les lobules VI à IX dans le lobe postérieur, et le lobule X constituant à lui seul le lobe flocculo-nodulaire (Figure 1A) (Larsell, 1952). Enfin, ces lobules sont divisés en lames et lamelles par plusieurs sillons.

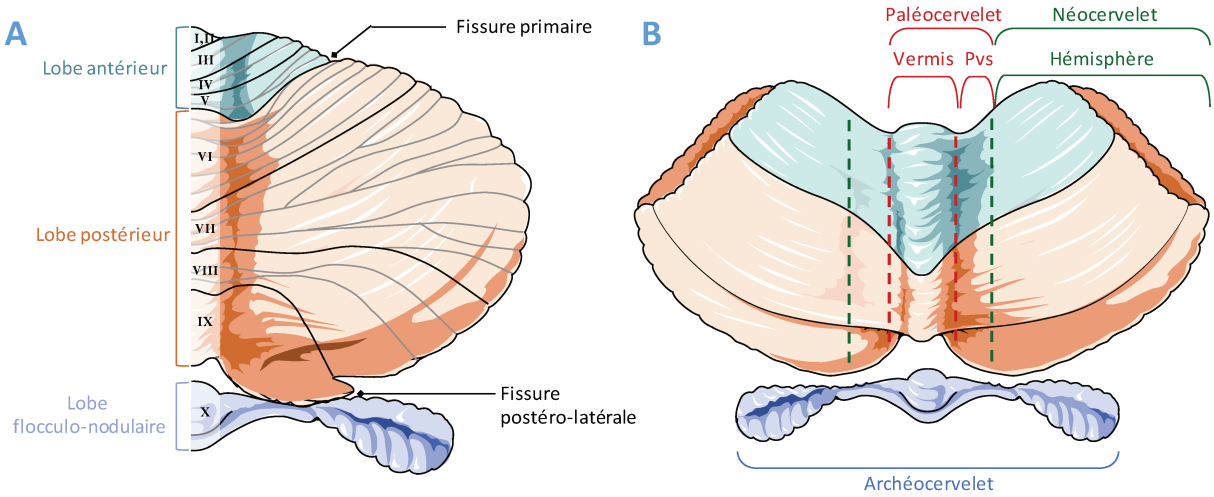


Figure 1 ◆ Anatomie générale du cervelet chez l'Homme. (A) Représentation du cervelet déroulé indiquant ses divisions anatomiques selon l'axe antéro-postérieur. **(B)** Vue dorsale du cervelet présentant ses divisions fonctionnelles selon l'axe médio-latéral.
I à X = numérotation des 10 lobules cérébelleux ; Pvs = paravermis.

Par ailleurs, le cervelet est organisé en deux hémisphères reliés par une partie centrale étroite, le vermis, lui-même entouré de part et d'autre par le paravermis. Toutes ces divisions anatomiques corrèlent avec les divisions évolutives. Ainsi le lobe flocculo-nodulaire correspond à l'archéocervelet retrouvé tout d'abord chez les poissons, le vermis constitue le paléocervelet apparu chez les reptiles et les oiseaux, et les hémisphères cérébelleux forment le néocervelet présent uniquement chez les mammifères (Figure 1B) (Larsell, 1937). A l'instar du cerveau, le cervelet comprend une substance blanche interne au sein de laquelle sont inclues 4 paires de noyaux profonds : les noyaux fastigiaux, dentelés et interposés (globuleux et emboliforme) (Nieuwenhuys et al., 2008). Ce tissu est également composé des différentes fibres afférentes et efférentes, qui sont reliées à d'autres structures du SNC par l'intermédiaire des pédoncules cérébelleux. Ces derniers sont au nombre de six, à savoir trois paires symétriques appelées pédoncules supérieurs, moyens et inférieurs, qui rejoignent respectivement le mésencéphale, le pont et le bulbe rachidien (Figure 2) (Ruigrok et al., 2015). Au sein du cervelet, ces fibres permettent d'établir une connexion avec une substance grise périphérique appelée cortex cérébelleux (Figure 2) (cf. Chapitre I.1.2).

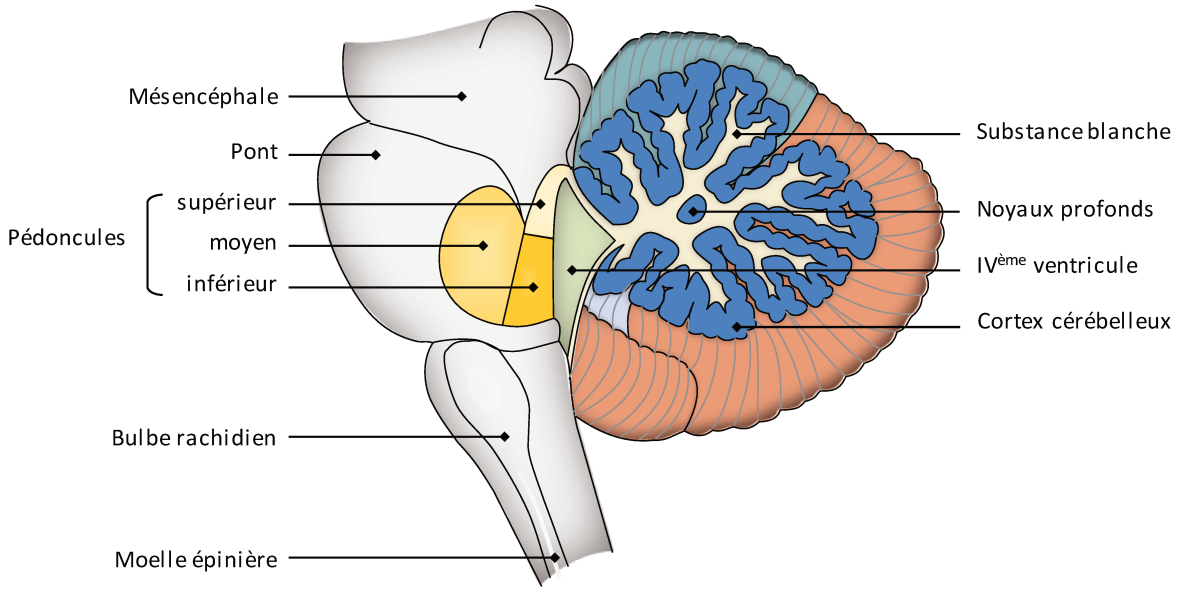


Figure 2 ◆ Organisation interne du cervelet chez l'Homme. Représentation du cervelet et du tronc cérébral en coupe sagittale.

La vascularisation du cervelet est assurée par 3 artères : les artères supérieure et antéro-inférieure qui sont issues du tronc basilaire, et l'artère postéro-inférieure provenant de l'artère vertébrale (Figure 3A,B) (Naidich et al., 2009). L'artère cérébelleuse supérieure se divise en deux branches, médiale et latérale, qui irriguent respectivement les zones supérieures du vermis et des hémisphères cérébelleux. La branche médiale rejoint également les pédoncules supérieurs et les noyaux profonds. L'artère cérébelleuse antéro-inférieure vascularise quant à elle les pédoncules

moyens, le flocule et la face hémisphérique située sous la fissure horizontale. Enfin, l'artère postéro-inférieure irrigue le pédoncule inférieur et la partie caudale du cervelet. En effet, tout comme l'artère supérieure, elle se divise en deux branches médiale et latérale pour irriguer les régions inférieures du vermis et des hémisphères cérébelleux. La branche latérale fournit également un apport sanguin secondaire aux noyaux profonds du cervelet (Savoiardo et al., 1987; Naidich et al., 2009).

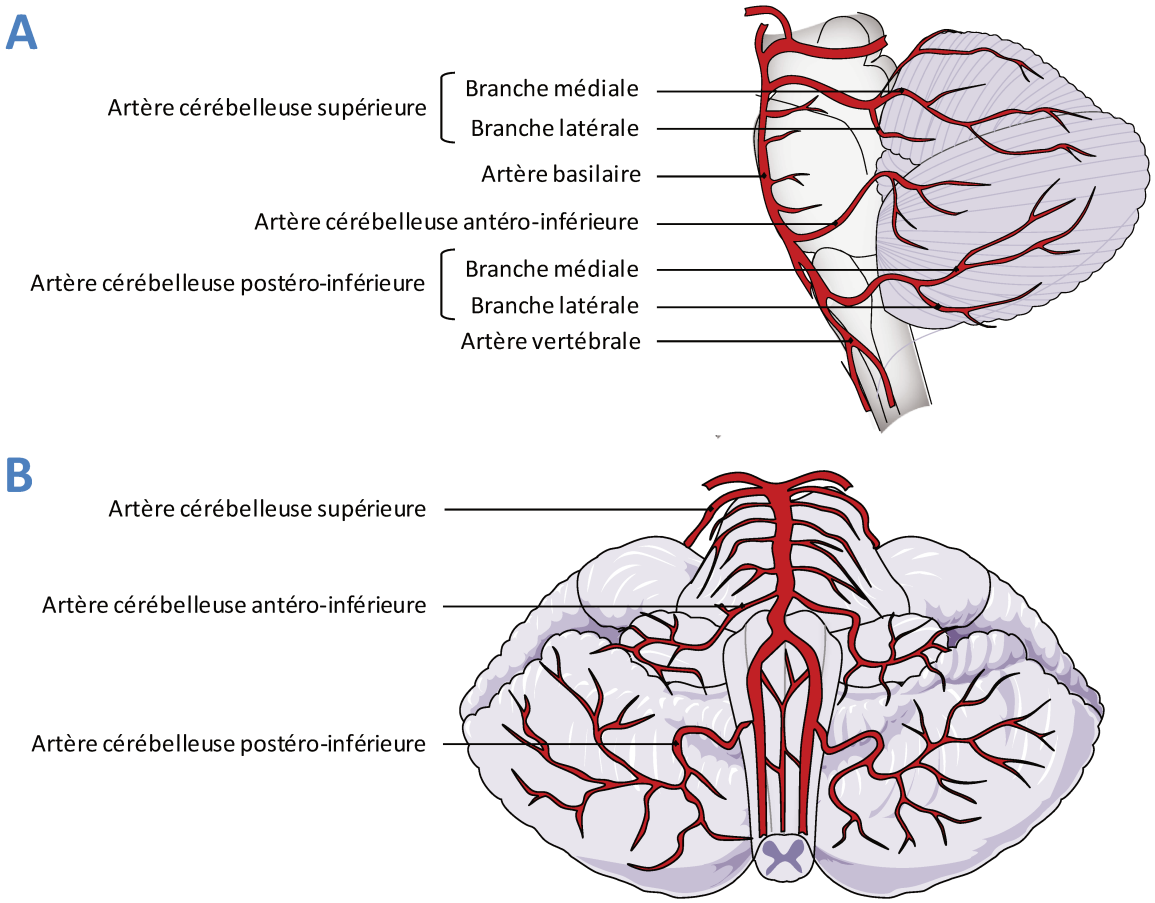


Figure 3 ◆ Vascularisation artérielle du cervelet. Représentation des artères cérébelleuses en vue sagittale **(A)** et ventrale **(B)**.

Le drainage du cervelet est assuré par trois systèmes veineux recouvrant respectivement les surfaces supérieure, inférieure et antérieure du cervelet (Figure 4) (Naidich et al., 2009). Les régions supérieure et inférieure du cervelet sont drainées par des veines dites vermiennes et hémisphériques : les veines vermiennes supérieures rejoignent la veine de Galien qui se déverse dans le sinus droit ; les veines hémisphériques supérieures se dirigent vers la tente du cervelet jusqu'aux sinus pétreux supérieurs et transverses ; et les veines recouvrant la partie inférieure du cervelet rejoignent le confluent des sinus et le sinus transverse. Enfin, les veines de la partie antérieure du cervelet drainent le sang jusqu'à la veine cérébelleuse antérieure. Cette dernière est située au sein de la grande fissure horizontale et converge vers le sinus pétreux supérieur (Rhoton, 2000).

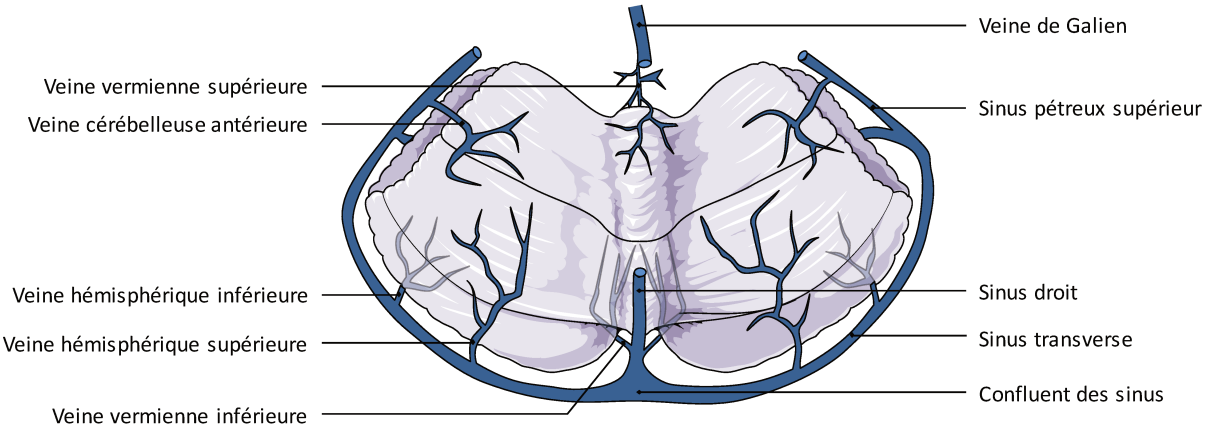


Figure 4 ◆ Vascularisation veineuse du cervelet. Représentation des veines du cervelet en vue supérieure.

1.2 LE CORTEX CEREBELLEUX

Le cortex cérébelleux possède une organisation similaire quels que soient les lobules ou régions qu'il contrôle, et cette cytoarchitecture est conservée chez l'ensemble des mammifères. Ainsi, le cortex cérébelleux adulte est divisé en trois couches cellulaires distinctes : la couche moléculaire (CM) en surface, la couche intermédiaire des cellules de Purkinje (CP) et la couche granulaire (CG) au contact de la substance blanche interne.

1.2.1 LA COUCHE GRANULAIRE

La CG représente la couche la plus interne du cortex cérébelleux. Elle est majoritairement composée des cellules en grain qui, au nombre de 50 milliards, représentent plus de la moitié de la population neuronale cérébrale chez l'Homme (Diedrichsen et al., 2019). De petite taille, environ 5 à 8 µm de diamètre, ces neurones glutamatergiques reçoivent des signaux excitateurs des fibres moussues par l'intermédiaire de 3 à 5 dendrites courtes, localisées au sein d'un glomérule (Figure 5 ; Lackey et al., 2018). Ces entrées excitatrices sont contrebalancées par des inhibitions provenant des cellules de Golgi, dont les axones représentent le troisième constituant du glomérule (Figure 5). Cette structure tripartite est entourée d'une capsule gliale formée par un astrocyte velate, dont le rôle n'est pas encore établi (Chan-Palay and Palay, 1972a). Une fois le signal intégré au sein de la cellule en grain, il est propagé le long de son axone qui remonte perpendiculairement jusque dans la CM. Là, il se divise en deux ramifications perpendiculaires à la surface du cortex cérébelleux qui peuvent mesurer jusqu'à 3 mm de longueur (Figure 5 ; Pichitpornchai et al., 1994; Shepherd, 2004). Ces axones, fins et non myélinisés, sont appelés fibres parallèles et se connectent aux cellules de Purkinje, aux interneurones de la CM et aux dendrites apicales des cellules de Golgi (Pellionisz and Szenta´gothai, 1973; Ekerot et al., 1991; Pichitpornchai et al., 1994).

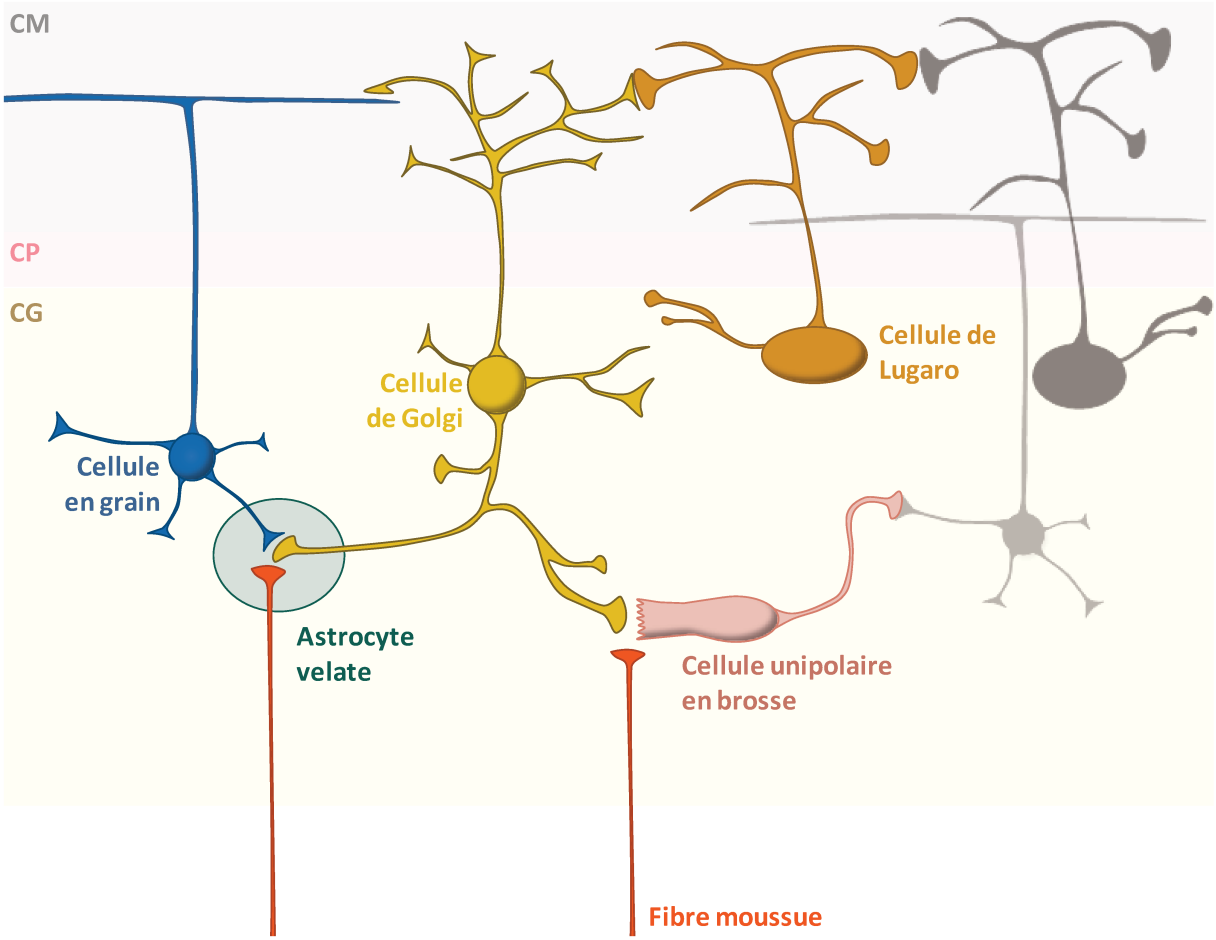


Figure 5 ◆ Représentation schématique des cellules de la couche granulaire du cervelet. CG : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje.

Les cellules de Golgi sont les principaux interneurones inhibiteurs de la CG (Figure 5). Elles peuvent exprimer deux types de neurotransmetteurs, à savoir l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine, et leurs axones se développent de façon dense dans la CG jusqu'aux glomérules où ils se connectent aux cellules en grain (Chan-Palay and Palay, 1972b; Ottersen et al., 1987). De plus, si leurs dendrites apicales remontent dans la CM pour se connecter aux fibres parallèles, elles possèdent également des dendrites baso-latérales qui se développent dans la CG et forment des contacts synaptiques avec les fibres moussues. Les cellules de Golgi reçoivent aussi des afférences en provenance des cellules de Lugaro, des cellules en panier et des cellules étoilées (Dieudonné and Dumoulin, 2000; Dumoulin et al., 2001). Il a également été montré que les cellules de Golgi communiquent entre elles *via* des synapses électriques (Dugué et al., 2009). Ces *gap junctions* sont majoritairement localisées sur les dendrites apicales et leur permettent d'exercer une inhibition rythmique sur les cellules en grain (Vervaeke et al., 2010).

Au sein de la CG, on retrouve également les cellules de Lugaro, qui représentent près d'un tiers des interneurones inhibiteurs de cette couche. Ces cellules fusiformes sont situées dans la

partie supérieure de la couche corticale, près des cellules de Purkinje (Figure 5). Normalement silencieux, ces interneurones sont activés par la sérotonine provenant notamment de la formation réticulée, et exercent leur action inhibitrice par l'intermédiaire de deux types d'axones : un premier plexus axonal entre en contact avec les interneurones de la CM dans le plan parasagittal (Lainé and Axelrad, 1998), tandis que le second, transverse et dense, s'étend jusque dans la CM afin de relier les cellules de Lugaro aux dendrites apicales des cellules de Golgi (Dieudonné and Dumoulin, 2000; Dumoulin et al., 2001). De plus, des études montrent que les axones des cellules de Lugaro entrent également en contact avec les cellules de Purkinje (Dean et al., 2003).

Le dernier type neuronal de la CG correspond aux cellules unipolaires en brosse (Figure 5). Ce sont les seuls interneurones excitateurs du cortex et l'unique type cellulaire à ne pas être distribué de façon homogène au sein de la structure, puisqu'elles ne sont présentes qu'au sein des lobules IX et X du cervelet (Mugnaini and Floris, 1994). Elles doivent leur nom à leur unique dendrite, dont la terminaison a l'apparence d'une brosse ou d'un pinceau, et possèdent un axone qui se prolonge dans la CG et plus rarement dans la substance blanche, afin de former une synapse avec les cellules en grain avoisinantes (Figure 5 ; Diño et al., 2000). Ces cellules unipolaires en brosse sont innervées par une unique fibre moussue (Mugnaini et al., 1994), et reçoivent également des signaux inhibiteurs par l'intermédiaire des cellules de Golgi (Dugué et al., 2005; Mugnaini et al., 2011).

1.2.2 LA COUCHE DES CELLULES DE PURKINJE

Située au-dessus de la CG, la CP est constituée d'une assise monocellulaire de cellules de Purkinje présentant des somas piriformes et une arborisation dendritique dense qui se prolonge dans la CM en suivant un axe parasagittal (Figure 6). A l'origine de cette arborisation, un unique tronc dendritique, appelé dendrite primaire, se développe depuis le pôle apical de la cellule. Il donne naissance à des dendrites secondaires, qui se ramifient elles-mêmes pour former de multiples dendrites tertiaires. Ces dernières sont pourvues d'épines dendritiques se connectant à une multitude de fibres parallèles (Herndon, 1963). En effet, chaque arbre dendritique est traversé par des milliers de fibres parallèles, aboutissant à plus de 175 000 contacts synaptiques (Napper and Harvey, 1988). Par ailleurs, chaque cellule de Purkinje est également reliée à une fibre grimpante, qui s'enroule autour de l'arbre dendritique en formant ainsi de nombreuses connections (Figure 6).

Les cellules de Purkinje, véritable centre d'intégration des différentes afférences, constituent la seule efférence du cortex cérébelleux. Ces neurones inhibiteurs sont de grande taille, avec un corps cellulaire d'environ 20 µm de diamètre chez la Souris, et émettent un axone se prolongeant jusque dans les noyaux cérébelleux (Ito et al., 1964). Celui-ci peut donner naissance à différentes

collatérales qui bifurquent de nombreuses fois, afin de former des plexus axonaux au sein des couches moléculaire et granulaire. Nous pouvons ainsi observer le plexus collatéral récurrent dans la CG, qui se connecte aux cellules de Golgi ; le plexus infra-ganglionnaire qui entre en contact avec les cellules de Purkinje voisines et les cellules de Lugaro ; et enfin, le plexus supra-ganglionnaire qui crée, quant à lui, des synapses avec les cellules de Purkinje et les interneurones en panier (Chan-Palay, 1971).

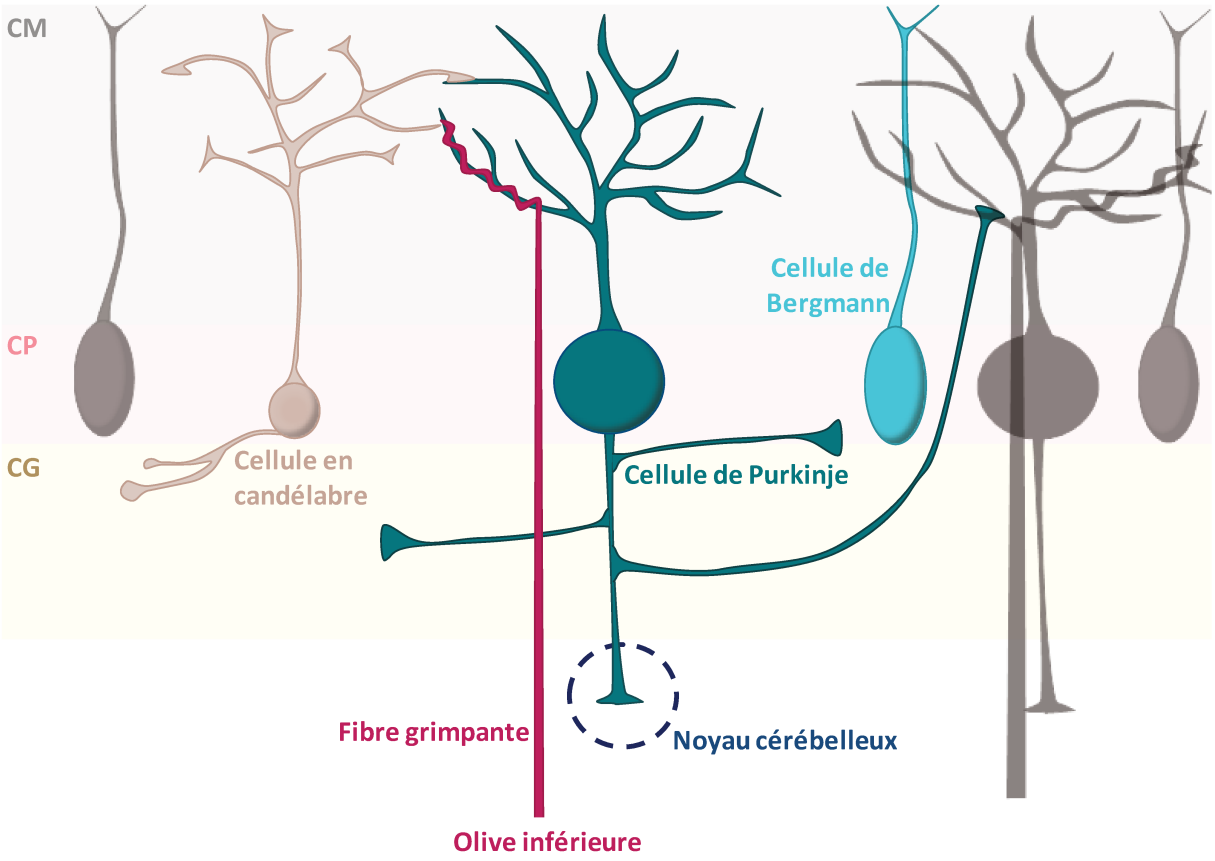


Figure 6 ◆ Représentation schématique des cellules de la couche des cellules de Purkinje. CG : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje.

Par ailleurs, la CP contient des cellules en candélabre représentant le dernier type de neurones découvert au sein du cortex cérébelleux (Lainé and Axelrad, 1994). Ces interneurones inhibiteurs possèdent un corps cellulaire piriforme de petite taille, orienté verticalement entre les cellules de Purkinje (Figure 6). Une à deux dendrites épaisses émergent de ce soma et pénètrent de façon verticale dans la CM, où elles émettent quelques ramifications pouvant atteindre la pie-mère. Des dendrites plus petites prennent également naissance, soit à l'autre pôle du soma, soit à la base des dendrites principales, et projettent dans la CG de façon horizontale (Schilling et al., 2008). L'axone des cellules en candélabre se propage quant à lui horizontalement dans la CP en émettant une multitude de branches remontant ensuite dans la CM (Figure 6). A ce jour, le rôle des cellules en

candélabre dans le réseau neuronal cérébelleux reste inconnu, de même que ses afférences et la cible de ses efférences. Malgré tout, la localisation de leurs projections axonales laisse supposer que ces interneurones établiraient des connexions synaptiques avec les dendrites des cellules de Purkinje (Sudarov et al., 2011).

Enfin, les cellules gliales de Bergmann s'intercalent entre les cellules de Purkinje et émettent des prolongements qui s'étendent dans la CM pour atteindre la surface piale ou des vaisseaux sanguins (Figure 6 ; Hanke and Reichenbach, 1987). Ces cellules unipolaires, dérivées de la glie radiaire, sont qualifiées d'astrocytes spécialisés et forment une gaine recouvrant l'ensemble des cellules de Purkinje. Elles sont impliquées dans la recapture des neurotransmetteurs *via* les récepteurs *glutamate aspartate transporter 1* (GLAST-1) et *glutamate transporter 1* (GLT-1) (Chaudhry et al., 1995), ainsi que dans la formation et l'élimination de synapses (cf. Chapitre I.1.5). Elles servent également de support énergétique pour les cellules de Purkinje, grâce à leur faculté de métabolisation du glucose, et de support physique pour les cellules en grain lors de la mise en place de la CG au cours du développement cérébelleux (cf. Chapitre I.3). Enfin, des études plus récentes suggèrent que ces astrocytes joueraient un rôle de cellules souches neurales (Sottile et al., 2006).

1.2.3 LA COUCHE MOLECULAIRE

La CM est majoritairement composée de fibres nerveuses, telles que les fibres grimpantes en provenance de l'olive inférieure, les dendrites des cellules de Purkinje et de Golgi, les prolongements des cellules gliales de Bergmann et les fibres parallèles. De ce fait, la CM ne comporte que deux types de corps cellulaires, à savoir les cellules en panier et les cellules étoilées.

Ces deux populations d'interneurones GABAergiques se distinguent selon leur morphologie et leur localisation au sein de la couche. Ainsi, les cellules en panier présentent un large soma pouvant mesurer jusqu'à 20 µm de diamètre et sont situées dans le tiers inférieur de la CM (Figure 7). Elles présentent des dendrites peu ramifiées et distribuées radialement dans la CM selon un axe parasagittal. Les dendrites ascendantes peuvent s'étendre sur toute la hauteur de la CM, tandis que les dendrites descendantes sont plus courtes et moins nombreuses (Lemkey-Johnston and Larramendi, 1968). De plus, des épines dendritiques sont présentes sur toute la longueur de l'arbre dendritique, mais aussi, bien que plus rarement, sur le corps cellulaire. L'axone d'une cellule en panier s'étend jusque dans la CP et émet des collatérales qui s'enroulent autour des somas des cellules de Purkinje en formant un réseau similaire à un panier, dont les cellules tirent leur nom.

Les cellules étoilées se situent quant à elles dans les deux tiers supérieurs de la CM (Figure 7). Les plus externes ont un diamètre compris entre 5 et 9 µm et quelques dendrites radiales, tandis que les cellules plus internes sont plus grandes et possèdent un arbre dendritique plus élaboré. Globalement plus petites que les cellules en panier, les cellules étoilées émettent un axone qui s'étend parallèlement aux cellules de Purkinje et forme des synapses avec l'arbre dendritique de ces dernières.

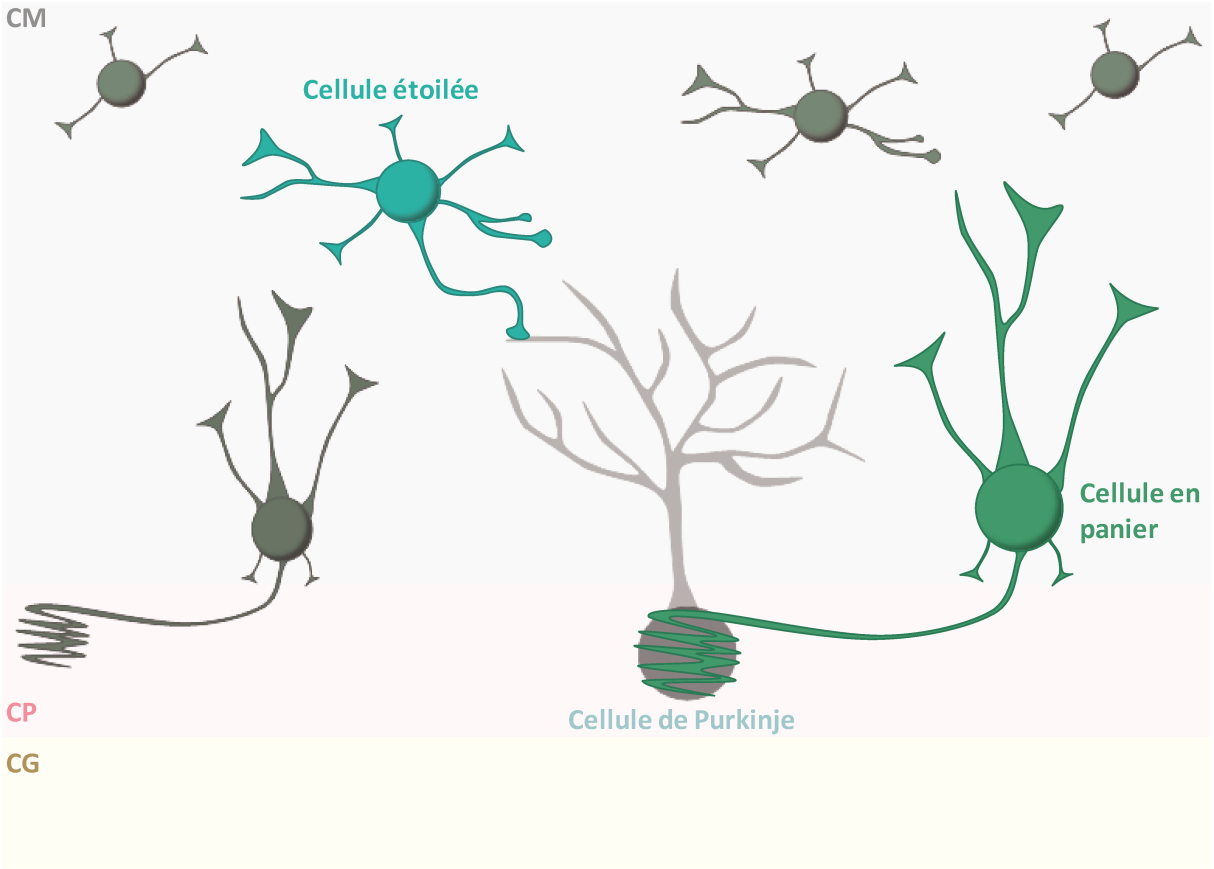


Figure 7 ◆ Représentation schématique des interneurones de la couche moléculaire et de leurs connexions avec les cellules de Purkinje. CG : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje.

Cependant, cette classification des cellules étoilées et en panier en deux types cellulaires est remise en question et, comme le suggérait Ramón y Cajal en 1909, elles pourraient représenter une seule et même population cellulaire. Elles présentent en effet des caractéristiques électrophysiologiques communes, et les variations morphologiques seraient dues au positionnement des cellules au sein de la CM (Sultan and Bower, 1998; Mann-Metzerand and Yarom, 2000).

La fonction principale des interneurones de la CM est d'inhiber les cellules de Purkinje. Pour ce faire, un interneurone se connecte à plusieurs cellules de Purkinje, et chaque cellule de Purkinje est innervée par différents interneurones. Ainsi, chez le rongeur, une cellule de Purkinje reçoit près

de 1 500 synapses inhibitrices de la part d'au moins 10 interneurones (Jaeger et al., 1997). Cette action inhibitrice est synchronisée et potentialisée par l'activité spontanée et le couplage qui relie électriquement ces interneurones entre eux (Mann-Metzerand and Yarom, 2000). En contrepartie, ils reçoivent une multitude de signaux, à la fois excitateurs de la part des fibres parallèles et grimpantes, mais également inhibiteurs en provenance d'autre interneurones de la CM et des collatérales des cellules de Purkinje (Lemkey-Johnston and Larramendi, 1968).

1.3 LES NOYAUX PROFONDS

Au nombre de quatre, les noyaux profonds ou gris du cervelet sont situés en profondeur dans la substance blanche et représentent la principale efférence cérébelleuse vers les autres structures cérébrales (Figure 8). Leur emplacement anatomique correspond aux régions cérébelleuses avec lesquelles ils établissent des connexions, induisant ainsi une organisation médio-latérale et antéro-postérieure précise. Chaque noyau est composé (*i*) de neurones efférents glutamatergiques possédant de larges corps cellulaires et d'imposants arbres dendritiques sphériques, GABAergiques de plus petite taille ou encore glycinergiques, présents spécifiquement dans les noyaux denté et fastigial (Uusisaari et al., 2007; Bagnall et al., 2009; Uusisaari and Knöpfel, 2010) ; (*ii*) d'interneurones qui peuvent être inhibiteurs ou excitateurs (Uusisaari and Knöpfel, 2013). A l'exception des interneurones inhibiteurs qui exercent un contrôle indépendant du reste du cervelet, l'ensemble des neurones des noyaux profonds reçoit des afférences excitatrices de la part des collatérales des fibres moussues et grimpantes, et inhibitrices provenant des cellules de Purkinje (Uusisaari and Knöpfel, 2013).

Le noyau fastigial se situe en position médiale au-dessus du toit du 4ème ventricule. Il reçoit des afférences provenant en majorité des cellules de Purkinje vermiennes, mais aussi des collatérales des fibres moussues et grimpantes (Zhang et al., 2016). Il est connecté aux noyaux vestibulaires *via* le pédoncule cérébelleux inférieur et peut être divisé en deux sections : d'une part le noyau fastigial rostral et d'autre part le noyau fastigial caudal, impliqués respectivement dans la posture et les mouvements rapides des yeux (cf. Chapitre I.2.2.1).

Les noyaux interposés se situent au niveau du toit du 4ème ventricule, latéralement au noyau fastigial. Chez l'Homme, on distingue le noyau interposé globuleux et le noyau interposé emboliforme, qui peuvent être fusionnés chez certains mammifères. Du fait de leur localisation, ils reçoivent des afférences provenant principalement du paravermis et envoient leurs efférences vers le noyau rouge controlatéral par l'intermédiaire du pédoncule cérébelleux supérieur (Voogd et al., 2013).

Enfin, en position latérale, le noyau denté est le plus grand des noyaux profonds cérébelleux. Il présente de nombreuses circonvolutions et peut être divisé en deux zones, dorsale et ventrale, qui jouent des rôles dans des fonctions respectivement motrices et non motrices (cf. Chapitre I.2) (Dum and Strick, 2003). Il reçoit des signaux provenant des hémisphères cérébelleux latéraux, mais également du cortex cérébral, et projette notamment vers le noyau rouge controlatéral et le noyau thalamique ventrolatéral.

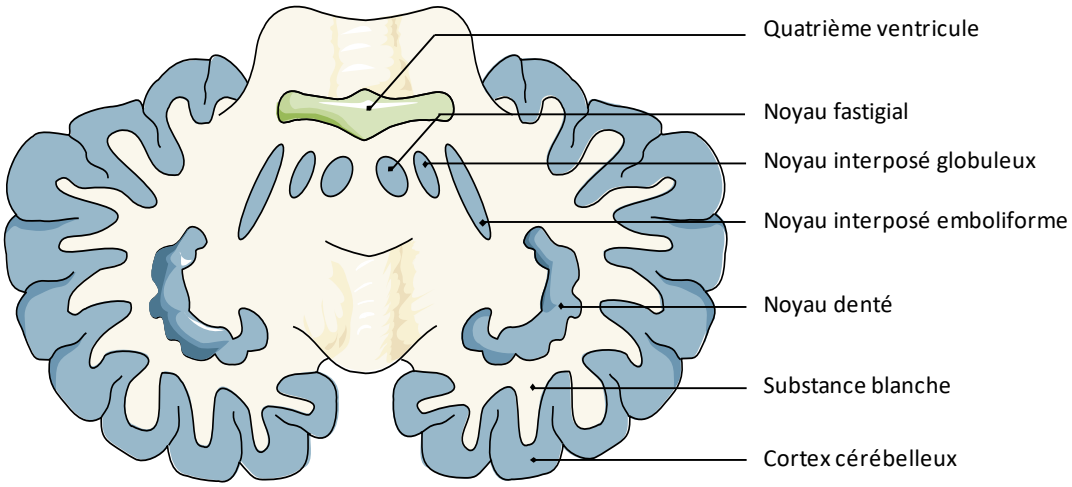


Figure 8 ◆ Représentation schématique des noyaux profonds du cervelet chez l'Homme en coupe horizontale.

1.4 LA SUBSTANCE BLANCHE

La substance blanche cérébelleuse est située en profondeur sous la CG. Ainsi les afférences du cortex cérébelleux, majoritairement représentées par les fibres grimpantes et les fibres moussues, transitent par la substance blanche avant d'atteindre leur cible.

Les fibres grimpantes constituent les axones des neurones de l'olive bulbaire inférieure controlatérale (Desclin, 1974). Elles traversent le pont et pénètrent dans la substance blanche *via* le pédoncule cérébelleux inférieur. Elles émettent alors des collatérales afin de former des synapses avec les interneurones des noyaux profonds du cervelet, puis transitent de façon rectiligne jusqu'au cortex cérébelleux. Une fois dans la CG, elles émettent de nouveau plusieurs collatérales à 90°, qui rejoignent la CP et la CM où elles forment de nombreuses ramifications autour des dendrites des cellules de Purkinje. Bien qu'une cellule de Purkinje ne soit innervée que par une fibre grimpante, chaque fibre grimpante peut effectuer environ 500 contacts synaptiques avec une même cellule de Purkinje chez le Rat (Palay and Chan-Palay, 1974). Elles envoient alors des signaux excitateurs en libérant du glutamate et de l'aspartate (Kimura et al., 1985).

Les fibres moussues proviennent quant à elles de différents noyaux du tronc cérébral, tels que les noyaux pontiques et vestibulaires, ou encore de la moelle épinière. Ces fibres glutamatergiques pénètrent dans le cervelet *via* les pédoncules cérébelleux moyens et inférieurs. A leur arrivée dans la substance blanche, les fibres moussues se distribuent dans des lobules spécifiques de l'hémisphère ipsi- ou controlatéral en fonction de leur origine (Sillitoe et al., 2012). Elles produisent alors de nombreuses collatérales qui bifurquent et rejoignent soit les noyaux gris profonds, soit le cortex cérébelleux. Au sein de la CG, chaque fibre émet ainsi une multitude de terminaisons appelées « rosettes » qui s'étendent largement, lui permettant de se connecter à plusieurs cellules en grain au sein d'un glomérule.

Enfin, il existe 5 afférences complémentaires des fibres moussues et grimpantes. Elles proviennent de la formation réticulée et se propagent par l'intermédiaire des trois pédoncules cérébelleux. Ces fibres neuromodulatrices, dites perlées, présentent des varicosités correspondant aux sites de libération de neurotransmetteurs spécifiques. Les plus nombreuses sont les fibres sérotoninergiques représentant 15 % des afférences totales du cervelet et provenant de différentes structures comme la formation réticulée ou les noyaux du raphé (Bishop and Ho, 1985). Elles projettent de façon hétérogène vers toute la substance grise cérébelleuse, avec une densité accrue au sein des lobules VIII à X du vermis (Rahimi-Balaei et al., 2015). Ces fibres forment ainsi un réseau dense au sein des couches granulaire et moléculaire, où elles innervent notamment les cellules de Purkinje, mais elles rejoignent aussi les noyaux profonds du cervelet (Strahlendorf and Hubbard, 1983; Kerr and Bishop, 1991). On retrouve également des fibres neuromodulatrices noradrénergiques, qui prennent majoritairement naissance au sein du locus coeruleus, lieu de synthèse privilégié de ce neurotransmetteur. Elles entrent dans le cervelet *via* le pédoncule supérieur et projettent vers les noyaux profonds et le cortex. Au sein de ce dernier, elles se connectent aux dendrites des cellules en grain dans le glomérule et des cellules de Purkinje (Rahimi-Balaei et al., 2015).

Au-delà de ces deux types majoritaires, des fibres cholinergiques sont aussi présentes dans le cervelet, en particulier au sein des couches moléculaire et granulaire, et des noyaux profonds. Elles sont plus dispersées et proviennent majoritairement de la formation réticulée et, dans une moindre mesure, des noyaux vestibulaires (Barmack et al., 1992; Jaarsma et al., 1997). De même, des afférences dopaminergiques originaires de l'aire tegmentale ventrale se propagent jusqu'au cortex cérébelleux, vers la CG et la CP (Ikai et al., 1992). Au vu de la localisation des récepteurs dopaminergiques, il est suggéré que les fibres dopaminergiques exercent principalement leur action sur les cellules de Purkinje *via* les récepteurs D3 et D5 afin de moduler les efférences cérébelleuses (Barili et al., 2000). Enfin, des fibres histaminergiques en provenance directe du noyau

tubéromamillaire de l'hypothalamus se connectent aux neurones de la CM, de la CG et des noyaux profonds, suggérant l'existence d'une voie directe reliant l'hypothalamus au cervelet (Panula et al., 1993).

1.5 L'ORGANISATION INTRACORTICALE

A l'aide de différentes approches anatomiques, moléculaires ou encore physiologiques, le cervelet a pu être divisé en différentes zones longitudinales. Au sein du cortex cérébelleux, les cellules de Purkinje d'une même zone longitudinale reçoivent des afférences provenant des fibres grimpantes d'une même région de l'olive inférieure couplées entre elles *via* des jonctions communicantes. De plus, ces mêmes cellules de Purkinje projettent toutes sur un ensemble spécifique de neurones d'un noyau cérébelleux profond. Par ailleurs, chaque zone longitudinale est elle-même découpée en microzones, qui sont composées de modules fonctionnels formés par les interactions entre les différentes cellules du cortex. Cette organisation en modules se fait autour de la cellule de Purkinje, qui représente la seule efférence du cortex cérébelleux et vers laquelle vont converger les différentes informations. Ainsi, la cellule de Purkinje reçoit des afférences indirectes des fibres moussues par l'intermédiaire des fibres parallèles, mais également des afférences directes des fibres grimpantes en provenance de l'olive inférieure (Figure 9).

Dans le premier cas, les données sont contrôlées principalement au niveau de la CG. La communication glutamatergique entre les fibres moussues et les cellules en grain s'effectue *via* les récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ce récepteur peut ensuite être amplifié d'une part *via* les récepteurs *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) grâce au phénomène de *spill-over* favorisé par la contention de la synapse au sein d'un glomérule (Silver et al., 1992; DiGregorio et al., 2002), et d'autre part grâce aux cellules unipolaires en brosse excitatrices. En effet, ces dernières reçoivent également des signaux glutamatergiques rapides (AMPA) et lents (NMDA) des fibres moussues pour agir à leur tour positivement sur les cellules en grain.

Parallèlement, cette communication est régulée négativement par la cellule de Golgi (Figure 9). En effet, après stimulation par les fibres moussues, les cellules en grain libèrent du glutamate au sein du glomérule et activent les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) 2, kaïnate ou encore AMPA présents sur les cellules de Golgi (Bureau et al., 2000; Watanabe and Nakanishi, 2003). Les cellules de Golgi relâchent alors du GABA qui se fixe sur les récepteurs $GABA_A$ des cellules en grain pour exercer un rétrocontrôle négatif grâce à un mécanisme de double inhibition.

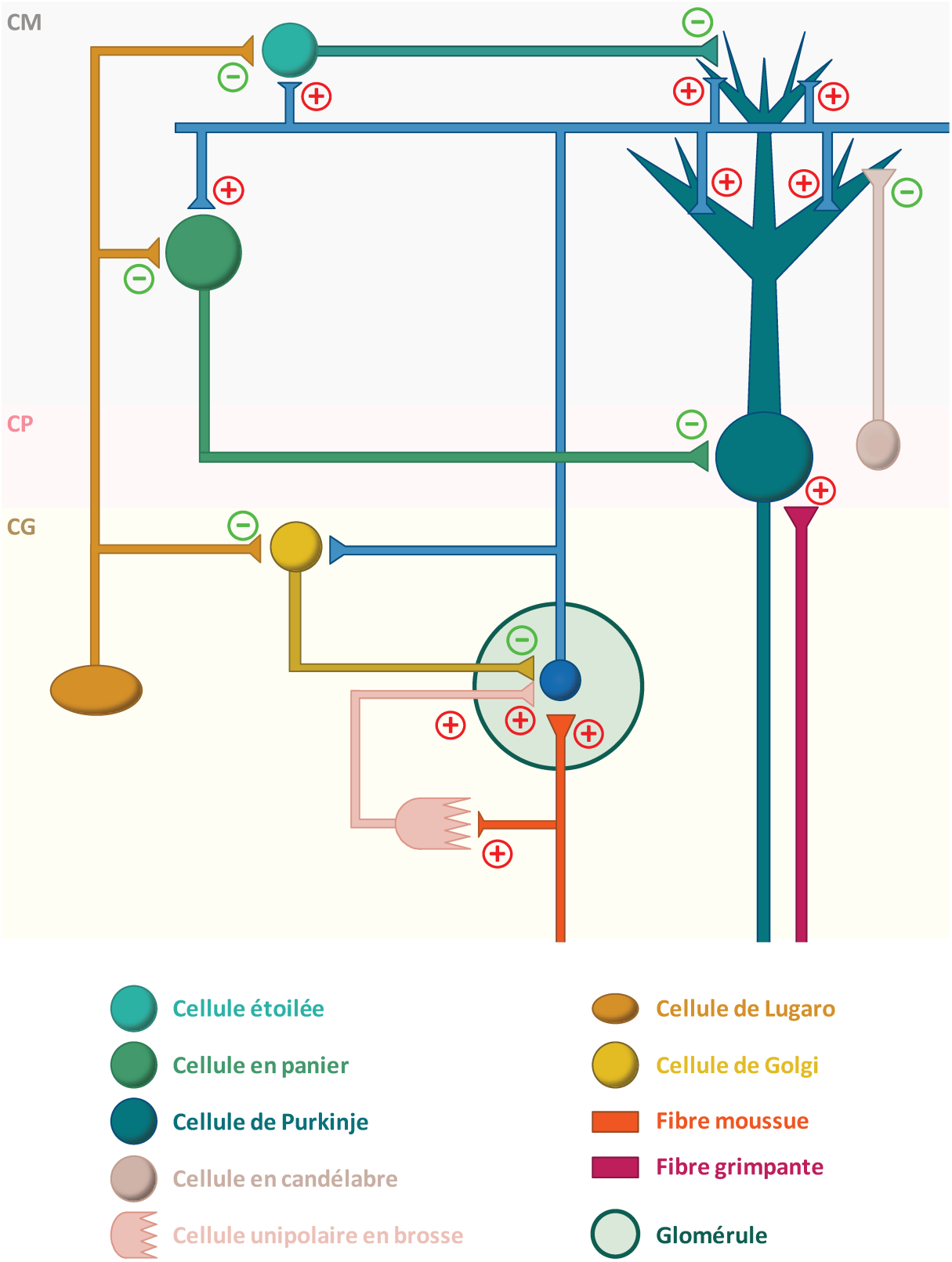


Figure 9 ◆ Représentation schématique des réseaux neuronaux au sein du cortex cérébelleux. CG : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje.

Ainsi, les récepteurs contenant la sous-unité α1 du $GABA_A$ et localisés au sein de la fente synaptique vont être activés en premier, tandis que d'autres récepteurs possédant, entre autres, la sous-unité α6 et potentiellement extrasynaptiques, déclenchent un phénomène de *spill-over* générant un courant inhibiteur plus lent (Nusser et al., 1998; Rossi and Hamann, 1998). Cependant, cette action est limitée par un auto-contrôle des cellules de Golgi *via* leurs récepteurs $GABA_B$ ainsi que par les signaux GABAergiques et glycinergiques des cellules de Lugaro (Mapelli et al., 2009). Cette inhibition est aussi régulée par les cellules étoilées et en panier de la CM qui agissent par l'intermédiaire du GABA.

Les informations en provenance des fibres moussues sont également contrôlées par les interneurones inhibiteurs de la CM. En effet, en réponse aux signaux excitateurs transmis par les fibres parallèles *via* des récepteurs NMDA, AMPA et mGluR1, les cellules en panier et étoilées libèrent du GABA. Celui-ci se fixe alors sur les cellules de Purkinje au niveau de récepteurs $GABA_A$ présentant une prédominance de sous-unités α1βxγ2 et inhibe la transmission du signal (Briatore et al., 2010). Cette action des interneurones de la CM est régulée négativement par les cellules de Lugaro, tandis que les cellules en candélabre de la CP semblent également être à l'origine d'une inhibition des cellules de Purkinje (Schilling et al., 2008).

Une fois traitées, les informations des fibres moussues sont transmises par les fibres parallèles et, dans une moindre mesure, grâce à l'axone ascendant des cellules en grain, jusqu'aux cellules de Purkinje. Là, ce signal est confronté aux afférences excitatrices des fibres grimpantes provenant de l'olive inférieure. En effet, ces connexions glutamatergiques induisent toutes deux une augmentation du calcium cytosolique dans la cellule de Purkinje grâce aux mêmes mécanismes post-synaptiques : (*i*) une activation rapide des récepteurs AMPA permettant une entrée de sodium au sein de la cellule de Purkinje et aboutissant à un influx de calcium grâce à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et (*ii*) une action plus lente sur les récepteurs mGluR1 entraînant une libération du calcium contenu au sein du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire de seconds messagers. Cependant, les signaux émis par les deux fibres se distinguent dans la mesure où une fibre parallèle génère un potentiel d'action simple tandis qu'une fibre grimpante, qui émet une multitude de contacts synaptiques sur l'arborisation dendritique d'une cellule de Purkinje, induit un potentiel d'action complexe. Cette double innervation est à l'origine de différents mécanismes de plasticité tels que la dépression à long terme (*long term depression* ; LTD), théorisée dans le modèle d'Albus (Albus, 1971) et confirmée de façon expérimentale plusieurs années plus tard (Ito et al., 1982). En effet, lorsqu'une cellule de Purkinje reçoit des afférences des fibres parallèles, elle peut conjointement être fortement stimulée par une fibre grimpante, signalant une erreur de prédiction

dans la tâche à effectuer. Si ces deux signaux sont transmis dans la même fenêtre temporelle, alors l'excitation de la cellule de Purkinje aboutit à un niveau élevé de calcium intracellulaire et à l'activation de différentes enzymes, provoquant la phosphorylation et l'internalisation des récepteurs AMPA au niveau des contacts établis avec les fibres parallèles. Cette cascade cellulaire entraîne une diminution de l'efficacité des synapses, et il en résulte alors une modification de l'efférence transmise aux noyaux profonds et par conséquent une modulation du comportement. Si cette LTD est dite hétérosynaptique puisqu'elle implique une double afférence, d'autres phénomènes de plasticité peuvent être homosynaptiques. On retrouve par exemple un phénomène de potentialisation à long terme (*long term potentiation* ; LTP) induit par l'entrée excitatrice simple d'une fibre parallèle sur une cellule de Purkinje en l'absence d'un signal olivaire. Ce phénomène de LTP permettrait ainsi de contrebalancer les effets de la LTD citée plus haut (Boyden and Raymond, 2003).

Un autre acteur de la plasticité synaptique est la glie de Bergmann. En effet, il a été démontré qu'au sein des microdomaines, des prolongements radiaires se développent et forment une gaine gliale autour des connexions synaptiques de la CM (Grosche et al., 2002). A ce niveau, les cellules de Bergmann expriment une grande quantité de transporteurs au glutamate GLAST-1 et GLT-1 (Chaudhry et al., 1995). Lors d'une transmission glutamatergique sur les cellules de Purkinje, ces transporteurs sont activés pour réduire la concentration de glutamate synaptique et diminuer ainsi la réponse des cellules de Purkinje (Takayasu, 2005). Enfin, les cellules de Bergmann possèdent des récepteurs AMPA qui, une fois activés, induisent une libération de glutamate (Cervetto et al., 2015). Le rôle de ce gliotransmetteur serait de renforcer le contrôle inhibiteur des cellules de Purkinje en se fixant sur les récepteurs NMDA des cellules étoilées et en panier (Rudolph et al., 2016).

Le réseau cortical présenté ici est similaire dans l'ensemble du cortex cérébelleux. Cependant, son organisation en modules ainsi que les nombreuses plasticités fines qui s'y déroulent, notamment entre les interneurones et les cellules de Purkinje ou encore au niveau des noyaux profonds, confèrent une grande hétérogénéité au cervelet et lui permettent de participer au contrôle de fonctions très diversifiées.

2. ORGANISATION FONCTIONNELLE DU CERVELET

2.1 LES FONCTIONS MOTRICES

Comme expliqué précédemment, le cervelet peut être organisé selon différents modèles. Les premiers, basés sur son anatomie macroscopique, ont permis de le diviser en un vermis et deux hémisphères, puis en dix lobules. Par la suite, une segmentation phylogénétique a vu le jour, permettant ainsi de segmenter trois zones correspondant aux différentes évolutions : l'archéo-, le paléo- et le néocervelet (Larsell, 1937). Il faudra cependant attendre les années 1990 afin qu'une nouvelle classification voie le jour, prenant cette fois en compte l'organisation anatomique et microscopique mais aussi fonctionnelle du cervelet. Cette structuration permet de distinguer trois zones cérébelleuses dans le plan sagittal, médian, intermédiaire et latéral, où chaque portion corticale d'une zone est associée à un noyau profond du cervelet et à des fonctions précises.

2.1.1 LE SPINOCERVELET

Du fait de leurs afférences majoritairement spinales, les cervelets médian et intermédiaire sont regroupés au sein d'une même division fonctionnelle : le spinocervelet (Vuillier et al., 2011).

Le cervelet médian correspond au vermis, qui reçoit de nombreuses informations proprioceptives des muscles axiaux ainsi que des membres proximaux (Figure 10 ; Zhang et al., 2016). Ces afférences sont véhiculées soit par la moelle épinière *via* les faisceaux cunéocérébelleux et spinocérébelleux, soit par la substance réticulée *via* le faisceau réticulocérébelleux, jusqu'aux cellules de Purkinje du vermis (Oscarsson, 1965). Ces dernières envoient alors des efférences en direction du noyau fastigial, qui les transmet à différentes structures (Zhang et al., 2016). La première cible correspond à des motoneurones des cornes ventrales de la moelle épinière. Ils reçoivent des signaux transitant (*i*) par les noyaux vestibulaires médiaux et inférieurs, constituant ainsi la voie vestibulospinale, ou (*ii*) par la substance réticulée, formant la voie réticulospinale. Les motoneurones contrôlent ensuite les muscles paravertébraux et les muscles proximaux des membres, permettant d'influencer le tonus musculaire et d'intervenir dans l'équilibre postural (Vuillier et al., 2011). Ces muscles sont également sous l'influence du cortex moteur, qui reçoit des efférences du noyau fastigial *via* le noyau ventral du thalamus. Il participe alors à son tour au maintien de l'équilibre, mais aussi aux mouvements de la tête *via* la voie motrice directe (Nieuwenhuys et al., 2008). Enfin, le noyau fastigial transmet des informations à la formation réticulaire paramédiane, qui agit sur les noyaux de nerfs crâniens impliqués dans les mouvements oculaires. Par cette voie, le cervelet médian contrôle ainsi les mouvements rapides des yeux (Zhang et al., 2016).

SPINOCERVELET

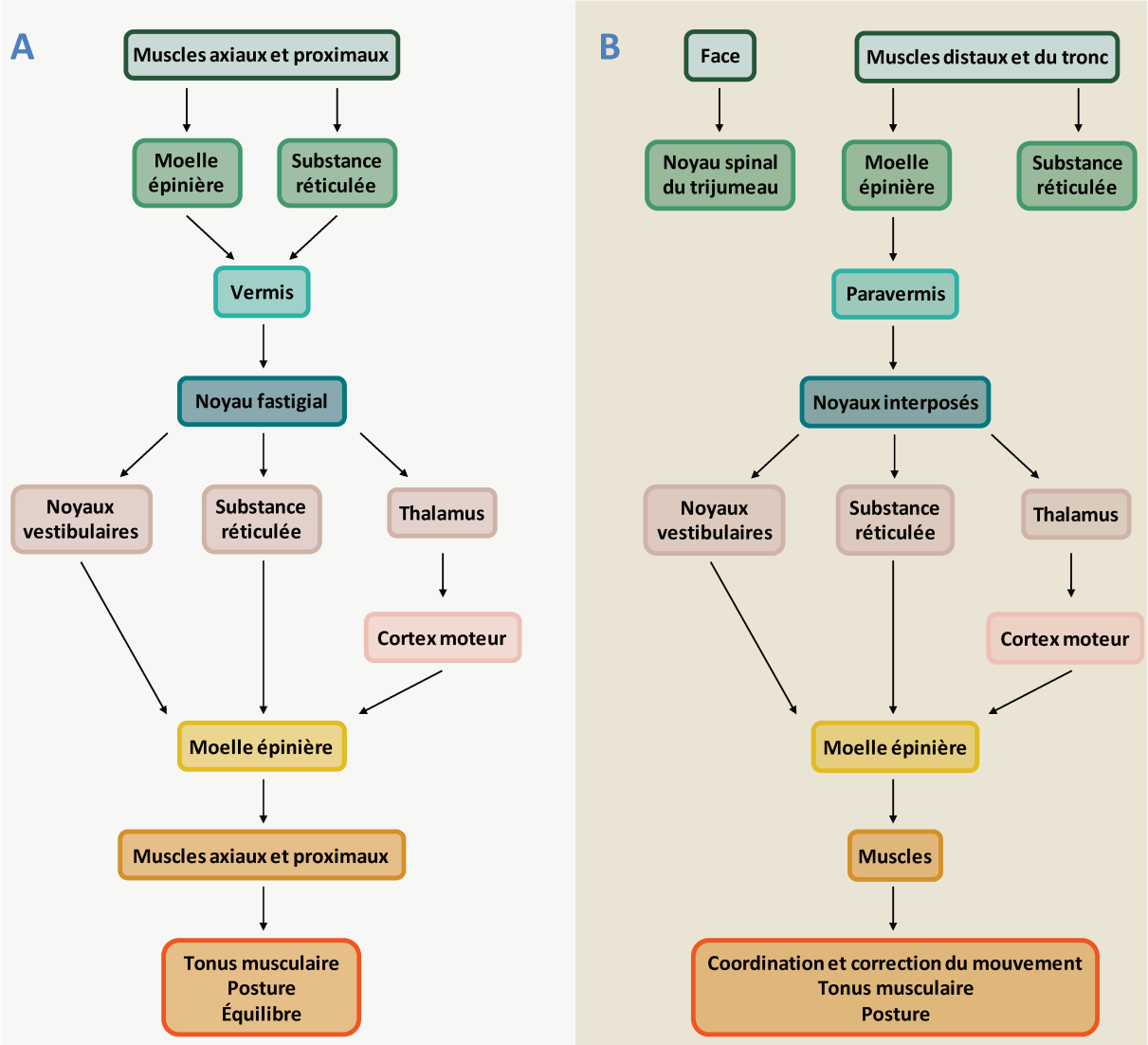


Figure 10 ◆ Représentation schématique des boucles anatomo-fonctionnelles du spinocervelet médian (A) et intermédiaire (B).

Le cervelet intermédiaire est quant à lui composé du paravermis qui reçoit, tout comme le vermis, des données provenant de la périphérie (Figure 10). Ces afférences peuvent emprunter les faisceaux cunéocérébelleux et spinocérébelleux dorsal, transmettant des informations sur les membres distaux respectivement supérieurs et inférieurs ainsi que sur le tronc (Oscarsson, 1965). Le paravermis reçoit également d'autres signaux, notamment de la part de la substance réticulée ou encore du faisceau trigéminocérébelleux, qui véhicule des informations proprioceptives de la face (Marfurt and Rajchert, 1991). Il intègre ainsi un nombre important d'informations sur l'exécution du mouvement en cours et transmet des efférences vers les noyaux interposés, puis à la moelle épinière après un relai au sein de différentes régions. En effet, certaines informations sont adressées au noyau ventral du thalamus puis au cortex moteur, tandis que d'autres rejoignent la partie

magnocellulaire du noyau rouge ou paléorubrum (Donkelaar et al., 2014). Après ces relais, les messages sont transmis à la moelle épinière *via* les faisceaux corticospinal et rubrospinal (Donkelaar et al., 2014). Le cervelet intermédiaire contrôle ainsi les voies motrices directe (pyramidale) et indirecte (extra-pyramidale) afin d'intervenir dans la réalisation de mouvements précis. Le cervelet est alors capable de comparer le mouvement exécuté à celui planifié pour ajuster en premier lieu l'activité des muscles agonistes, puis des muscles antagonistes afin de coordonner leur action pendant le mouvement et de la corriger si besoin (Vuillier et al., 2011). Il permet ainsi d'adapter divers paramètres tels que la vitesse, la durée ou la direction du geste au cours de son exécution. D'autres efférences sont relayées par la substance réticulée puis par le faisceau réticulospinal, faisant lui aussi partie de la voie motrice indirecte et permettant au cervelet intermédiaire d'agir sur le tonus musculaire et la posture (Vuillier et al., 2011).

2.1.2 LE CORTICOCERVELET

Le corticocervelet est formé par le cervelet latéral, correspondant aux hémisphères cérébelleux (Figure 11). Il reçoit uniquement des afférences corticales mais en provenance de zones cérébrales variées, en particulier le cortex moteur et le lobe pariétal. Une copie du mouvement programmé est transmise par la voie corticopontocérébelleuse, *via* les fibres pontocérébelleuses qui font relai au niveau des noyaux du pont et terminent leur trajet au sein de l'hémisphère cérébelleux controlatéral (Ramnani, 2006). Les cellules de Purkinje intègrent le signal et émettent des efférences en direction du noyau denté. Après une décussation, les informations parviennent au noyau ventral latéral du thalamus puis au cortex cérébral (Asanuma et al., 1983). Les principales cibles sont l'aire motrice du prémoteur et l'aire motrice primaire du lobe frontal. Cette boucle fermée constitue la voie principale d'action du corticocervelet.

Cependant, le cortex cérébral envoie aussi des afférences en direction de l'olive bulbaire de façon directe, *via* le faisceau cortico-bulbaire, ou indirecte, *via* le faisceau tegmental central passant par le noyau rouge parvocellulaire ou néorubrum. L'olive bulbaire reçoit également des informations périphériques du faisceau spino-olivaire. Par l'intermédiaire de la voie olivocérébelleuse, les fibres grimpantes se connectent directement aux noyaux dentés ou en faisant relai par les cellules de Purkinje des hémisphères cérébelleux. Le noyau profond envoie ensuite des efférences au néorubrum, fermant ainsi cette seconde boucle appelée triangle de Guillain-Mollaret (Murdoch et al., 2016). Grâce à ces deux voies, le corticocervelet module l'action du cortex moteur afin de réguler les mouvements volontaires. Son rôle est d'améliorer la précision motrice et de planifier des mouvements complexes de façon à limiter les corrections effectuées par le spinocervelet. Il joue également un rôle dans l'apprentissage moteur (Mehrkanoon et al., 2016).

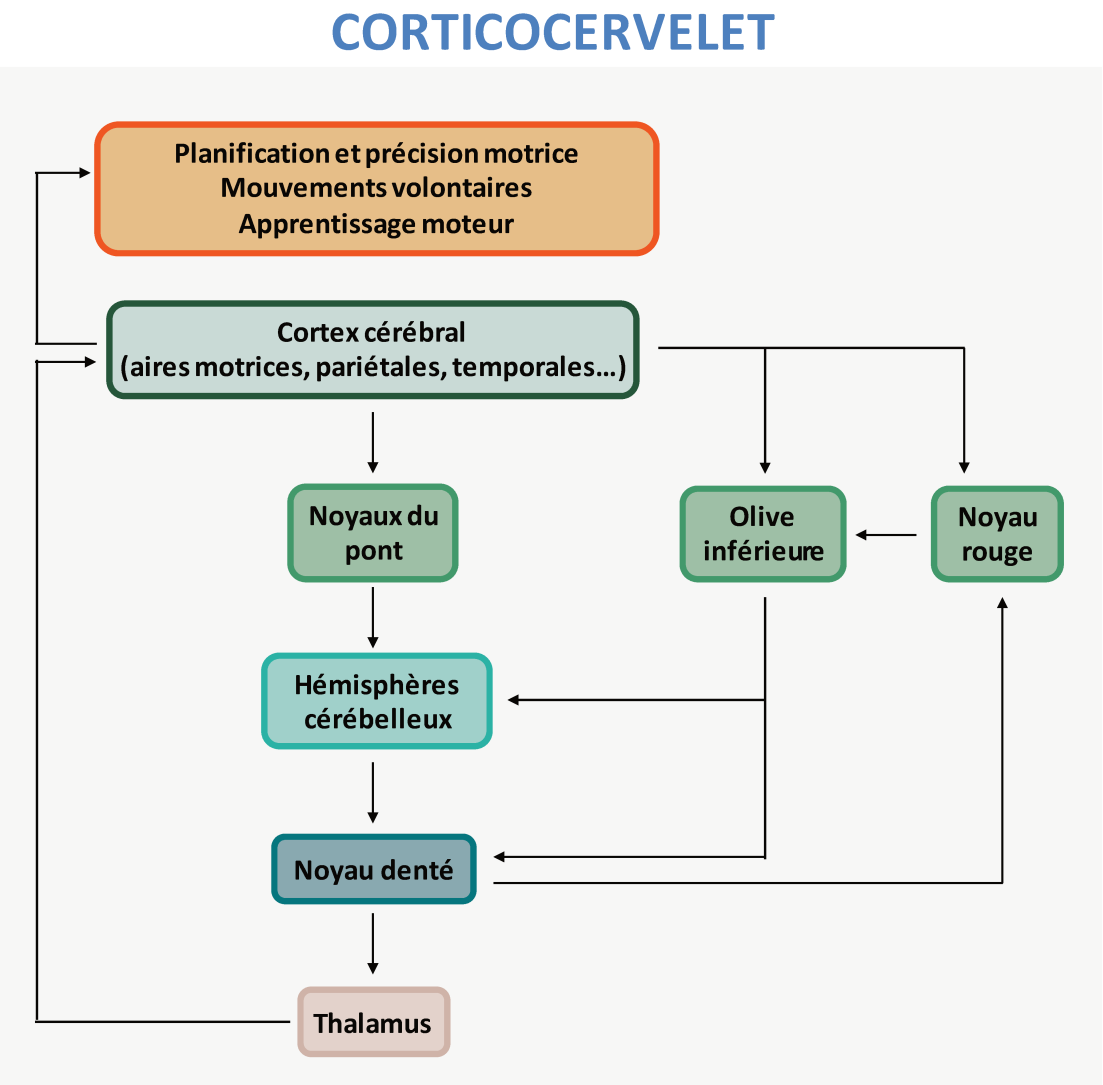


Figure 11 ◆ Représentation schématique des boucles anatomo-fonctionnelles du corticocervelet.

2.1.3 LE VESTIBULOCERVELET

Enfin, le vestibulocervelet est constitué uniquement du lobe flocculo-nodulaire (Figure 12). Il reçoit tout d'abord des informations du labyrinthe principalement sur la position de la tête. Ces afférences peuvent provenir directement du nerf vestibulaire ipsilatéral et représentent les seules fibres moussues primaires à atteindre le cervelet. D'autres informations transitent par les noyaux vestibulaires et correspondent à des fibres moussues secondaires, de nature cholinergique. Enfin, des afférences vestibulaires tertiaires passent par l'olive inférieure par l'intermédiaire des fibres grimpantes (Vuillier et al., 2011). Toutes ces informations, portant notamment sur la position de la tête, atteignent le nodule du cervelet.

Le vestibulocervelet reçoit également des informations visuelles provenant de différentes sources. En effet, certaines partent de l'aire prétectale du mésencéphale et du cortex visuel et font relai au niveau des noyaux réticulaires et pontiques avant d'accéder au flocule cérébelleux, alors que d'autres afférences, originaires de la rétine, transitent par l'olive inférieure et les fibres grimpantes (Wylie et al., 2018).

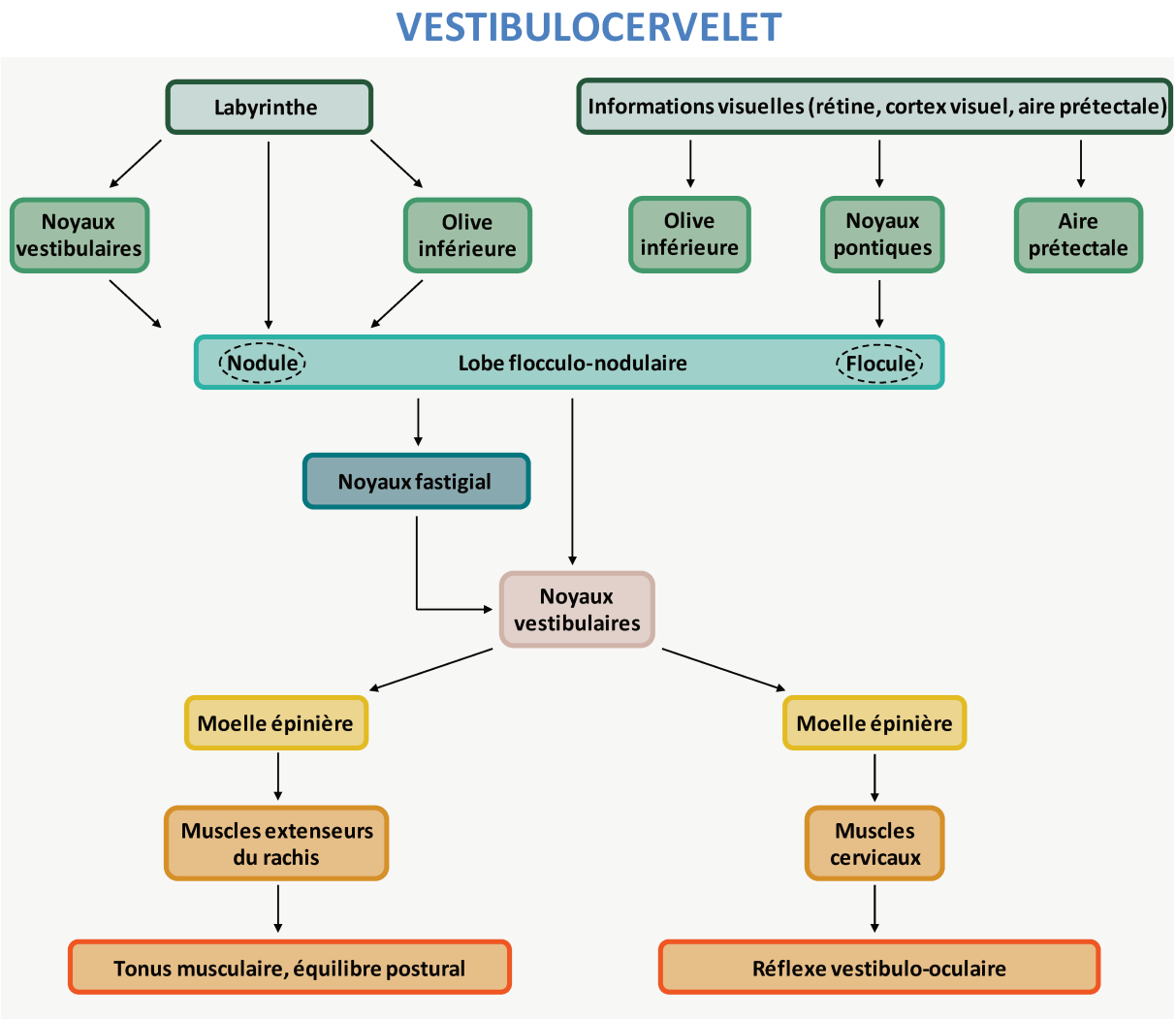


Figure 12 ◆ Représentation schématique des boucles anatomo-fonctionnelles du vestibulocervelet.

Cependant, si le spino- et le corticocervelet impliquent un relai par les noyaux profonds du cervelet, les cellules de Purkinje du lobe flocculo-nodulaire peuvent, quant à elles, contourner le noyau fastigial pour atteindre directement les noyaux vestibulaires, où deux tractus prennent naissance. On retrouve tout d'abord la voie vestibulospinale latérale impliquant les efférences originaires du nodule ayant pour cibles les motoneurones de la moelle épinière innervant les muscles extenseurs du rachis. Cette voie influe ainsi sur le tonus musculaire et l'équilibre postural. Quant au tractus vestibulospinal médial, il relaie les informations flocculaires vers les noyaux des nerfs oculomoteurs et accessoires, ainsi que les muscles cervicaux. De ce fait, il joue un rôle dans le réflexe

vestibulo-oculaire qui permet la stabilisation du regard lors des mouvements rapides de la tête (Nieuwenhuys et al., 2008).

2.2 LES FONCTIONS NON MOTRICES

2.2.1 MISE EN EVIDENCE DES FONCTIONS NON MOTRICES

Si le rôle moteur que joue le cervelet est établi depuis de nombreuses années, il apparaît que son implication dans des pathologies comme les troubles cognitifs a longtemps été masquée par les symptômes moteurs sévères. En effet, l'anatomie même du cervelet, comprenant des connexions avec le cortex préfrontal ou le lobe pariétal impliqués dans des fonctions exécutives ou visuospatiales, suggère une participation non négligeable à de nombreuses fonctions non motrices. De plus, il est démontré que le développement important du cervelet au fil de l'évolution, notamment des hémisphères et du noyau denté, corrèle avec celui du cortex frontal et de l'amplification des fonctions cognitives chez les différentes espèces concernées. De même, Allin et *al*. ont mis en évidence en 2001 un lien entre la taille du cervelet et les performances cognitives chez des adolescents nés prématurément, renforçant l'hypothèse d'une participation du cervelet aux processus cognitifs.

Enfin, à l'appui de ces données anatomiques, des arguments neuropsychologiques et pathologiques ont confirmé les rôles non moteurs du cervelet. Ainsi, Schmahmann et Sherman ont décrit en 1998 le « syndrome cérébelleux cognitif affectif » sur la base de patients souffrant de lésions cérébelleuses, caractérisé par des troubles exécutifs, visuospatiaux, émotionnels, mais aussi des déficits de mémoire ou de langage. Les différents travaux de recherche qui ont suivi ont permis de conforter la théorie d'une implication cérébelleuse dans de nombreuses fonctions non motrices.

2.2.2 CERVELET & FONCTIONS EXECUTIVES

Les fonctions exécutives sont caractérisées par un ensemble de tâches cognitives organisées de façon à atteindre un objectif, en s'ajustant en permanence. Elles nécessitent donc de gérer les différentes afférences afin de moduler le comportement et les actions de l'individu et permettent d'exécuter diverses tâches nécessitant une attention particulière, un contrôle visuospatial ou encore une planification (Logan, 1985). Quatre processus interviennent dans ces fonctions exécutives : le choix d'une stratégie pour réaliser la tâche, son élaboration, son exécution et enfin son contrôle voire son inhibition afin de s'adapter aux changements de l'environnement. Le cervelet étant largement connecté au cortex préfrontal, région primordiale pour le contrôle exécutif, il pourrait ainsi jouer un rôle dans ces processus. Malgré tout, ce rôle reste controversé et variable en fonction des différentes études menées. En effet, si des travaux ont démontré des désordres exécutifs tels

que des troubles de la pensée abstraite, de la résolution de problèmes ou encore de la mémoire de travail verbale chez des patients avec des lésions cérébelleuses (Mak et al., 2016), d'autres recherches ont mis en évidence que des troubles apparus rapidement après les lésions sont compensés à long terme (Schmahmann and Sherman, 1998; Neau et al., 2000).

2.2.3 CERVELET & FONCTIONS SPATIOTEMPORELLES

Les fonctions spatiales requièrent à la fois un traitement des informations sensorielles et environnementales, et des tâches motrices visant à explorer ce même environnement. Du fait de son rôle dans diverses fonctions sensorimotrices telles que le réflexe vestibulo-oculaire et de ses connexions avec les cortex frontal et pariétal, l'implication du cervelet dans le traitement spatial de l'environnement a été suggérée.

A l'appui de cette hypothèse, différentes études menées sur des patients ont montré que des lésions cérébelleuses peuvent être à l'origine d'une altération des capacités visuospatiales, suggérant une implication cérébelleuse dans les manipulations et rotations mentales d'objets dans un espace bi- ou tri-dimensionnel (Vingerhoets et al., 2002; Molinari et al., 2004). Ces troubles seraient principalement dus à des difficultés de manipulation mentale des objets dans l'espace et sont différents selon la localisation de la lésion, suggérant une possible latéralisation des fonctions spatiotemporelles. Dans l'étude menée par Molinari et al. (2004), les patients présentant des lésions du cervelet gauche ne complètent pas le test de rotation mentale d'objets mais font peu d'erreurs, tandis que les patients ayant des lésions du cervelet droit finissent le test avec un nombre d'erreurs important. Enfin, il a été démontré que l'apprentissage spatial est altéré à la suite de lésions cérébelleuses. En effet, dans le test de la piscine de Morris, qui permet d'évaluer différentes aptitudes spatiales, des rats hémicérébellectomisés sont incapables d'explorer le nouvel environnement ou d'acquérir des stratégies spatiales pour effectuer la tâche (Petrosini, 1998).

Par ailleurs, il a été démontré que des fonctions telles que la perception temporelle d'événements, participant notamment à l'apprentissage de la musique, sont affectées à la suite de lésions cérébelleuses concernant en particulier les lobes supérieurs, ou encore chez des patients présentant une atrophie cérébelleuse (Nichelli, 1996; Harrington et al., 2003; Peretz and Zatorre, 2005). De plus, plusieurs études révèlent que des patients atteints de pathologies cérébelleuses présentent des déficits dans l'apprentissage procédural et le traitement de stimulations séquencées (Restuccia et al., 2006; Molinari and Leggio, 2007).

Le cervelet apparaît donc comme un système interne d'évaluation temporelle, jouant un rôle dans le traitement d'événements organisés dans le temps (Lagarde et al., 2009) et dans l'interprétation des relations spatiotemporelles entre plusieurs stimuli.

2.2.4 CERVELET & LANGAGE

Les différentes études menées montrent que le cervelet est impliqué dans une grande diversité de troubles du langage. En effet, alors qu'il a longtemps été suggéré que cette structure joue un rôle uniquement dans le versant moteur de l'élocution, il semblerait qu'elle participe également à la planification du discours au stade pré-articulatoire.

Il a ainsi été démontré que le cervelet intervient dans l'organisation et la perception temporelle du discours, l'anticipation du débit de parole, et la création d'une représentation prédictive de l'énoncé (Silveri, 1998; Ackermann et al., 2007). Ainsi, dans le cas de lésions cérébelleuses, on retrouve notamment un agrammatisme, une latence dans la production du discours ou encore une aphasie (Silveri et al., 1994; Marien et al., 2000). De plus, Guell et al. (2015) ont mis en évidence que le syndrome cérébelleux cognitif affectif entraîne des altérations des compétences linguistiques d'ordre supérieur telles que la production ou la reconnaissance de phrases dans un contexte littéraire précis. Enfin, le cervelet semble aussi jouer un rôle dans la prosodie, influençant la mélodie et l'intonation lors d'une expression orale. En effet, une étude indique qu'une prosodie émotionnelle entraîne l'activation du cervelet supérieur alors que des altérations cérébelleuses provoquent une dysprosodie chez les patients (Pichon and Kell, 2013). L'intervention du cervelet dans l'ensemble de ces composantes non-motrices du langage est liée à ses connexions avec des zones cérébrales telles que le gyrus frontal inférieur gauche ou encore l'aire temporale gauche, correspondant respectivement aux aires de Broca et Wernicke (Booth et al., 2007).

2.2.5 CERVELET, MEMOIRE & APPRENTISSAGE

Bien que souvent masqués par des déficits attentionnels ou exécutifs, les troubles mnésiques sont notoires lors de pathologies cérébelleuses. A titre d'exemple, il est maintenant connu que les défauts de langage décrits ci-dessus (cf. Chapitre I.2.2.4) sont généralement associés à une altération de la mémoire verbale, indiquant que le cervelet joue un rôle dans l'encodage et le renforcement de cette mémoire à court terme (Silveri, 1998; Ravizza et al., 2006).

Des lésions cérébelleuses entraînent également des déficits de la mémoire de travail et de la mémoire procédurale (Gottwald, 2004; Torriero et al., 2007). Cette dernière implique une participation du cervelet dans les mécanismes d'apprentissage (moteur ou non) et de conditionnement, mise en évidence dans le test classique de la fermeture de paupière (Lavond, 2002). De plus, le vermis a été identifié comme l'acteur principal du conditionnement à la peur, en favorisant toutes les étapes de la mémoire liée à cette émotion (Sacchetti et al., 2002; Sacchetti et

al., 2007; Utz et al., 2015). Il constitue en effet un site de plasticité notable pour l'apprentissage conditionné de la peur, lors duquel une potentialisation à long terme de synapses à la fois inhibitrices et excitatrices a lieu entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje (Sacchetti et al., 2004; Scelfo et al., 2008), ou encore entre les cellules de Golgi et les fibres moussues en provenance de l'hippocampe (Ruediger et al., 2011).

2.2.6 CERVELET & EMOTIONS

Le cervelet apparaît également comme une région importante pour la perception, la reconnaissance et le traitement des émotions. Ainsi, dans le cas du syndrome cérébelleux cognitif affectif, les patients présentent une désinhibition avec une impulsivité, agressivité ou irritabilité, ou à l'inverse une apathie, témoignant d'une réponse inappropriée du comportement face à l'environnement à la fois interne et externe, et de troubles de l'adaptation sociale (Schmahmann and Sherman, 1998; Schmahmann, 2004). Cette propriété émotionnelle est favorisée par des liens étroits entre le cervelet et les régions limbiques telles que l'amygdale ou encore l'hippocampe. Ainsi le lobe cérébelleux postérieur est impliqué dans la perception des émotions primaires, à savoir la joie, la tristesse, la surprise, la colère ainsi que la peur et le dégoût, qui partagent des réseaux neuronaux communs dans le lobule IX (Baumann and Mattingley, 2012). De plus, il a été montré que, si le cervelet est capable de percevoir les émotions positives, il participe plus particulièrement au traitement des émotions négatives (Park et al., 2010; Lupo et al., 2015). En effet, il a été démontré qu'une ischémie affectant le cervelet ou une ataxie spinocérébelleuse peuvent entraîner une diminution de la reconnaissance des expressions faciales négatives chez le patient (Sokolovsky et al., 2010; Adamaszek et al., 2014).

De plus, plusieurs études ont mis en évidence une activation cérébelleuse lors de différents processus de sociabilisation tels que l'attention conjointe ou encore l'observation et l'imitation des émotions faciales (Gordon et al., 2013; Van Overwalle et al., 2014). Ces données indiquent donc que le cervelet intervient dans la reconnaissance des émotions et les fonctions cognitives sociales, mais qu'il permet également de coordonner des réponses comportementales appropriées. Ainsi, des déficits structuraux tels qu'une atrophie cérébelleuse ou une diminution du nombre de cellules de Purkinje (Bailey, 1998; Webb et al., 2009), et fonctionnels comme une suractivation du cervelet antérieur et postérieur lors de tâches motrices (Allen et al., 2004), sont observés chez des patients atteints de troubles du spectre autistique.

2.2.7 CERVELET & DOULEUR

Au vu de son activation lors d'événements douloureux, il est admis que le cervelet constitue une structure essentielle dans le traitement de la douleur (Moulton et al., 2010). Différentes études électrophysiologiques ont permis de démontrer que la stimulation de nocicepteurs active les cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (Ekerot et al., 1991; Jie and Pei-Xi, 1992). Trois voies nociceptives spinocérébelleuses comprenant des afférences transmises par les fibres de type A-delta ou C ont été mises en évidence : la voie spino-bulbo-cérébelleuse, qui transite par le noyau réticulé latéral et des fibres moussues en direction du cortex cérébelleux ; la voie spino-olivo-cérébelleuse, qui converge en particulier vers le lobe antérieur ipsilatéral ; et enfin la voie spino-ponto-cérébelleuse en direction du vermis. Par ailleurs, l'imagerie du cervelet par résonnance magnétique fonctionnelle a montré que les régions postérieures du cervelet sont activées lors de la phase d'anticipation de la douleur. Ce processus ferait appel à des mécanismes d'optimisation temporelle des adaptations sensorimotrices en réponse aux stimuli douloureux (Ploghaus, 1999).

2.2.8 TOPOGRAPHIE DES FONCTIONS COGNITIVES CEREBELLEUSES

Les données de la littérature indiquent que le cervelet est impliqué dans une multitude de fonctions cognitives dont certaines sont régies par des zones cérébelleuses précises. La théorie d'une topographie des fonctions non-motrices au sein du cervelet a donc été développée (Adamaszek et al., 2017; Schmahmann, 2019). Ainsi les lobules I à V du cervelet antérieur, les noyaux interposés, et le lobule VIII dans une moindre mesure, sont considérés comme jouant un rôle majeur dans les fonctions sensorimotrices. A l'inverse, le cervelet postérieur et le noyau denté, connectés à des structures spinales, pontiques et cérébrales non-motrices, ciblent les fonctions cognitives telles que les fonctions exécutives ou le langage. Enfin, le vermis et le noyau fastigial sont reliés à des régions limbiques et participent aux comportements sociaux, émotionnels et affectifs (Schmahmann, 2004; Stoodley and Schmahmann, 2010). Au sein de ce cervelet dit émotionnel, on retrouve également une cartographie spécifique. Ainsi, le cervelet limbique médial est composé du vermis et du paravermis postérieurs, et intervient dans le traitement des émotions primaires avec des aires dédiées à chacune d'entre elles. Le cervelet exécutif est représenté par les hémisphères cérébelleux et contribue à la mémoire de travail, aux processus d'attention ou encore à l'apprentissage associatif. Enfin, le vermis antérieur est dédié au traitement de la douleur (Adamaszek et al., 2014). De plus, les déficits observés chez les patients atteints de pathologies cérébelleuses ont permis de mettre en évidence une latéralisation des fonctions cognitives. En effet, les troubles sont majorés en cas d'atteinte du cervelet droit lié au langage, alors que le cervelet gauche est, quant à lui, impliqué dans des tâches non verbales comme les activités visuospatiales.

Cependant, les données bibliographiques rapportent qu'une atteinte cérébelleuse provoque dans la majorité des cas une altération et non une élimination des performances cognitives, suggérant que le cervelet aurait un rôle de modulateur de ces fonctions. Cette hypothèse est appuyée par les symptômes psychotiques observés à la suite de lésions cérébelleuses, et qui proviendraient d'une perte de cohérence entre les signaux extérieurs et la façon dont ils sont perçus (Schmahmann, 2004). Comme pour les fonctions motrices, le cervelet détecterait les signaux extérieurs et simulerait des prédictions spatiotemporelles d'événements afin de créer des modèles internes et adapter le comportement. En cas d'atteinte cérébelleuse, l'altération de ces modèles pourrait expliquer les différents symptômes observés dans des pathologies où la perception du monde extérieur et des émotions est modifiée, telles que la schizophrénie ou l'autisme (Gottwald, 2004; D'Angelo and Casali, 2013).

Bien que les effectifs des cohortes étudiées soient souvent faibles et que la part des troubles moteurs n'est pas à négliger dans la plupart des déficits comportementaux, ce chapitre démontre qu'une altération du cervelet entraîne des défauts à la fois moteurs appelés dysmétrie et cognitifs appelés dysmétrie de pensée (Gottwald, 2004; Schmahmann, 2004). Le cervelet serait donc un neuromodulateur de ces deux fonctions en jouant un rôle à la fois prédictif et adaptatif.

3. DEVELOPPEMENT DU CERVELET

Le cervelet des animaux sachant marcher dès la mise bas est d'ores et déjà mature à la naissance. A l'inverse, il poursuit son développement au cours de la vie post-natale chez les autres espèces, pour atteindre sa maturité à 21 jours chez la Souris et à l'adolescence chez l'Homme. Malgré tout, l'ontogenèse du cervelet suit des étapes similaires chez tous les vertébrés. De ce fait, seul l'Homme sera traité dans la suite de ce chapitre.

3.1 ONTOGENESE GENERALE

Lors de la phase embryonnaire, un renflement ectodermique appelé plaque neurale se crée et s'invagine pour donner naissance au tube neural entre la 3ème et la 4ème semaine de gestation (SG) (Spemann and Mangold, 2003). A son extrémité antérieure, trois vésicules apparaissent et forment, d'avant en arrière, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (Figure 13). Au niveau de ce dernier, la courbure pontique se dessine et creuse celui-ci, générant une cavité qui deviendra le IVème ventricule au cours de la 5ème SG. Cette courbure permet également la division du rhombencéphale en deux vésicules secondaires : le métencéphale en avant, qui préfigure le cervelet et le pont, et le myélencéphale en arrière qui donnera le bulbe rachidien (Figure 13 ; Grow, 2018).

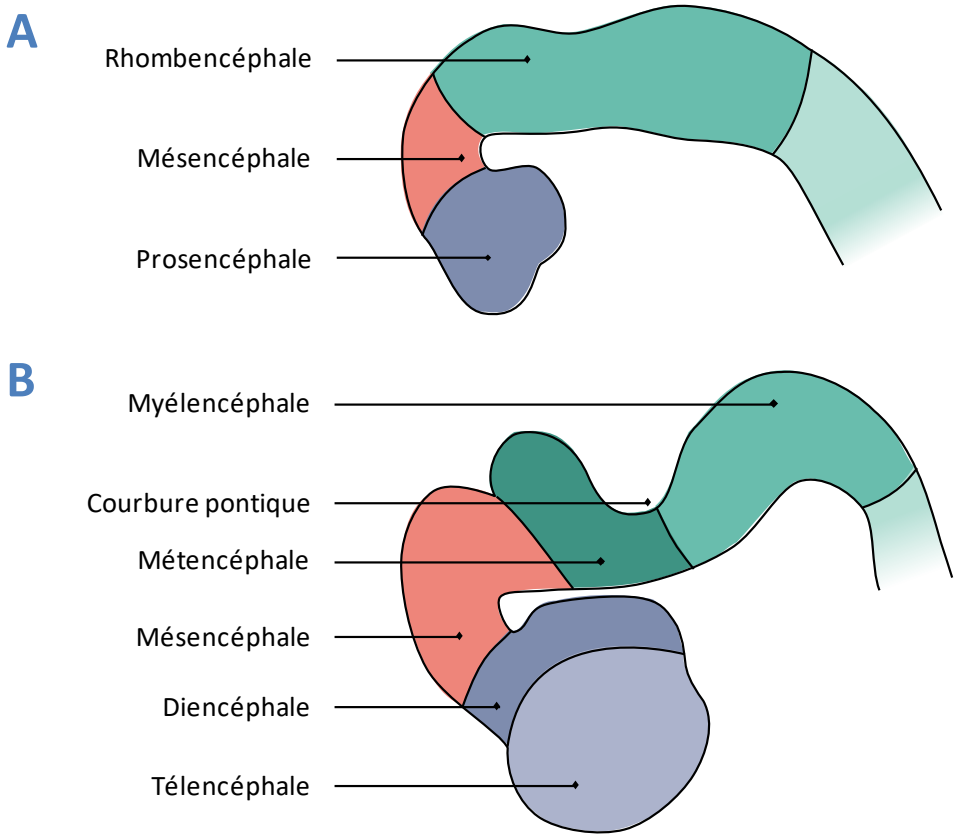


Figure 13 ◆ Représentation schématique des vésicules cérébrales primitives (A) et secondaires (B) au stade embryonnaire.

L'individualisation du cervelet est ensuite déterminée par l'organisateur isthmique localisé entre le mésencéphale et le métencéphale (Nakamura et al., 2005). En effet, cette structure organise le développement de deux zones germinatives en régulant la prolifération cellulaire autour du IVème ventricule. La molécule la plus importante au sein de l'organisateur isthmique est le facteur de croissance *fibroblast growth factor 8* (Fgf8), qui possède des propriétés organisatrices car il peut à lui seul mimer l'activité polarisante de l'isthme et dont l'inactivation du gène chez la Souris empêche le développement du cervelet (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999; Chi et al., 2003). D'autres facteurs participent également à l'activité de l'isthme, notamment le gène de segmentation *WNT1*, les gènes homéotiques *HOX* ou encore des gènes de la famille des protéines à homéodomaines *paired box* (*PAX*) (McMahon et al., 1992; Okafuji et al., 1999; Irving and Mason, 2000). La première zone germinative est la zone ventriculaire (ZV) qui, sous l'influence du facteur de transcription *pancreas associated transcription factor 1 alpha* (Ptf1α), produit les neurones GABAergiques du cervelet, incluant les cellules de Purkinje, les interneurones des noyaux profonds mais aussi les cellules de Golgi et les interneurones de la CM (Figure 14 ; Hoshino et al., 2005; Pascual et al., 2007).

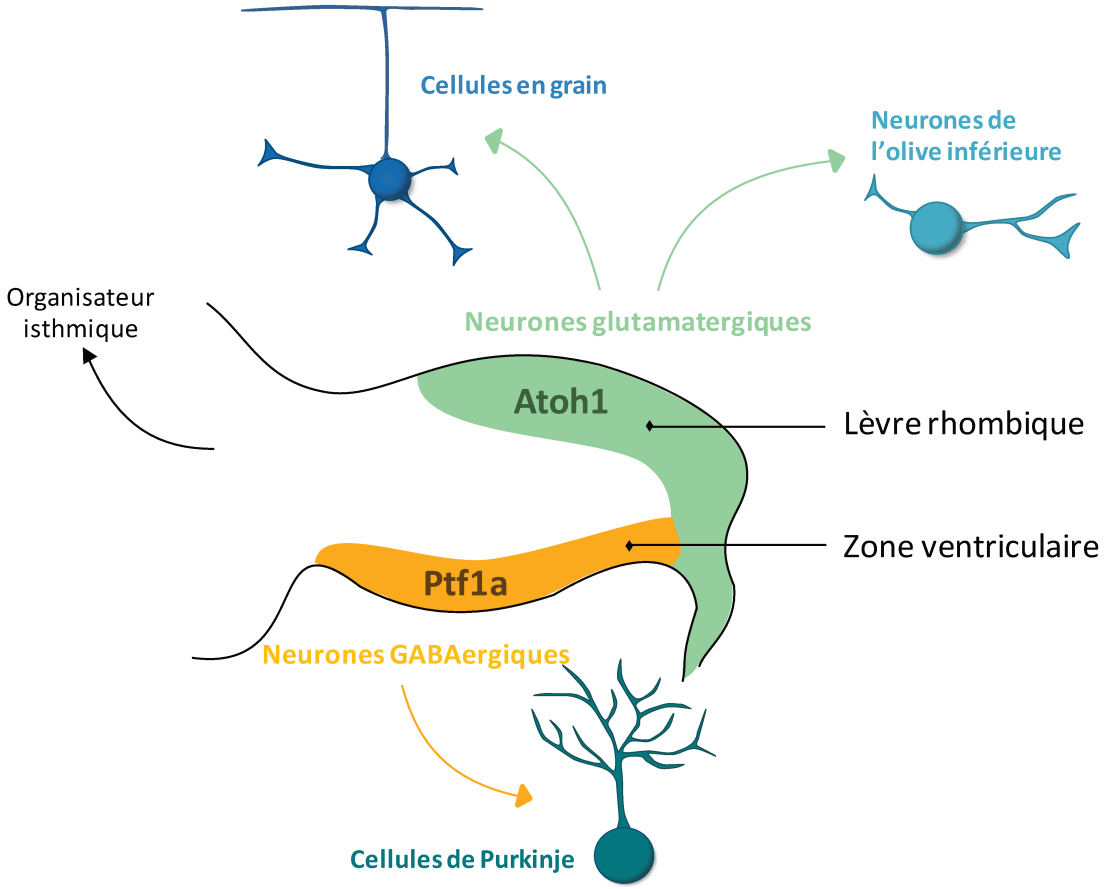


Figure 14 ◆ Représentation schématique des zones germinatives. Grâce à l'expression de deux facteurs de transcription différents, à savoir Ptf1α et Atoh1, les lèvres rhombiques et la zone ventriculaire donnent respectivement naissance aux neurones glutamatergiques et GABAergiques. Atoh1 : *atonal homolog 1* ; GABA : acide gamma-aminobutyrique ; Ptf1α : *pancreas associated transcription factor 1 alpha*.

La seconde correspond aux lèvres rhombiques (LR), qui se sont développées lors de la courbure pontique jusqu'à recouvrir le IVème ventricule. Celles-ci sont à l'origine des neurones cérébelleux glutamatergiques *via* l'expression de l'*atonal homolog 1* (*Atoh1* ; Ben-Arie et al., 1997). Ainsi, la région supérieure des LR donne naissance aux précurseurs des cellules en grain, des cellules unipolaires en brosse et des neurones des noyaux profonds cérébelleux, tandis que la partie inférieure génère les noyaux du pont et de l'olive inférieure (Figure 14 ; Volpe, 2009).

Dans le cervelet, la différenciation neuronale commence dès la 6ème SG, par l'émergence des précurseurs neuronaux GABAergiques et glutamatergiques des futurs noyaux profonds. Au cours de la 12ème SG, les LR se rapprochent et fusionnent pour former une plaque centrale qui préfigure le vermis tandis que des renflements latéraux seront à l'origine des hémisphères cérébelleux. Si la fissure postéro-latérale apparaît rapidement, la fissure primaire ne divisera les lobes antérieur et postérieur du cervelet que lors de la 14ème SG (Liu et al., 2011). Enfin, la segmentation en différents lobules s'effectue pendant la 16ème SG, contribuant à l'augmentation de la surface du cervelet. Ainsi, entre la 24ème SG et la naissance, il est estimé que la foliation s'accroît d'un facteur 30, passant d'une surface de 40 mm² à plus de 15 000 mm² chez l'Homme et que le volume cérébelleux est multiplié par 4 (Figure 15 ; Volpe, 2009). Ce taux de croissance inédit au sein du SNC s'explique notamment par l'élaboration du cortex cérébelleux et des différentes couches qui le composent. Ces dernières vont progressivement se mettre en place pendant la vie fœtale, et sont au nombre de quatre : la couche granulaire externe (CGE), la CP, la CM et la couche granulaire interne (CGI). Le développement du cervelet se poursuit après la naissance, jusqu'à ce qu'il soit totalement mature et composé de 3 couches corticales définitives, la CP, la CM et la CG décrites dans le Chapitre I.

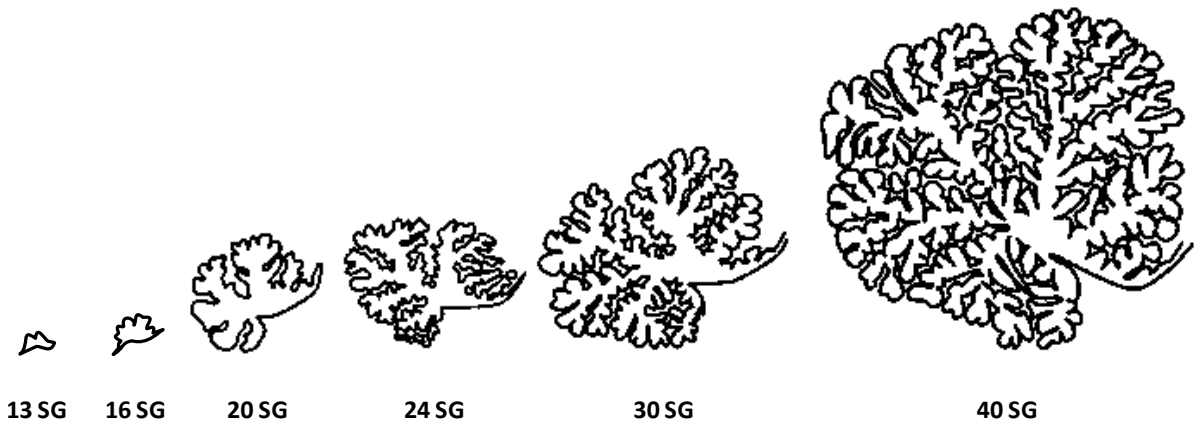


Figure 15 ◆ Représentation de la croissance du cervelet de la 13ème semaine de gestation à la naissance chez l'Homme. (D'après Volpe, 2009 ; Biran et al., 2012).
SG : semaine de gestation.

3.2 DEVELOPPEMENT DES CELLULES DE PURKINJE

Les précurseurs des cellules de Purkinje sont les premiers neurones qui se forment au sein du cortex cérébelleux vers la 9ème SG. Provenant de la ZV supérieure, ils migrent à travers la substance blanche de façon ventro-dorsale le long de la glie radiaire pour parvenir jusqu'à leur localisation finale. La migration des précurseurs des cellules de Purkinje est médiée par une protéine de la matrice extracellulaire, la réeline, qui est produite par les précurseurs des cellules en grain au sein de la CGE. En effet, il a été montré qu'un *knock out* du gène codant cette protéine induit un défaut de mise en place des cellules de Purkinje (Yuasa et al., 1993), qui peut être compensé par l'ajout d'une CGE artificielle dans des explants de cervelet de souris mutantes (Miyata et al., 1997). A ce stade, les précurseurs des cellules de Purkinje forment une assise cellulaire transitoirement pluristratifiée. Elle devient par la suite monostratifiée pour correspondre à la CP à la fin de la 28ème SG. La différenciation de ces neurones débute alors par l'élaboration d'un arbre dendritique large, qui se recouvre d'épines dendritiques et dont le développement dans la CM se poursuit pendant la période post-natale, augmentant progressivement l'épaisseur de cette couche. Cette dendritogenèse est favorisée par des facteurs trophiques provenant des cellules en grain, démontrant le rôle primordial des interactions entre ces deux types cellulaires dans la mise en place du cortex cérébelleux. A titre d'exemple, les précurseurs des neurones en grain sécrètent du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), qui agit *via* son récepteur *tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) localisé sur les cellules de Purkinje. Or, une diminution de ce facteur de croissance altère l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (Sadakata et al., 2007). Le récepteur nucléaire *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor alpha* (RORα), fortement exprimé par les cellules de Purkinje, semble également primordial car sa mutation chez la Souris entraîne une dégénérescence des cellules de Purkinje, à l'origine d'une importante atrophie du cervelet et d'une ataxie cérébelleuse (Hamilton et al., 1996).

Parallèlement, vers la 28ème SG, les précurseurs des cellules de Purkinje établissent de multiples connexions avec des fibres grimpantes au niveau de leur soma. Ces contacts synaptiques forment tout d'abord des nids péri-somatiques. Ils se déplacent ensuite vers le pôle apical puis sur l'arborisation dendritique en cours de développement (Watanabe and Kano, 2011). Cette translocation, associée au phénomène d'élimination des synapses excédentaires, conduit à une mono-innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes. Ce mécanisme implique les récepteurs AMPA, qui, fortement stimulés, entraînent une LTP au niveau des synapses les plus actives, tandis que les moins fonctionnelles sont éliminées (Bosman et al., 2008). Par ailleurs, la libération du soma des cellules de Purkinje autorise alors les cellules en corbeille à se connecter.

3.3 DEVELOPPEMENT DES CELLULES EN GRAIN

Les précurseurs des cellules en grain apparaissent dans la LR supérieure à partir de la 9ème SG et migrent tangentiellement à la surface du cervelet pour former la CGE. Cette migration, indépendante de la glie de Bergmann, est influencée par des chimiokines attractives comme le *stromal cell-derived factor 1 alpha* (SDF-1α) produit par les cellules piales (Rahimi-Balaei et al., 2015).

La prolifération des précurseurs des neurones en grain est alors induite par des molécules, telles des facteurs de croissance dont le *basic fibroblast growth factor* et l'*epidermal growth factor (egf)*, ainsi que par la protéine Sonic hedgehog (Shh ; Figure 16). En effet, il a été démontré que Shh est secrétée par les cellules de Purkinje et permet l'activation de protéines du cycle cellulaire (Wallace, 1999). Par ailleurs, cette prolifération est également favorisée par la liaison établie entre Shh et les laminines. En effet, le complexe Shh-laminine facilite l'adhésion des précurseurs sur la membrane méningée *via* l'intégrine β1 et augmente l'accessibilité des cellules en grain au signal proliferatif de Shh (Blaess et al., 2004). Après leur dernière division mitotique, les cellules en grain entrent dans une phase de latence pouvant durer de 20 à 48 heures (Marzban et al., 2015). Elles émettent ensuite deux expansions axonales horizontales et migrent de façon tangentielle dans la direction du prolongement le plus large (Figure 16 ; Komuro et al., 2001). Ce mécanisme est stimulé par diverses molécules extracellulaires telles que la somatostatine qui module l'expression de canaux calciques et potassiques voltage-dépendants (Yacubova and Komuro, 2002). Cependant, au fur et à mesure du mouvement, les extensions s'étendent et la vitesse de déplacement des cellules diminue. Un troisième prolongement présentant un cône de croissance voit alors le jour et s'enfonce en profondeur vers la CM (Figure 16 ; Komuro et al., 2001). La CGE peut alors être segmentée en deux régions, une zone externe de prolifération et une partie plus interne que rejoignent les cellules avant de débuter leur migration radiale.

En effet, dans la CM, l'extension neuronale s'enroule autour des fibres gliales de Bergmann (Figure 16). L'apparition du cône de croissance permet ainsi de passer d'une migration tangentielle à une migration radiale. Le soma des précurseurs peut alors s'étirer et se déplacer par des mouvements de translocation. Ce déplacement est favorisé par un gradient de BDNF qui oriente les neurones vers la CGI (Borghesani et al., 2002) ou encore par la D-sérine qui, libérée par les cellules de Bergmann, possède un rôle de co-agoniste des récepteurs NMDA (Schell et al., 1997). Les futures cellules en grain traversent ainsi la CM jusqu'à la CP, où leur migration s'arrête transitoirement du fait de leur séparation de la glie (Figure 16 ; Komuro et al., 2001). Les cellules en grain matures retrouvent alors leur forme ronde caractéristique et terminent leur déplacement dans la CGI au

contact de la substance blanche (Figure 16). De cette manière, les précurseurs les plus précoces sont les plus externes tandis que les cellules en grain générées plus tardivement doivent traverser toute la CGI et sont plus internes.

Ces phases de prolifération et migration des précurseurs des cellules en grain perdurent pendant toute la période fœtale. Au cours de la 25ème SG, la CGE atteint ainsi un pic d'épaisseur qu'elle maintient tout en s'étendant horizontalement, permettant l'accroissement de la surface cérébelleuse (Volpe, 2009). Parallèlement, la différenciation des cellules en grain se poursuit dans la CGI par l'émission de dendrites qui se connectent aux fibres moussues déjà présentes dans le cervelet depuis la 16ème SG (Donkelaar et al., 2014), et l'allongement des prolongements horizontaux vers la CM forme les fibres parallèles.

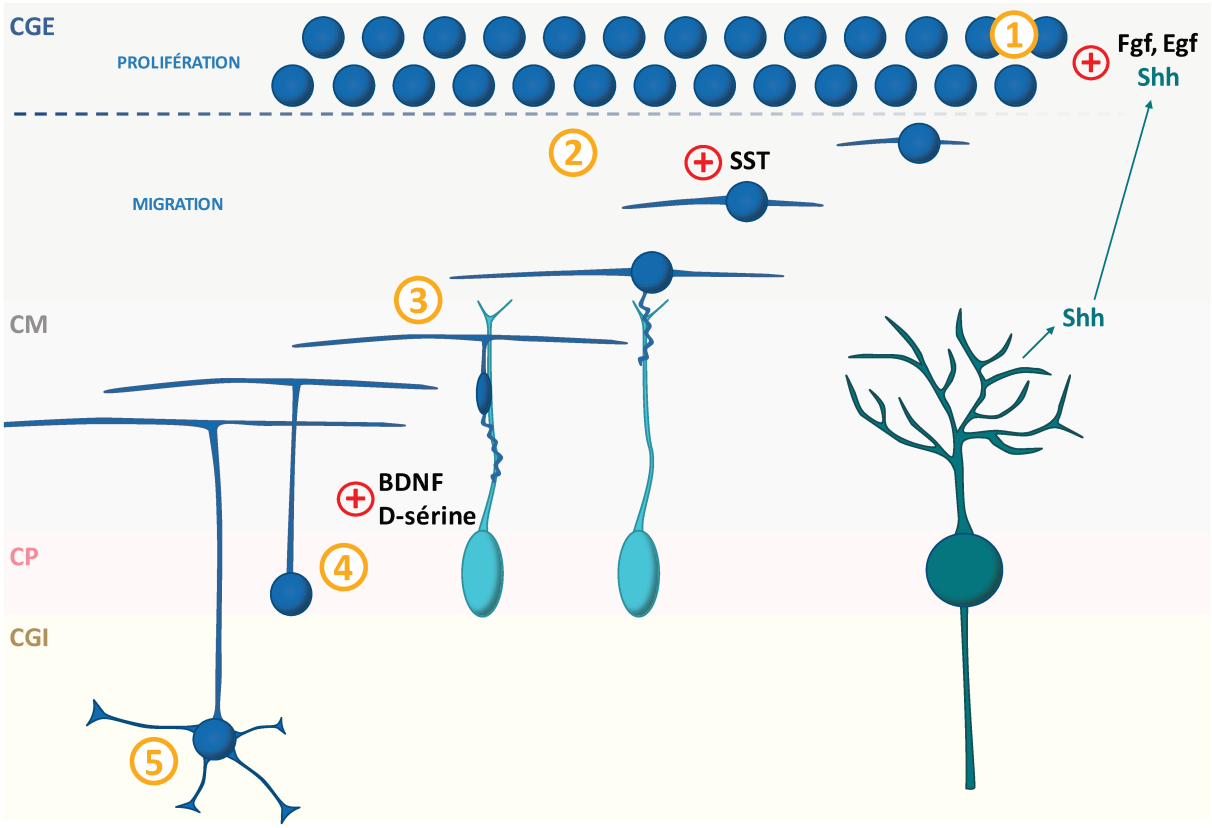


Figure 16 ◆ Représentation schématique de la maturation des cellules en grain. Au sein de la couche granulaire externe, la prolifération des précurseurs des cellules en grain est stimulée par différents facteurs (1). Puis, ces précurseurs migrent tangentiellement jusqu'à la couche moléculaire (2) où, grâce à la glie de Bergmann, ils effectuent une migration radiale (3). Arrivée dans la couche des cellules de Purkinje, les précurseurs se séparent des cellules gliales (4) et terminent leur migration dans la couche granulaire interne jusqu'à la frontière avec la substance blanche (5). BDNF : *brain-derived neurotrophic factor* ; CGE : couche granulaire externe ; CGI : couche granulaire interne ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje ; E*pidermal growth factor* ; Fgf : *fibroblast growth factor* ; Shh : *Sonic hedgehog* ; SST : somatostatine.

A la naissance, la croissance du cervelet devient moins intense et son cortex est composé des mêmes quatre couches embryonnaires, à savoir la CGE, la CM, la CP et la CGI. Les cellules en grain subissent des phases d'apoptose afin d'éliminer les cellules non fonctionnelles de la CGI et les neurones surnuméraires de la CGE. Cette mort cellulaire est notamment médiée par l'activation du récepteur Fas par son ligand secrété par les cellules de Purkinje, déclenchant ainsi la voie extrinsèque de l'apoptose (Allais et al., 2010). Par la suite, la CGE disparaît progressivement, sur une période pouvant s'étendre jusqu'à plusieurs mois mais on peut, un an après la naissance, toujours distinguer une fine CGE dans le cervelet humain. Pendant ce temps, et grâce à la migration radiale, la CGI s'agrandit pour former la CG et aboutir à la formation du cervelet mature et fonctionnel.

3.4 DEVELOPPEMENT DES INTERNEURONES

Les interneurones inhibiteurs du cervelet émergent de la ZV et migrent au sein de la substance blanche où ils effectuent plusieurs divisions mitotiques. Les premiers à migrer, durant la vie embryonnaire, sont les interneurones des noyaux profonds, suivis par les interneurones de la CG (cellules de Golgi et de Lugaro) et enfin ceux de la CM (cellules en panier et étoilées). Les mécanismes liés à leur développement sont moins connus que pour les autres neurones du cervelet. Cependant, il est établi que les précurseurs des interneurones expriment séquentiellement les facteurs de transcription Ptf1α et PAX2 au cours de leur développement (Leto et al., 2016). De plus, les cellules de Purkinje jouent un rôle primordial, d'une part, dans leur prolifération *via* la libération de Shh (De Luca et al., 2015) et, d'autre part, dans leur différenciation. En effet, elles sécrètent de la neurofascine et de la sémaphorine qui guident les prolongements axonaux des interneurones, notamment dans la CM, afin de faciliter la formation des synapses avec eux (Ango et al., 2004; Cioni et al., 2013). Enfin, il semble que les cellules en grain interviennent dans la dendritogenèse des interneurones cérébelleux grâce à la production de BDNF (Mertz et al., 2000).

CHAPITRE II : L'HYPOXIE

1. DEFINITION & GENERALITES

L'hypoxie est définie comme une inadéquation entre les apports et la demande en dioxygène (O_2) au sein d'un groupe de cellules, d'un tissu entier ou de tout l'organisme. Les origines de l'hypoxie sont multiples et permettent d'en distinguer quatre grands types. Il existe ainsi *(i)* **l'hypoxie anémique**, lors d'une altération du transport d'O_2 par le sang, due par exemple à une diminution de la quantité d'érythrocytes ou d'hémoglobine ; (*ii*) **l'hypoxie circulatoire**, dans laquelle les tissus affectés ne reçoivent pas suffisamment de sang oxygéné à cause d'un problème cardiaque ou d'une ischémie ; (*iii*) **l'hypoxie histotoxique**, lorsque l'O_2 délivré par le sang ne peut pas être utilisé par les cellules à cause d'un déficit enzymatique ; et (*iv*) **l'hypoxie hypoxique**, provoquée par des problèmes ventilatoires, d'apnée ou une montée en altitude, et qui affecte de ce fait la pression partielle (Pa) en O_2.

L'hypoxie peut également être qualifiée d'aiguë pour une durée allant de quelques secondes à minutes, ou de chronique si elle persiste de plusieurs heures à plusieurs jours. De plus, lorsque le niveau d'O_2 est diminué et constant, on parle d'hypoxie continue (HC ; Figure 17), alors que si les épisodes hypoxiques sont séparés de périodes de réoxygénation, l'hypoxie est définie comme intermittente (HI ; Figure 17). Cette classification est essentielle dans la mise en place de traitements post-hypoxiques car, selon son origine et sa fréquence, une carence en O_2 peut induire des stratégies de défense différentes de la part de l'organisme et/ou provoquer des altérations cellulaires spécifiques.

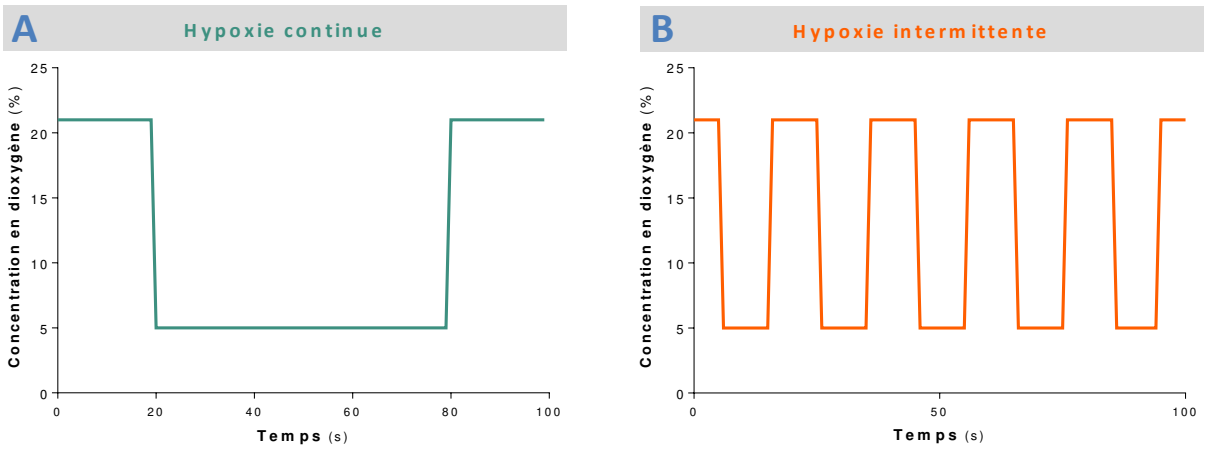


Figure 17 ◆ Représentation schématique d'une hypoxie continue (A) et d'une hypoxie intermittente (B).

2. LES REPONSES CELLULAIRES A L'HYPOXIE

2.1 LES REPONSES SYSTEMIQUES

Les différentes réponses systémiques résultent de la détection de la diminution du niveau d'O_2 par différents systèmes chémosensoriels. A terme, elles ont pour but de moduler la fréquence ventilatoire et la circulation sanguine par l'intermédiaire du système sympathique pour permettre un apport optimal en O_2 aux tissus qui en sont privés. Ces réactions cardiorespiratoires sont provoquées directement grâce aux cellules musculaires lisses vasculaires ou indirectement *via* des chémorécepteurs.

Ainsi il a été démontré que l'hypoxie est capable de moduler l'activité des canaux potassiques des myocytes lisses. Cette action peut entraîner soit une vasoconstriction au niveau pulmonaire, soit une vasodilatation dans les autres vaisseaux (Yuan et al., 1990). Le phénomène vasoconstricteur semble lié à une modification de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries en situation de stress hypoxique (Archer et al., 2000). En effet, certains canaux potassiques sont sensibles au potentiel oxydoréducteur environnemental du fait de leur composition riche en cystéines, les faisant s'ouvrir ou se fermer selon leur état respectivement oxydé ou réduit (Figure 18). La perturbation du potentiel membranaire et la dépolarisation qui en résulte stimulent les canaux calciques voltage-dépendants, aboutissant à une augmentation de la concentration du calcium cytosolique. Ce dernier, en se fixant sur la calmoduline, active alors les kinases des chaînes légères de myosine. La myosine phosphorylée peut ainsi se lier à l'actine, changer de conformation, et induire la contraction de la fibre musculaire (Figure 18). Cette vasoconstriction rapide au sein des artères pulmonaires en hypoxie permet de répartir le sang dans les alvéoles les mieux ventilées (Dunham-Snary et al., 2017). A l'inverse, la vasodilatation hypoxique, particulièrement présente dans les vaisseaux coronaires et cérébraux, serait liée à la diminution de la production d'adénosine triphosphoate (ATP) induite par le manque d'O_2, entraînant l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants. Ce mécanisme, bien que décrit chez le Porc (Dart and Standen, 1995), reste aujourd'hui discuté car il n'a pas été retrouvé chez d'autres espèces comme le Hamster (Jackson, 2000). En revanche, il a été démontré que le monoxyde d'azote (NO) produit par les cellules endothéliales ou libéré par l'hémoglobine désoxygénée participe à la vasodilatation vasculaire en diminuant le taux de calcium intracellulaire (Crawford, 2006; Dinenno, 2016). De plus, cet effet pourrait être exacerbé par une intervention conjointe des prostaglandines et/ou des récepteurs β-adrénergiques (Weisbrod et al., 2001; Crawford, 2006).

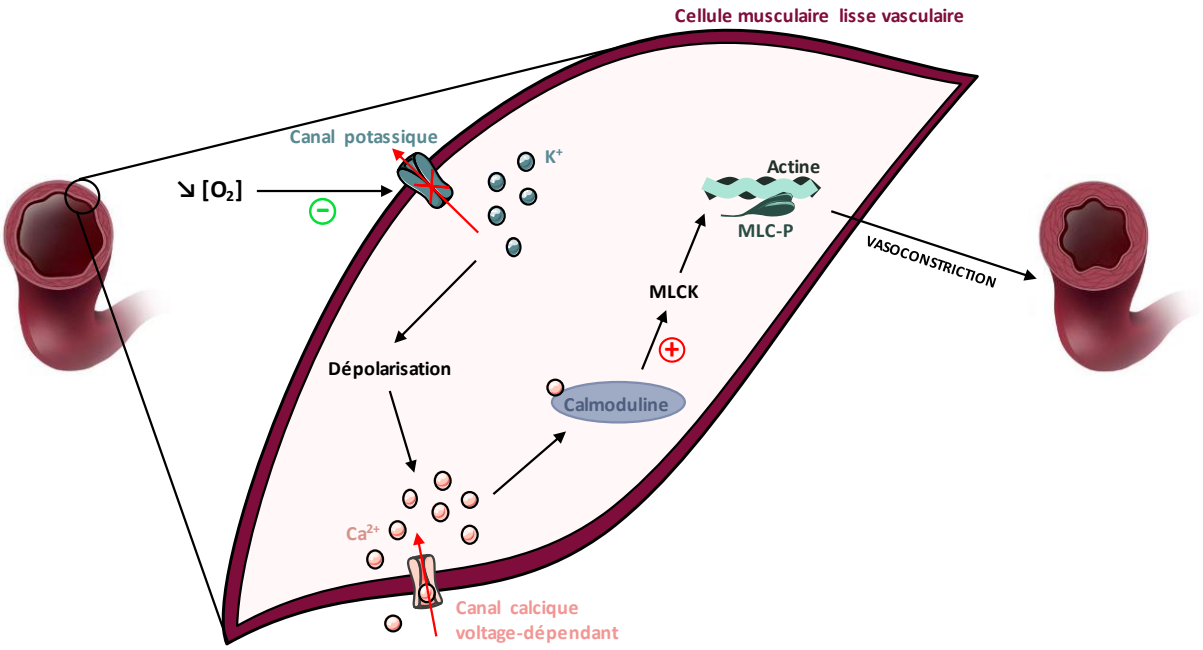


Figure 18 ◆ Représentation des mécanismes de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique. Le manque de dioxygène provoque la fermeture des canaux potassiques sur les membranes des cellules musculaires lisses vasculaires. L'accumulation intracellulaire de potassium induit alors une dépolarisation qui entraîne un influx d'ions calcium qui se lient à la calmoduline, pouvant alors stimuler la MLCK. Cette dernière active les chaînes légères de myosine, qui créent un complexe avec l'actine et provoquent la contraction de la cellule, à l'origine de la vasoconstriction. Ca^{2+} : calcium ; MLC-P : *phosphorylated myosin light chain* ; MLCK : *myosin light chain kinase* ; K^+ : potassium ; O_2 : dioxygène.

Les réponses hypoxiques systémiques sont également médiées de façon indirecte par des chémorécepteurs localisés dans les corpuscules carotidiens et neuroépithéliaux. Les corpuscules carotidiens sont des structures richement vascularisées et localisées à la bifurcation des artères carotides communes. Ce sont les plus rapides à répondre et ils détectent les changements d'oxygénation au niveau artériel (Peers and Kemp, 2001). Au sein de ces glomus, les cellules de type I, dérivées de la crête neurale, représentent les éléments sensoriels qui, en réponse à l'hypoxie, vont délivrer de l'ATP et des neurotransmetteurs, comme la catécholamine ou l'acétylcholine (Zhang et al., 2000). Cette libération permet d'initier la transmission du signal vers les fibres afférentes du nerf glossopharyngien jusqu'au SNC. Les corpuscules neuroépithéliaux sont, quant à eux, situés au sein des bifurcations des voies respiratoires et détectent des diminutions d'O_2 dans l'air inspiré (Peers and Kemp, 2001). Les cellules qui les composent, également dérivées de neurones, transmettent l'information aux centres respiratoires *via* le nerf vague (Figure 19 ; Van Lommel et al., 1998).

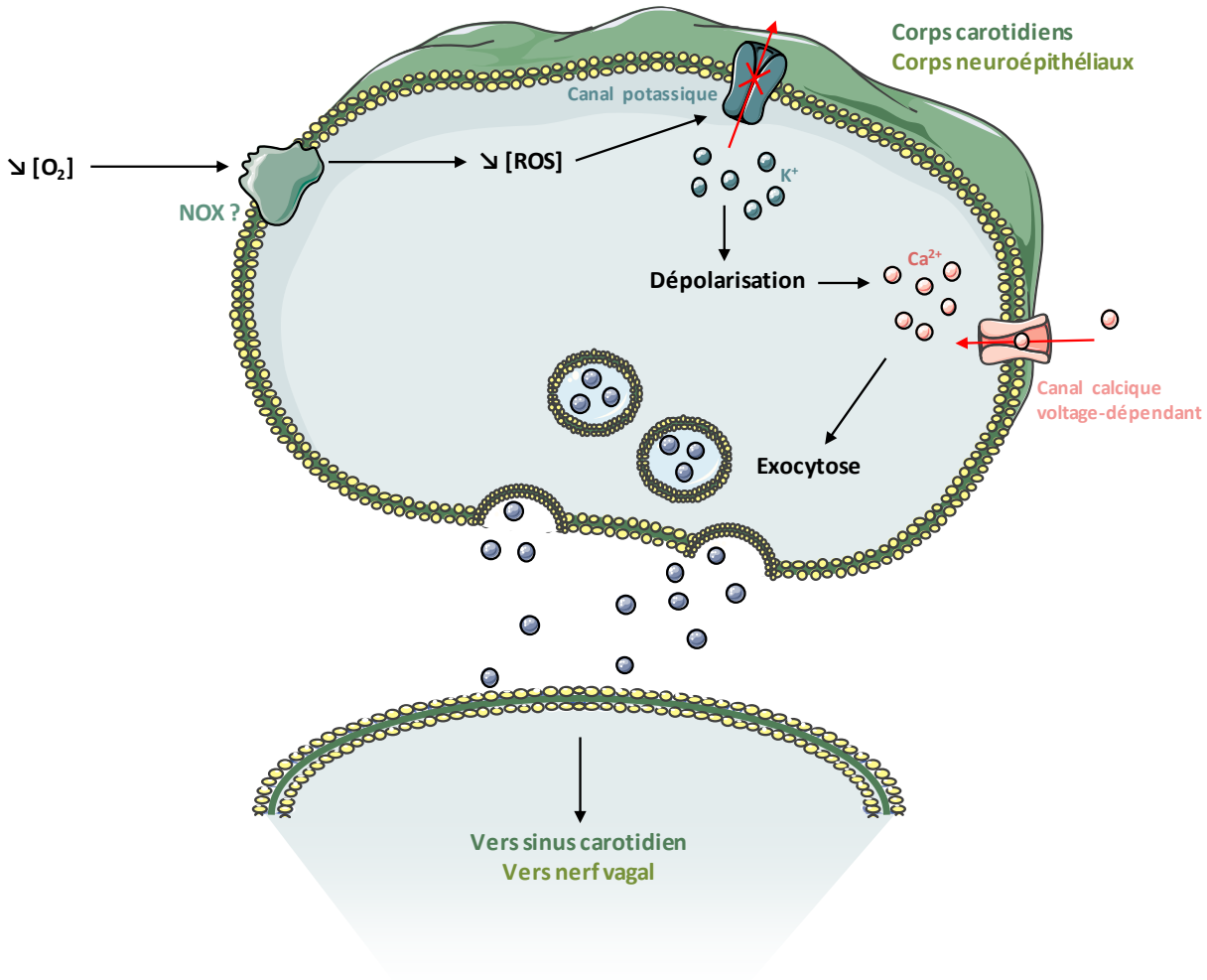


Figure 19 ◆ Représentation des mécanismes de réponse des chémorécepteurs périphériques. En hypoxie, le manque d'oxygène inhibe la production de ROS par des enzymes telles que la NOX, entraînant ainsi la fermeture du canal potassique. L'accumulation intracellulaire de potassium induit alors une dépolarisation qui provoque un influx d'ions calcium, à l'origine de l'exocytose de différents neurotransmetteurs. Ceux-ci permettent de propager le signal vers le sinus carotidien pour les corps carotidiens et en direction du nerf vagal pour les corps neuroépithéliaux. Ca^{2+} : calcium ; K^+ : potassium ; NOX : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase ; O_2 : dioxygène ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.

Bien qu'il ait été démontré que la réponse à l'hypoxie fait intervenir des canaux potassiques au sein de ces deux types de chémorécepteurs, les mécanismes cellulaires précis sont encore en cours d'investigation. L'hypothèse principale suggère qu'une hémoprotéine, et plus particulièrement la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NOX) associée au canal potassique, sert de capteur d'oxygénation (Figure 19 ; Lahiri et al., 1999; Fu et al., 2000; O'Kelly et al., 2000). En condition normoxique, cette enzyme permet la production de ROS qui maintiennent un état d'oxydoréduction favorable à l'activité du canal potassique. En revanche, l'hypoxie provoque une diminution de la disponibilité en O_2 pour l'enzyme. De ce fait, celle-ci n'est plus en mesure de

produire suffisamment de ROS, entraînant l'inhibition du canal potassique (Figure 19). Si cette hypothèse est globalement validée pour les corps neuroépithéliaux, elle reste cependant discutée pour les glomus carotidiens, où d'autres hémoprotéines telles que l'oxyde nitrique synthase (NOS) ou l'hème oxygénase pourraient également jouer ce rôle d'initiateur (Prabhakar, 1999; Summers et al., 1999).

Par ailleurs, dans des pathologies impliquant des hypoxies intermittentes, telles que l'apnée du sommeil, ces réponses systémiques sont répétées, entraînant une exacerbation des réactions de l'organisme. Ainsi, des études indiquent que la réponse ventilatoire est potentialisée chez des patients apnéiques et des modèles animaux d'apnée (Lee et al., 2009). Ce phénomène, appelé facilitation à long terme, serait lié à une modification de l'activité des corpuscules carotidiens. En effet, il a été démontré que la sensibilité de ces derniers augmente lors d'une HI chronique (Peng et al., 2001), et qu'une stimulation répétée des chémorécepteurs carotidiens mime la réponse ventilatoire induite par l'apnée (Dwinell et al., 1997). De plus, ces mécanismes sont accompagnés d'une augmentation de la pression sanguine et d'une stimulation de l'activité nerveuse sympathique et phrénique (Fletcher et al., 1992; Greenberg et al., 1999). Il en résulterait un processus de rétrocontrôle positif menant à une hyperventilation.

2.2 LES REPONSES CEREBRALES

2.2.1 EFFETS SUR LE METABOLISME

Le SNC, en tant que plus gros consommateur d'O_2 de l'organisme, est particulièrement sensible à l'hypoxie. En réponse à une déplétion en O_2, les neurones comme les cellules gliales ont donc développé des stratégies d'adaptation rapide grâce, d'une part, à des mécanismes anaérobiques et, d'autre part, à une diminution de leur activité métabolique.

Une des premières conséquences de la chute du taux d'O_2 est une altération du processus de phosphorylation oxydative au sein de la chaîne respiratoire. L'inhibition de la respiration mitochondriale provoque alors un déficit en ATP, que les cellules tentent de compenser en favorisant des processus métaboliques anaérobiques tels que la glycolyse. Ainsi, la variation du ratio adénosine monophosphate (AMP)/ATP en faveur de l'AMP entraîne l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK ; Figure 20 ; Zhang et al., 2010), qui permet de passer de processus anaboliques qui consomment de l'ATP à des mécanismes cataboliques qui en produisent (Hardie, 2000). Pour ce faire, cette enzyme active la phosphofructokinase-2 (PFK-2) qui catalyse la conversion du fructose-2,6-

bisphosphate en fructose-6-phosphate (Figure 20). Or, ce dernier représente un activateur allostérique de la phosphofructokinase-1, qui intervient dans la chaîne de réactions glycolytiques responsable de la formation de deux molécules d'ATP (Figure 20). De plus, l'AMPK favorise la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 à la membrane plasmique, facilitant ainsi l'apport cellulaire en glucose et donc la glycolyse (Ashrafi et al., 2017). Cependant, le rendement glycolytique reste très largement inférieur à celui de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui permet de produire environ quinze fois plus d'ATP. De plus, le métabolisme anaérobique induit une acidification du pH intracellulaire qui, à terme, inhibe la glycolyse et donc diminue la quantité d'énergie produite par la cellule (Peña and Ramirez, 2005). De ce fait, la glycolyse reste une solution temporaire et la survie neuronale doit s'appuyer sur d'autres stratégies.

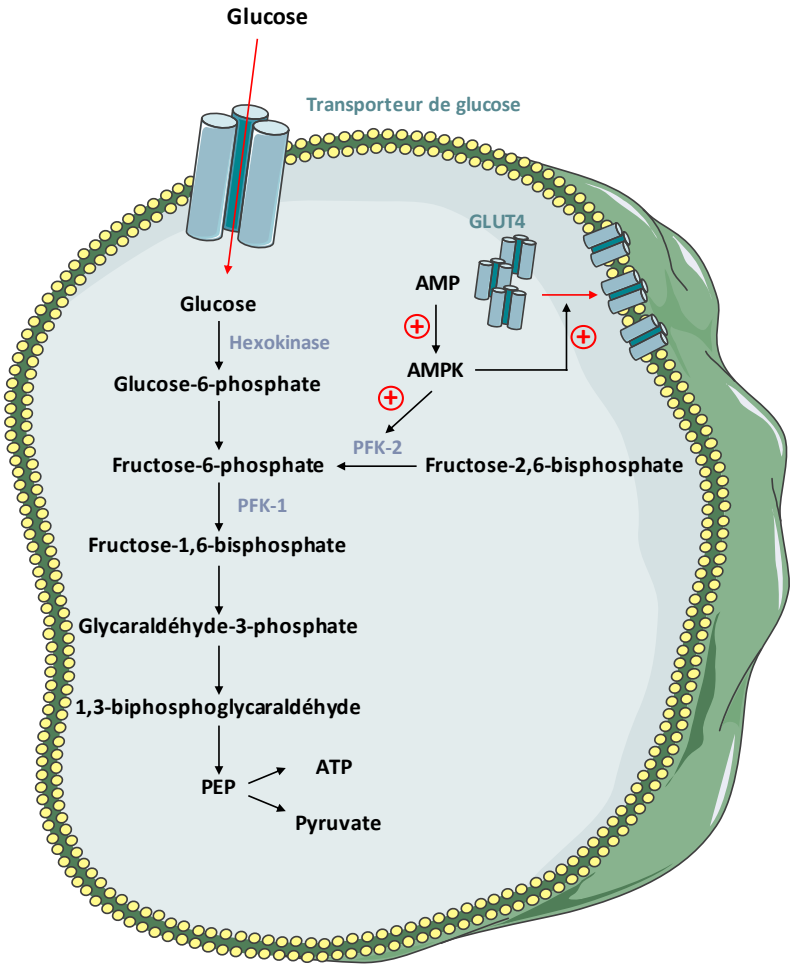


Figure 20 ◆ Représentation de la cascade glycolytique induite en hypoxie. L'augmentation de l'AMP en condition hypoxique active l'AMPK qui favorise la glycolyse, d'une part en stimulant la translocation des transporteurs de glucose à la membrane plasmique et, d'autre part, en activant la phosphofructokinase-2 qui participe à la glycolyse.
AMP : adénosine monophosphate ; AMPK : *AMP-activated protein kinase* ; ATP : adénosine triphosphate ; GLUT4 : transporteur de glucose 4 ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PFK-1 : phosphofructokinase-1 ; PFK-2 : phosphofructokinase-2.

L'une de ces approches consiste à inhiber sélectivement différents processus consommateurs d'énergie. A titre d'exemple, en cas d'hypoxie, la traduction est ralentie par l'AMPK qui, en phosphorylant le facteur d'initiation *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E), l'empêche de se lier à la coiffe 5' UTR des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et limite ainsi le recrutement des ribosomes (Zhu et al., 2016). D'autres phénomènes comme la transcription et la synthèse de lipides ou d'acides gras sont également ralentis, préservant de ce fait les molécules d'ATP pour des mécanismes essentiels à la survie neuronale, tels que les échanges ioniques qui maintiennent le potentiel membranaire indispensable à l'activité des réseaux neuronaux (Michiels, 2004; Peña and Ramirez, 2005).

2.2.2 EXCITOTOXICITE & MORTS CELLULAIRES

L'homéostasie neuronale implique un maintien du potentiel membranaire faisant notamment appel aux pompes Na^+/K^+-ATPase. Sachant que ces pompes consomment à elles seules plus de la moitié de l'énergie cellulaire (Rolfe and Brown, 1997), il est donc facile de concevoir que le déficit d'ATP induit par l'hypoxie (cf. Chapitre II.2.2.1) entraîne leur défaillance et donc une dépolarisation membranaire. Il est ainsi estimé que la concentration d'ATP diminue de 90 % en 5 minutes au sein des neurones, et que les pompes Na^+/K^+-ATPase ne sont plus efficaces sous un seuil de 50 % d'ATP (Knickerbocker and Lutz, 2001). La dépolarisation entraîne alors rapidement une accumulation de sodium intracellulaire et un œdème cellulaire résultant d'un influx d'eau. L'hypoxie peut de ce fait induire une mort rapide de la cellule par nécrose (Figure 21).

De plus, même chez les neurones épargnés par ce phénomène nécrotique, ces processus vont induire des altérations aboutissant à une excitotoxicité cellulaire. En effet, l'influx de sodium conduit à une libération de glutamate par l'intermédiaire des co-transporteurs de glutamate et sodium (Figure 21 ; Rossi et al., 2000). Parallèlement, la dépolarisation membranaire est responsable de l'activation de canaux calciques voltage-dépendants, et l'influx calcique qui en résulte provoque une exocytose massive de neurotransmetteurs dont le glutamate (Figure 21). De plus, en conditions hypoxiques, ce dernier ne peut être recapturé par les transporteurs GLAST-1 et GLT-1, dont l'expression astrocytaire est inhibée par le manque d'O_2 (Figure 21 ; Dallas et al., 2007). Ainsi, l'accumulation de glutamate extracellulaire stimule de façon excessive les récepteurs NMDA qui, *via* un important influx de calcium, entraînent l'activation de différentes enzymes telles que des protéases ou endonucléases dégradant les composants cellulaires (Figure 21). L'influx calcique induit également une dépolarisation de la membrane mitochondriale, menant à une interruption du métabolisme énergétique de l'organite et par conséquent à une diminution de la production d'ATP.

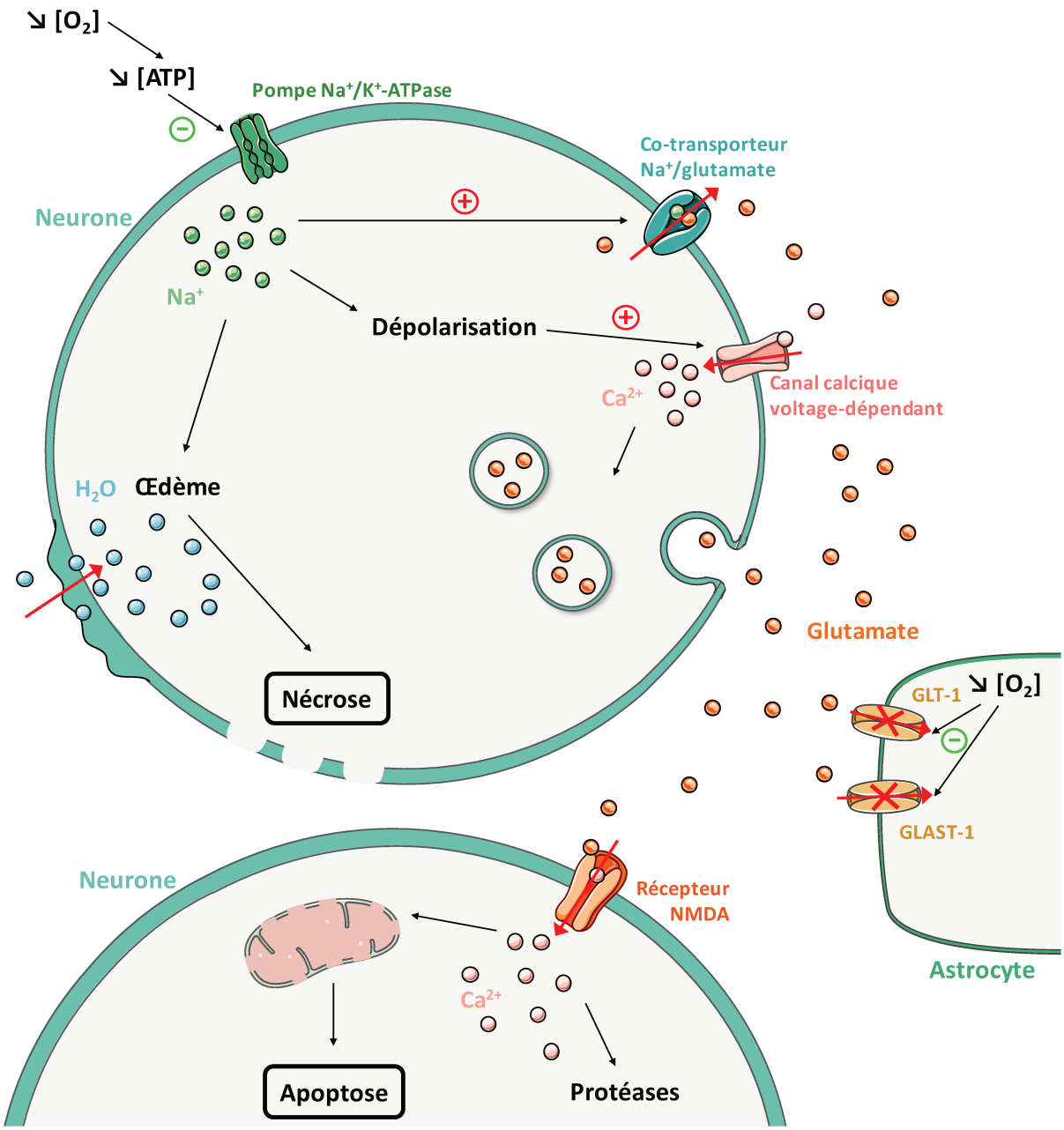


Figure 21 ◆ Représentation des cascades nécrotiques et apoptotiques. L'hypoxie entraîne une diminution d'ATP et une défaillance de la pompe Na^+/K^+/ATP-ase, à l'origine d'une accumulation de sodium intracellulaire. Ce dernier peut entraîner un œdème menant à une mort de la cellule par nécrose. Par ailleurs, l'influx de calcium dû à la dépolarisation entraîne une libération de glutamate, également relâché par le biais des co-transporteurs de sodium et de glutamate. La recapture de ce neurotransmetteur par les astrocytes est cependant inhibée en hypoxie, facilitant ainsi l'activation des récepteurs NMDA neuronaux, qui mène à la dégradation du contenu intracellulaire et à la rupture de la membrane mitochondriale. Ce phénomène provoque une mort cellulaire par apoptose. ATP : adénosine triphosphate ; Ca^{2+} : calcium ; GLAST-1 : *glutamate aspartate transporter 1* ; GLT-1 : *glutamate transporter 1* ; H_2O : eau ; K^+ : potassium ; Na^+ : sodium ; NMDA : *N*-méthyl-D-aspartate ; O_2 : dioxygène.

A terme, l'altération du fonctionnement de la mitochondrie provoque une rupture de sa membrane, libérant ainsi différents facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol (Andreyev et al., 2018). Parmi eux, on retrouve notamment le cytochrome c ou encore l'*apoptosis inducing factor* (AIF) qui induisent une mort cellulaire programmée, respectivement dépendante ou non des caspases (Figure 21). La perte d'intégrité de la membrane mitochondriale conduit également à la libération de ROS dans le cytosol, participant aux mécanismes du stress oxydatif (cf. Chapitre II.2.2.3) (Zorov et al., 2014).

Enfin, l'activation de l'AMPK induite par l'hypoxie inhibe le complexe *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1), initiant ainsi le mécanisme d'autophagie. En effet, mTORC1 devient incapable d'inactiver la protéine *uncoordinated-51-like autophagy activating kinase* (ULK) 1 qui peut alors former un premier complexe ULK. Celui-ci en recrute un second nommé *class III phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K-III), comprenant entre autres la protéine bécline-1, afin de constituer un phagophore dont l'expansion donnera finalement naissance à un autophagosome. Cette vésicule emprisonne du matériel cytoplasmique et fusionne avec un lysosome afin de créer un autolysosome, dans lequel les éléments cellulaires seront hydrolysés. Ces phénomènes peuvent, en fonction de la sévérité de l'hypoxie, induire une mort autophagique ou à l'inverse contribuer à la survie cellulaire en dégradant des composants cytosoliques délétères et notamment réguler la concentration intracellulaire de ROS (Cao et al., 2017; Fang et al., 2017).

2.2.3 STRESS OXYDATIF

Au sein de l'organisme, l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'azote (RNS) ou de l'oxygène et le système antioxydant est essentiel au bon fonctionnement des processus physiologiques, et une perturbation de ces mécanismes peut mener à un stress oxydatif. En conditions physiologiques, la production de ROS se déroule essentiellement au sein de la mitochondrie lors de la réduction de l'O_2 en eau par la phosphorylation oxydative. Ainsi, au niveau des complexes I et III des chaînes de transport d'électrons, environ 2 % de l'oxygène mitochondrial est réduit en radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), qui est lui-même neutralisé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), plus stable, par des systèmes antioxydants comme les superoxydes dismutases (SOD) (Chen et al., 2003; Hirst et al., 2008). Il peut alors produire de l'eau, soit en subissant une dismutation par l'intermédiaire de la catalase (CAT), soit après réduction par la glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion (GSH). Cependant, bien que ne s'agissant pas d'un radical libre, l'H_2O_2 s'avère également délétère car il peut générer d'autres ROS *via* la réaction de Fenton qui le transforme en hydroxyle ($^{\cdot}OH$), espèce la plus oxydante (Thomas et al., 2009). De plus, d'autres mécanismes cellulaires permettent la production de ROS, notamment grâce aux NOX membranaires qui réduisent l'O_2 en

$O_2^{\cdot -}$, ou encore à d'autres enzymes telles que les xanthine oxydases (XO) ou les cythochromes P450. Les RNS sont, quant à eux, liés à l'activité de NOS qui peuvent être neuronales (nNOS), endothéliales (eNOS), mitochondriales (mtNOS) ou encore inductibles (iNOS). Ces enzymes produisent en effet du NO qui donne naissance à différents radicaux, comme le peroxynitrite ($ONOO^-$), le nitrite (NO^{2-}) ou encore le nitrate (NO^{3-}).

L'hypoxie et la phase de réoxygénation qui s'ensuit induisent une variation très rapide de la disponibilité cellulaire en O_2 dont l'amplitude dépend de la sévérité et de la durée de la carence. Celle-ci entraîne alors un déséquilibre entre les systèmes pro- et antioxydants, qui s'illustre par une surproduction et une accumulation de ROS en amont du dernier complexe de la chaîne mitochondriale. Cela cause également une augmentation de la synthèse de RNS par la iNOS (Spandou et al., 1999). De plus, ce système est exacerbé par l'influx de calcium induit par l'hypoxie (cf. Chapitre II.2.2.2), qui modifie la perméabilité membranaire des mitochondries en induisant une augmentation à la fois de la production et de la libération cytosolique de ROS (Hansson et al., 2008; Seidlmayer et al., 2015).

Le stress oxydatif est à l'origine de mécanismes cellulaires délétères tels que l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés ou des peptides, entraînant leur séparation et, à terme, la formation de protéines carbonylées. Ces dernières sont alors plus susceptibles d'être dégradées et moins actives. Une autre conséquence majeure du stress oxydatif est la peroxydation des lipides polyinsaturés, notamment présents dans les membranes cellulaires dont les propriétés de perméabilité et d'excitabilité se retrouvent de ce fait altérées (Borst et al., 2000). De plus, la dégradation de ces lipides peroxydés génère des molécules toxiques, telles que le malondialdéhyde (MDA) pouvant réagir avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou les protéines et affecter leurs fonctions (Gaschler and Stockwell, 2017).

2.2.4 TRANSMISSION SYNAPTIQUE

Il existe, au sein du SNC, un mécanisme de défense permettant de pallier une éventuelle excitotoxicité liée à des transmissions synaptiques exacerbées. Un des principaux acteurs de cette neurotransmission est l'adénosine, notamment *via* ses récepteurs A_1 couplés à des protéines inhibitrices G_i ou G_o pour lesquelles il présente une forte affinité (Figure 22 ; Dunwiddie and Masino, 2001). Ce nucléoside est produit majoritairement par les neurones, mais aussi par les cellules gliales, soit directement, soit après hydrolyse de l'ATP extracellulaire (Parkinson et al., 2002; Wall and Dale, 2008). L'adénosine est libérée dans l'espace extracellulaire par des transporteurs de nucléosides, dont l'*equilibrative nucleoside transporter 1* (ENT1) qui est le plus répandu dans le cerveau et

participe à la régulation des concentrations intra- et extracellulaires du neurotransmetteur. La fixation de l'adénosine sur les récepteurs A_1 stimule des canaux potassiques à rectification interne participant à la stabilisation du potentiel de repos, bloquant ainsi la propagation de potentiels d'action (Figure 22 ; Lüscher et al., 1997). De plus, elle inhibe l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'ATP en AMP cyclique, préservant donc le *pool* d'énergie intracellulaire. Cette cascade cellulaire conduit également à l'inactivation de la protéine kinase A (PKA) et des canaux calciques, entraînant une réduction de la concentration intracellulaire en calcium et donc de la libération de neurotransmetteurs (Figure 22).

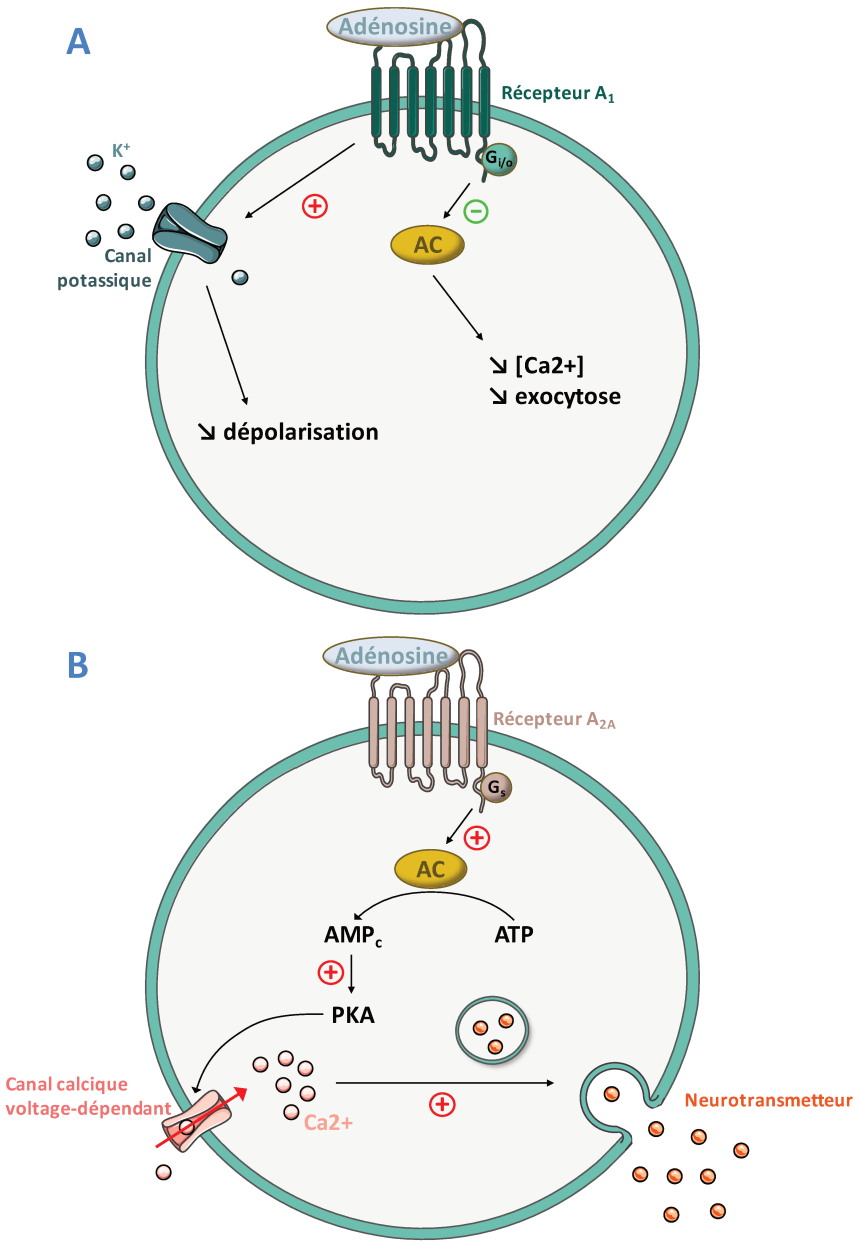


Figure 22 ◆ Représentation schématique des cascades déclenchées par la fixation de l'adénosine sur ses récepteurs A_1 (A) et A_{2A} (B) en hypoxie. AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; Ca^{2+} : calcium ; K^+ : potassium ; PKA : protéine kinase A.

Grâce à ces mécanismes, l'adénosine serait capable de protéger les neurones d'une mort induite par une hypoxie. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré que l'application d'antagonistes des récepteurs A_1 augmente la mort cellulaire dans l'hippocampe dans un modèle d'ischémie (Rudolphi et al., 1987; Olsson et al., 2004), tandis que des agonistes favorisent au contraire la survie cellulaire (Bischofberger et al., 1997). Cependant, en hypoxie, les ENT1 neuronaux favorisent la recapture d'adénosine, réduisant la fixation du neurotransmetteur sur ses récepteurs A_1 et inhibant ainsi la neuroprotection (Zhang et al., 2011). Le rôle protecteur de l'adénosine reste ainsi ambigu, notamment à cause de sa capacité à fixer un autre récepteur appelé A_{2A}. Celui-ci est couplé à une protéine G_S qui active l'AC et mène à terme à la libération de neurotransmetteurs (Figure 22). Or, plusieurs études ont montré que tant les agonistes (Melani et al., 2014) que les antagonistes (Bona et al., 1997; Yang et al., 2013) du récepteur A_{2A} sont à même de réduire les dommages liés à une ischémie-hypoxique.

Enfin, un mécanisme impliquant le récepteur au complément CR3 a été décrit comme intervenant dans la régulation de la transmission synaptique lors d'une hypoxie. En effet, une carence en O_2 peut provoquer une inflammation responsable de l'activation du CR3. Ce dernier, en stimulant la NOX, entraîne une production d'$O_2^{\cdot -}$ qui, à son tour, active la protéine phosphatase 2A. A terme, l'inflammation induit une phosphorylation de la *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1* (GluR1) qui provoque l'internalisation des récepteurs AMPA et conduit à une dépression à long-terme (Zhang et al., 2014).

2.2.5 MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES

Si les réponses liées à l'hypoxie évoquées jusqu'à présent font intervenir des réactions cellulaires rapides, des conséquences transcriptionnelles à long terme peuvent également être observées. Elles sont notamment médiées par l'*hypoxia inducible factor 1* (HIF-1), un complexe hétérodimérique composé de deux facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice : HIF-1β, constitutivement exprimé et localisé au sein du noyau cellulaire, et HIF-1α, cytosolique. Ce dernier possède un taux d'ARNm stable alors que la protéine a une demi-vie inférieure à 5 minutes (Huang et al., 1996). En effet, en présence d'O_2, HIF-1α est hydroxylé par des protéines à domaines prolyl-hydroxylase (PHD) dépendantes de l'O_2 au niveau de deux résidus proline, ce qui permet la fixation de la protéine von Hippel-Lindau (VHL ; Figure 23). Ce complexe active alors une ubiquitine ligase E3 entraînant la dégradation du facteur de transcription par le protéasome. En revanche, l'hypoxie inhibe les prolyl hydroxylases, empêchant ainsi la fixation d'HIF-1α à la protéine VHL et par conséquent sa dégradation (Ivan et al., 2001).

De plus, alors que la plupart des processus de synthèse protéique sont réduits en hypoxie du fait de l'inhibition de la fixation de la coiffe (cf. Chapitre II.2.2.1), l'ARNm d'HIF-1α possède un site d'entrée interne pour le ribosome à son extrémité 5' UTR, lui permettant une traduction indépendante (Lang et al., 2002). HIF-1α s'accumule alors dans le cytoplasme de la cellule, puis est transloqué au noyau où il se lie à un co-activateur *CREB-binding protein* (CBP)/p300, puis aux séquences *hypoxia response element* (HRE) de certains gènes (Figure 23). HIF-1α permet ainsi l'expression de gènes neuroprotecteurs codant le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) favorisant l'angiogenèse, la NOS qui induit une vasodilatation, des enzymes de la glycolyse comme la PFK2 ou des transporteurs de glucose GLUT4 et GLUT1 (Semenza et al., 1994; Forsythe et al., 1996). De plus, il induit l'expression de la protéine *B-cell lymphoma 2 interacting protein 3* (BNIP3) qui peut entraîner une autophagie mitochondriale (ou mitophagie) permettant de réduire la concentration de ROS (Zhang et al., 2008), ou au contraire une mort cellulaire autophagique si le stress oxydatif s'avère trop délétère (Azad et al., 2008).

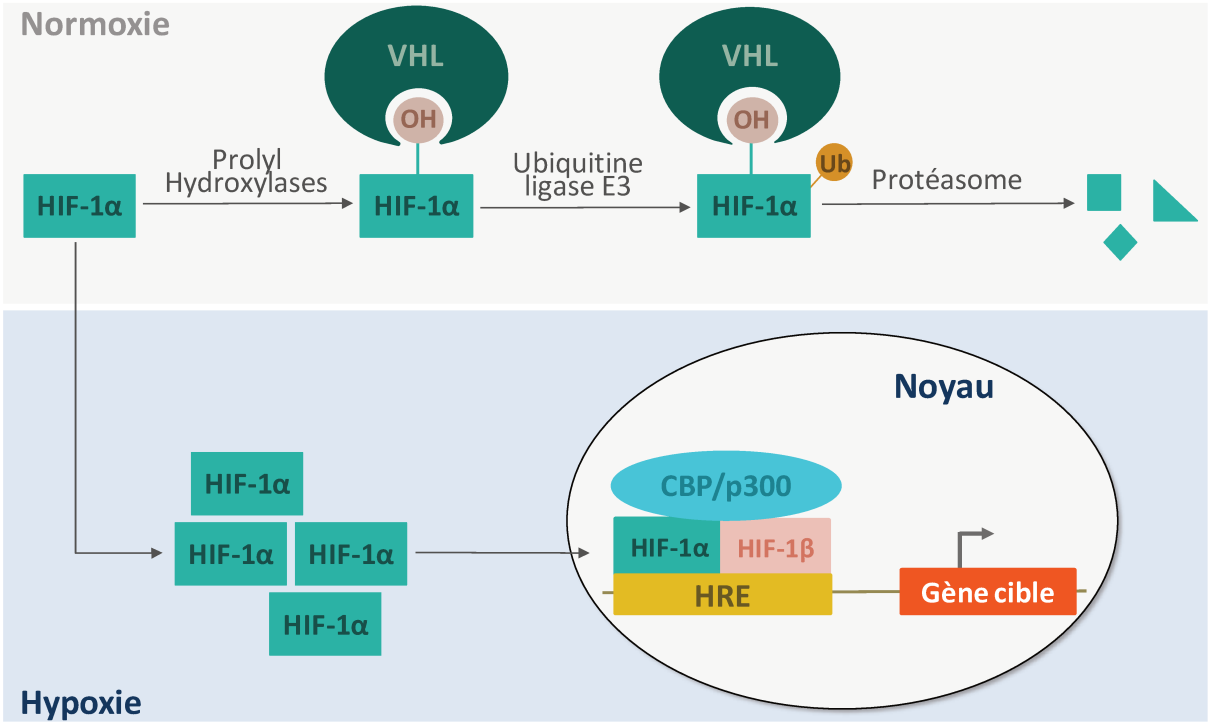


Figure 23 ◆ Représentation schématique de la régulation du facteur de transcription HIF-1α en normoxie et en hypoxie.

CBP : *CREB-binding protein* ; HIF-1α : *hypoxia inducible factor 1 alpha* ; HIF-1β : *hypoxae inducible factor 1 beta* ; HRE : *hypoxia response element* ; VHL : von Hippel-Lindau ; Ub : ubiquitine.

Par ailleurs, s'il a été montré que HIF-1α est activé par une hypoxie aiguë, le *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) voit, quant à lui, son activité préférentiellement induite lors d'une HI chronique (Ryan et al., 2005). Ce facteur de transcription possède des signaux de localisation nucléaire qui sont masqués par la protéine inhibitrice *nuclear factor-kappa B inhibitor alpha* (IκBα) en conditions physiologiques, le retenant ainsi dans le cytosol. La translocation de NF-κB est alors contrôlée par le complexe IκB kinase (IKK), capable de phosphoryler et de dégrader IκBα. Or, lors d'une hypoxie, IKK est stabilisé *via* deux mécanismes : d'une part, la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante II (CaMKII), activée par l'augmentation de calcium intracellulaire, phosphoryle le *transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1) qui stimule à son tour IKK ; d'autre part, la carence en O_2 inhibe les PHD qui, en normoxie, dégradent IKK (Figure 24). Les signaux de localisation nucléaire sont alors démasqués et NF-κB est transloqué au sein du noyau où il peut induire l'expression de différentes protéines (Figure 24). Parmi elles, on retrouve notamment l'interleukine (IL) 8 promotrice de l'angiogenèse ou encore la protéine anti-apoptotique *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2 ; Glasgow et al., 2001; Culver et al., 2010). Il a également été montré que NF-κB agit sur le métabolisme énergétique en permettant la transcription du gène HIF-1α et donc à terme la glycolyse (Rius et al., 2008). Enfin, NF-κB représente un acteur majeur des réponses immunitaires, induisant l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et chimiokines.

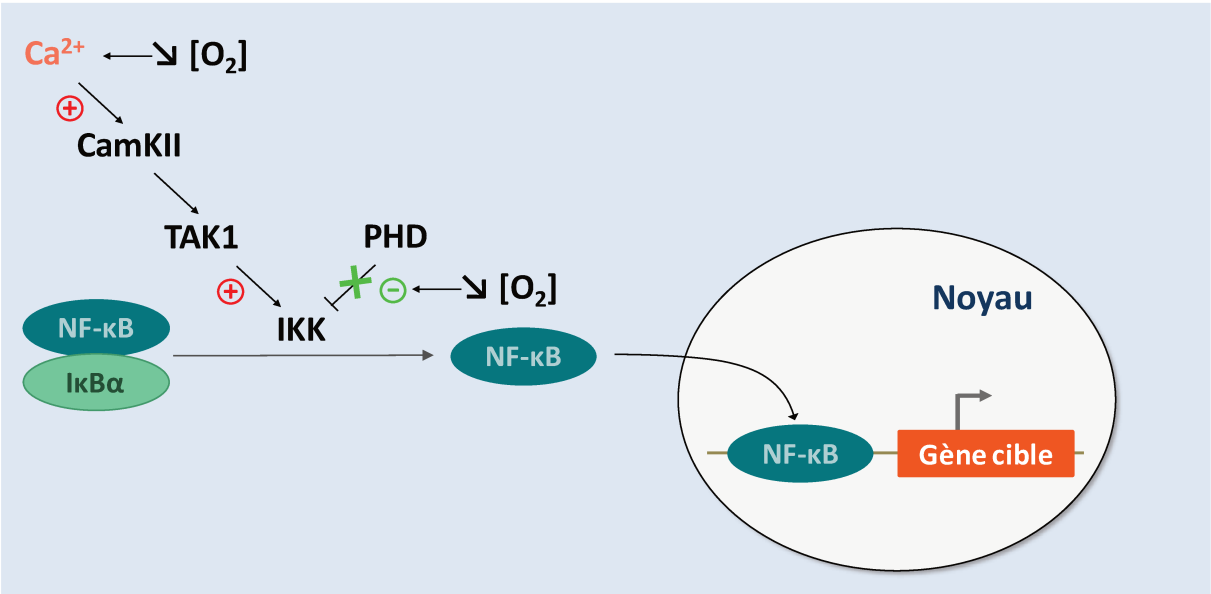


Figure 24 ◆ Représentation schématique de la régulation du facteur de transcription NF-κB en hypoxie. Ca^{2+} : calcium ; CamKII : protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante II ; IκBα : *nuclear factor-kappa B inhibitor alpha* ; IKK : IκB kinase ; O_2 : dioxygène ; PHD : prolyl hydroxylase ; NF-κB : *nuclear factor-kappa B* ; TAK1 : *transforming growth factor beta-activated kinase 1*.

2.2.6 NEUROINFLAMMATION

Une autre conséquence du manque d'O_2 est une neuroinflammation qui peut se produire après un seul événement d'hypoxie et de réoxygénation (Wang and Wang, 2007), ou suite à des épisodes répétés d'HI (Gozal et al., 2002; Smith et al., 2013). Ce phénomène est médié par la microglie, qui se trouve activée par différents facteurs.

Tout d'abord, l'hypoxie induit une inflammation périphérique associée à l'expression de molécules pro-inflammatoires. Celles-ci peuvent pénétrer dans le SNC grâce à des mécanismes de transport actif (Gutierrez et al., 1993) ou au niveau des organes circumventriculaires dépourvus d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) (Wilson et al., 2002). De plus, certaines cytokines périphériques sont à l'origine d'une altération de la BHE, facilitant ainsi l'entrée et la propagation au niveau central de molécules, telles que le *tumor necrosis factor alpha* (TNFα) ou l'IL-1, conduisant à l'activation de la microglie synonyme de neuroinflammation (Lim and Pack, 2014).

Par ailleurs, des travaux ont permis de montrer que la mort neuronale directement induite par l'hypoxie (cf. Chapitre II.2.2.2) entraîne une libération de molécules comme (*i*) des ROS qui participent à l'activation microgliale en augmentant l'expression d'enzymes pro-inflammatoires telles que l'iNOS et (*ii*) des *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) tels que la protéine de choc thermique hsp60 ou la *high mobility group box 1* (Tsan and Gao, 2004; Pineau and Lacroix, 2009). Les DAMPs constituent des ligands pour le *toll like receptor 4* (TLR4) microglial, dont l'expression est exacerbée dans certains cas d'HI chronique (Smith et al., 2013). Ce récepteur initie alors une réponse immunitaire par le biais de l'inflammasome, complexe protéique se liant à la pro-caspase-1 et l'activant *via* un clivage. Cette dernière permet alors la libération des interleukines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 (Schroder and Tschopp, 2010). Par ailleurs, la fixation des DAMPs sur le TLR4 peut, *via* la protéine *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88), participer à l'activation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 connue pour stimuler le TNFα, l'iNOS et la caspase-11, et donc la réponse inflammatoire (Park et al., 2002; Kim et al., 2003). Enfin, il a été montré que la MAPK p38 peut également induire l'iNOS microgliale, produisant du NO à l'origine d'une mort neuronale (Park et al., 2002; Xu et al., 2006).

L'ensemble de ces mécanismes inflammatoires initiés par la microglie participe aux déficits fonctionnels et comportementaux observés après hypoxie en accentuant la mort neuronale (Li et al., 2004). Ils perpétuent en effet la neuroinflammation et créent un cercle vicieux d'autant plus délétère qu'il peut apparaître au cours du développement cérébral (Lehnardt et al., 2008).

3. L'HYPOXIE PERINATALE

3.1 LES CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE PENDANT LE DEVELOPPEMENT

Il a été démontré que l'hypoxie à laquelle est soumis le fœtus au cours de la grossesse est essentielle pour la formation de diverses structures cérébrales. Elle induit notamment l'expression de HIF-1α qui régule la mise en place de la vascularisation fœtale (Abbott and Buckalew, 2000) ou la survie neuronale (Tomita et al., 2003). Cependant, si cette hypoxie physiologique est exacerbée, elle devient délétère voire létale. Cette pathologie est en effet responsable d'un tiers des morts périnatales, représentant près de 3 millions de morts par an, et est impliquée dans 25 % des problèmes neurodéveloppementaux, tels que des déficits sensoriels, des retards moteurs ou encore des défauts d'apprentissage car elle perturbe la mise en place et la maturation de réseaux neuronaux (Verzeletti et al., 2016). L'hypoxie périnatale (HP) correspond à une déficience en oxygénation se produisant entre la 28ème SG et le 7ème jour postnatal. Elle peut avoir différentes origines selon le moment auquel elle survient : (*i*) en période prénatale, elle est nommée souffrance fœtale et est causée par un retard de croissance intra utérine, des anomalies du cordon ombilical, une pré-éclampsie ou encore une infection maternelle comme une hypertension ou un diabète gestationnel (Nalivaeva et al., 2018), (*ii*) à la naissance, elle est provoquée par un retard de respiration spontanée ou une procidence du cordon pendant l'accouchement, menant à une compression des vaisseaux sanguins (Nasiell et al., 2016), et enfin (*iii*) aux premiers stades de la vie postnatale, elle est également associée à une septicémie, une anémie, des apnées ou encore une prématurité (Kalteren et al., 2018).

Cette grande variabilité épidémiologique rend l'étude des conséquences d'une HP extrêmement compliquée. Des modèles animaux ont été développés mais, là encore, la diversité des protocoles empêche d'avoir une vue globale sur les effets neurodéveloppementaux d'une hypoxie. De plus, les HP auxquelles les animaux ont été soumis sont généralement très sévères et ne reflètent pas les incidents survenant chez les nouveau-nés (Fendt et al., 2008; Sathyanesan et al., 2018). Malgré tout, nous savons maintenant que les réponses cellulaires et les structures cérébrales touchées après l'hypoxie varient en fonction du stade auquel celle-ci survient. Ainsi une déficience en O_2 intra-utérine entraîne des réponses médiées par le placenta, à l'instar d'une angiogenèse placentaire augmentée et d'une redistribution de l'O_2 et de l'énergie en faveur de mécanismes de survie du fœtus (Ishimura et al., 2009). Cette répartition sélective implique également certains neurotransmetteurs comme l'adénosine, dont les concentrations sont augmentées en conditions hypoxiques (Park et al., 1987; Koos et al., 1994). Elle agit sur la modulation métabolique *via* ses récepteurs A_1 mais aussi sur la vasodilatation cérébrale par l'intermédiaire des récepteurs A_2 (Blood

et al., 2003). Au niveau cellulaire, il a été montré qu'une hypoxie entraîne une augmentation des ARNm de HIF-1α et GLUT3 au jour embryonnaire 14 (E14) mais pas à E19 (Royer et al., 2000). Par ailleurs, l'âge auquel survient l'hypoxie influence également les structures cérébrales touchées. Chez les prématurés, l'hypoxie atteint essentiellement la substance blanche périventriculaire en retardant ou arrêtant la différenciation des oligodendrocytes, en provoquant leur mort et celle de leurs précurseurs, réduisant donc la myélinisation (Back et al., 2002; Wellmann et al., 2015). A l'inverse, chez les nouveau-nés à terme, les structures cérébrales préférentiellement touchées sont le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum (Martinez-Biarge et al., 2010; Cooper et al., 2015; Singh et al., 2018). Enfin, l'HP semble également faciliter l'apparition de pathologies survenant à l'âge adulte comme les maladies neurodégénératives. En effet, une déficience en O_2 chez la Souris entre P7 et P20 induit des troubles typiques de la maladie d'Alzheimer, parmi lesquels une augmentation de l'expression de la protéine précurseur de l'amyloïde, une accumulation du peptide β-amyloïde ou encore des déficits mnésiques (Zhang et al., 2013). De plus, l'HP altère la réponse à l'hypoxie chez l'adulte en modifiant les afférences chémorespiratoires (Peyronnet et al., 2007), augmente la sensibilité des corps carotidiens et induit un stress oxydatif (Nanduri and Prabhakar, 2015).

Mais si les effets de l'HP sur le développement du cortex cérébral sont globalement décrits, il s'avère qu'un nombre restreint de travaux s'est intéressé à son impact sur le développement du cervelet. Une étude menée par Biran et *al*. (2011) a permis de montrer qu'une HP aiguë induit une réduction du volume cérébelleux, une diminution du nombre de cellules de Purkinje, et une hypomyélinisation chez la Souris. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle d'HP chronique, où la vulnérabilité des cellules de Purkinje est particulièrement accrue et se manifeste par une réduction de leur arborisation dendritique (Sathyanesan et al., 2018). Dans cette même étude, ces altérations histologiques entraînent des déficits comportementaux chez l'animal, dont des troubles moteurs et des déficits d'apprentissage à long terme. De même, du fait de leur complexité à mimer chez l'animal des hypoxies périnatales intermittentes, telles que l'apnée du nourrisson, leur impact sur le cerveau et le cervelet n'est que peu décrit dans la littérature.

3.2 L'APNEE DU PREMATURE

3.2.1 DEFINITION & EPIDEMIOLOGIE

L'apnée du nourrisson est une pathologie caractérisée par une cessation soudaine de la respiration durant au moins 20 secondes, associée ou non à une bradycardie ou une désaturation en O_2 (Eichenwald, 2016). Très souvent retrouvée chez les nourrissons nés avant terme et alors appelée apnée du prématuré (ADP), son incidence est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel et au

poids à la naissance. Ainsi, l'ADP survient chez 50 % des prématurés et quasiment 100 % des très grands prématurés nés avant la 28ème SG, et s'atténue dans 98 % des cas lorsque le terme corrigé est atteint (Henderson-Smart, 1981). Au cours de cette période, elle peut cependant provoquer des altérations développementales conséquentes.

Les apnées peuvent être de plusieurs types : *(i)* centrales et de courte durée (10 à 25 % des cas), lorsque les voies respiratoires sont dégagées mais qu'il n'y a pas d'effort respiratoire automatique, *(ii)* obstructives et plus longues (10 à 25 % des cas), quand l'air ne peut plus circuler dans les poumons à cause d'une obturation des voies respiratoires supérieures, et *(iii)* mixtes (50 à 75 % des cas), si les deux phénomènes précédents sont couplés (Zhao et al., 2011). En effet, une apnée centrale prolongée peut aboutir à une fermeture du larynx et entraîner une apnée obstructive (Idiong et al., 1998).

3.2.2 PATHOPHYSIOLOGIE DE L'ADP

Si les causes de l'ADP ne sont pas encore véritablement identifiées, il est cependant admis qu'elle découle d'une immaturité physiologique des mécanismes de contrôle de la respiration (Abu-Shaweesh and Martin, 2008). En effet, chez le fœtus, la respiration est intermittente et devient continue à la naissance chez le nouveau-né à terme. En revanche, chez le prématuré, ce phénomène de maturation ne s'est pas encore produit et les mouvements respiratoires restent irréguliers, pouvant ainsi mener à des apnées (Moriette et al., 2010). Ces arrêts respiratoires peuvent être à l'origine d'une désaturation rapide en O_2, se produisant en 0,8 secondes (Poets et al., 1993). Celle-ci peut alors entraîner une bradycardie dont l'incidence augmente avec la durée de l'apnée. Ce phénomène est initié par deux processus. Tout d'abord, l'hypoxémie active des chémorécepteurs périphériques qui, *via* le nerf vague, provoquent un ralentissement du rythme cardiaque (Poets, 2010). De plus, lorsque l'apnée est centrale, la cessation des mouvements respiratoires inhibe le réflexe d'inflation pulmonaire, entraînant là aussi une diminution de l'activité cardiaque (James and Daly, 1969).

L'immaturité du contrôle de la respiration est en partie due au développement incomplet des réponses des voies aériennes et des chémorécepteurs centraux et périphériques. C'est notamment le cas de ceux localisés au sein des corpuscules carotidiens et responsables de la stimulation respiratoire en cas d'hypoxie. Chez le fœtus, leur sensibilité est adaptée à la faible PaO_2 *in utero* ($PaO_2 \approx$ 23-27 mmHg). Mais à la naissance, cette pression est multipliée par un facteur 3 ou 4 ($PaO_2 \leq 60$ mmHg). Cela entraîne une mise sous silence ponctuelle des chémorécepteurs (Hertzberg and Lagercrantz, 1987), le temps qu'ils ajustent progressivement leur sensibilité à l'O_2 en adaptant

notamment la neurotransmission (Bamford et al., 1999; Gauda et al., 2000). Ce processus, qui dure environ 24 heures, est retardé chez les nouveau-nés prématurés car à ce stade, leurs connexions synaptiques entre les chémorécepteurs périphériques et les centres respiratoires centraux sont encore insuffisantes. De ce fait, la réponse ventilatoire à l'hypoxie s'en trouve perturbée. Physiologiquement, celle-ci se déroule en deux étapes chez les nouveau-nés (Cohen et al., 1997) : une première phase hyperpnéique où la ventilation est augmentée du fait d'une activation de l'arc chémoréflexe (Gaultier et al., 2003), et, une seconde légèrement hypopnéique, médiée par des neurotransmetteurs inhibiteurs ou encore le facteur de croissance *platelet-derived-growth-factor* (PDGF ; Gozal et al., 2000). En revanche, chez les nourrissons prématurés, l'activation de l'arc réflexe et l'augmentation de la ventilation sont accompagnées d'une expression accrue du récepteur beta au PDGF au niveau des centres respiratoires, qui exacerbe l'hypoventilation (Vlasic et al., 2001). Ce phénomène, nommé dépression ventilatoire hypoxique, peut alors s'installer sur plusieurs semaines (Zhao et al., 2011). En revanche, les très grands prématurés ne présentent pas de réponse hyperpnéique mais directement une réduction ventilatoire pouvant conduire à des apnées (Alvaro et al., 1992).

L'immaturité du contrôle respiratoire est aussi à l'origine de perturbations liées au dioxyde de carbone (CO_2). En effet, la réponse normalement induite lors d'une hypercapnie est une hyperventilation associant une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mouvements respiratoires. Cependant, les nouveau-nés prématurés, et surtout ceux souffrant d'ADP, présentent uniquement une augmentation du temps d'expiration, entraînant finalement une ventilation minute diminuée (Darnall, 2010). Par ailleurs, lors d'une hypocapnie, un mécanisme de compensation impliquant une cessation de la respiration est induit si la $PaCO_2$ descend sous un seuil apnéique. Celui-ci est situé à environ 3 mmHg en dessous du seuil physiologique chez un sujet adulte sain. Cependant, chez le nourrisson prématuré, ce seuil est très proche des taux physiologiques et une baisse de seulement 1,3 mmHg de la $PaCO_2$ est capable d'entraîner une apnée (Khan et al., 2005).

Par ailleurs, le fait que les ADP puissent persister au-delà de la maturation des chémorécepteurs suggère que d'autres mécanismes seraient impliqués dans la survenue et/ou l'aggravation des ADP (Gauda et al., 2004). Par exemple, il a été démontré que le chémoréflexe laryngé participe à cette pathologie. Ce mécanisme, à l'origine protecteur, entraîne en conditions physiologiques des toux et une déglutition à la suite d'une stimulation de la muqueuse laryngée (Praud, 2010). Cependant, chez les nourrissons, et en particulier les prématurés, ce phénomène devient délétère en raison de l'immaturité des afférences laryngées supérieures. Il peut alors entraîner la fermeture des voies respiratoires supérieures, des apnées centrales, ainsi qu'une

hypoxémie et une bradycardie (Thach, 2008). Tout comme les ADP, le chémoréflexe laryngé est inversement corrélé à l'âge gestationnel et il est de ce fait exacerbé chez les prématurés. Cette corrélation semble liée à l'incidence des reflux gastro-œsophagiens mais à ce jour, aucune étude n'a permis de démontrer que ces deux phénomènes soient reliés temporellement ou que les reflux prolongent et aggravent les apnées (Peter et al., 2002; Di Fiore, 2005). De plus, les traitements contre les reflux gastro-œsophagiens ne semblent pas présenter d'efficacité significative contre les apnées, tant au niveau de leur durée que de leur fréquence.

De nombreux neurotransmetteurs et neuromodulateurs sont également impliqués dans la régulation respiratoire et peuvent ainsi participer à la pathogenèse des ADP. En effet, il a été démontré que l'hypercapnie entraîne l'activation de neurones GABAergiques bulbaires (Zhang et al., 2003) et qu'un blocage des récepteurs $GABA_A$ permet d'augmenter l'hyperventilation, d'inhiber les apnées induites par une stimulation laryngée, mais aussi de réduire la dépression ventilatoire hypoxique (Miller et al., 2000; Abu-Shaweesh et al., 2001). L'adénosine intervient elle aussi dans l'inhibition de la respiration *via* une diminution de l'activité phrénique et une facilitation du chémoréflexe laryngé médiées par les récepteurs A_{2A}. Ces effets sont cependant prévenus par un blocage des récepteurs $GABA_A$, suggérant une fine interaction entre ces deux neuromodulateurs dans la régulation ventilatoire (Wilson et al., 2004). A l'appui de cette hypothèse, il a été montré que les neurones GABAergiques bulbaires possèdent des récepteurs adrénergiques A_{2A} qui, après activation, permettent une libération de GABA et donc des effets respiratoires inhibiteurs (Zaidi et al., 2006). La participation des autres récepteurs adrénergiques n'est pas non plus à écarter, car le *knock out* des récepteurs A_1 dans des modèles animaux permet lui aussi de limiter les dommages cérébraux induits par une hypoxie, tels qu'une perte de matière blanche ou une ventriculomégalie, (Turner et al., 2002, 2003).

De plus, l'adénosine peut être d'origine neuronale mais aussi gliale. Les gliotransmetteurs sont donc également à prendre en considération. A titre d'exemple, une étude démontre que le blocage de la libération de glutamate glial par la méthionine sulfoximine induit une baisse de la fréquence respiratoire chez le rat (Young et al., 2005), témoignant du rôle des astrocytes dans la régulation de la ventilation.

Enfin, d'autres facteurs, tels que le sommeil (Martin et al., 1979) ou encore les infections (Stock et al., 2010), influent également sur la survenue des ADP qui peuvent mener à des altérations cérébrales à court et long termes.

3.2.3 LES CONSEQUENCES CEREBRALES A COURT & LONG TERMES

L'une des conséquences immédiates des apnées est la perturbation de l'hémodynamique cérébrale. Son importance est proportionnelle à la sévérité de l'apnée. Ainsi, lors d'arrêts respiratoires supérieurs à 15 secondes associés à une bradycardie, l'imagerie révèle une baisse générale du volume sanguin et de l'oxygénation dans le cerveau du nourrisson (Moriette et al., 2010).

Les conséquences à long terme sont en revanche plus difficiles à mettre en évidence et la vulnérabilité du cerveau vis-à-vis de la fréquence, de la gravité et de la durée des apnées reste à l'heure actuelle inconnue. Cependant, une étude a permis de corréler le nombre total de jours d'ADP avec les déficits neurodéveloppementaux observés chez les enfants jusqu'à 3 ans d'âge corrigé (Janvier et al., 2004). Ainsi, l'ADP apparaît comme responsable de troubles psychomoteurs et moteurs ou encore de retards mentaux. Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard par une étude démontrant que l'augmentation de la fréquence et de la sévérité des apnées associées à une bradycardie entraîne une mortalité accrue chez les nourrissons et des altérations neurodéveloppementales plus importantes à 13 mois d'âge corrigé (Pillekamp et al., 2007).

Les conséquences histologiques de l'ADP sont elles aussi difficiles à évaluer car les systèmes d'imagerie restent dans ce domaine peu discriminants et les défauts liés à l'ADP sont souvent masqués par les altérations inhérentes à la prématurité. De plus, il n'existe pas de modèle animaux présentant des apnées spontanées. Les études sont donc axées sur des protocoles visant à mimer une apnée *via* des modifications du taux d'O_2 ambiant. Des expériences d'HI ont ainsi été réalisées mais les données bibliographiques dénotent une très grande variabilité dans le taux d'O_2 induit, la durée des cycles ou encore l'âge des animaux. Le protocole considéré comme mimant le mieux l'apnée du nourrisson est celui de Cai et *al*. (2011, 2012). Cette équipe a mis en évidence des défauts importants de myélinisation et d'oligodendrogenèse, ainsi que des altérations de maturation axonale. Par la suite, il a été démontré que cette hypomyélinisation est accompagnée d'un déficit de LTP, participant à des déficiences fonctionnelles telles qu'une diminution de la coordination motrice, une altération de l'apprentissage spatial et de l'apprentissage conditionné à la peur (Goussakov et al., 2019).

3.2.4 LES TRAITEMENTS DE L'ADP

A l'heure actuelle, deux traitements sont principalement envisagés dans le cas d'apnées chez le prématuré : l'usage de traitements pharmacologiques stimulant la respiration, tels que les méthylxanthines, ou une assistance ventilatoire par la technique de pression expiratoire positive par voie nasale (PEPn) dans le cas où la thérapie pharmacologique est inefficace.

La PEPn reste un traitement de choix, efficace, sans danger et utilisé en routine depuis plus de 40 ans (Abu-Shaweesh and Martin, 2008). Cette technique de ventilation non invasive délivre une pression comprise entre 4 et 6 cmH_2O (≈ 3,6 mmHg) au niveau des voies aériennes supérieures, permettant de les dilater et de les maintenir ouvertes, tout en diminuant le travail des muscles respiratoires. Ainsi, elle prévient la survenue d'une obstruction pharyngée ou laryngée et empêche la survenue d'apnées à composante obstructive. Par ailleurs, elle améliore la capacité résiduelle fonctionnelle, correspondant au volume d'air contenu dans les poumons en fin d'expiration, ce qui potentialise l'oxygénation et évite une désaturation pouvant entraîner une bradycardie en cas d'apnées centrales (Di Fiore et al., 2013). Si ce traitement n'a pour l'instant pas fait l'objet d'études statistiques, son utilisation régulière a permis de démontrer des effets sur la réduction de la fréquence des apnées et la diminution du temps d'intubation lors d'une ventilation artificielle.

Les méthylxanthines, principalement représentées par la théophylline et la caféine, représentent le traitement pharmacologique utilisé en cas d'ADP depuis plus de 30 ans et présentent une efficacité dans la diminution des ADP en moins de 7 jours de traitement. Ces antagonistes des récepteurs adrénergiques agissent en bloquant d'une part, les récepteurs A_1, permettant ainsi d'augmenter la respiration, et d'autre part, les récepteurs A_{2A}, inhibant de ce fait la libération de GABA au niveau du bulbe (Mayer et al., 2006). De façon générale, les méthylxanthines améliorent ainsi la ventilation minute et la sensibilité à l'hypercapnie, et réduisent la dépression ventilatoire hypoxique (Herlenius et al., 2002).

Généralement, la caféine est privilégiée car elle possède un index thérapeutique plus haut, une toxicité plus faible, et une demi-vie de 100 heures dans le plasma contre 30 heures pour la théophylline (Henderson-Smart and Steer, 2010). Tout comme la PEPn, elle permet de diminuer la durée d'intubation et augmente la survie sans séquelle (Schmidt et al., 2006; Schmidt et al., 2007). Son innocuité à long terme a récemment été prouvée par des essais menés sur plus de 2 000 prématurés pendant 11 ans, démontrant peu d'effets secondaires mais au contraire des effets bénéfiques sur la coordination motrice ou les performances visuospatiales (Mürner-Lavanchy et al.,

2018). Cette action thérapeutique pourrait être liée à un effet neuroprotecteur. En effet, une étude menée sur des souriceaux élevés en condition hypoxique a démontré que la caféine permet de prévenir l'hypomyélinisation, la ventriculomégalie et les altérations de la matière blanche (Back et al., 2002). Malgré tout, les méthylxanthines présentent, comme tout traitement pharmacologique, des risques non négligeables. En effet, à des doses trop élevées, elles peuvent provoquer des troubles cardiaques, une tachycardie voire des crises d'épilepsies. Il a également été montré qu'elles induisent une augmentation du métabolisme et de la consommation d'O_2 de 20 %, à un stade où ces apports nutritionnels et énergétiques sont déjà en péril. Il est donc important de poursuivre les travaux visant à mieux comprendre les mécanismes cellulaires responsables des conséquences neurodéveloppementales de l'ADP afin d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

4. TECHNIQUES D'IMAGERIE DE L'HYPOXIE

La recherche de stratégies thérapeutiques pour le traitement de pathologies impliquant l'hypoxie, telles que l'ADP, les tumeurs ou les accidents vasculaires cérébraux, a rapidement révélé la nécessité de développer de nouvelles technologies visant à détecter les carences tissulaires en O_2 *in vivo* sur le cerveau. Parmi elles, la méthode la plus utilisée en clinique est celle des électrodes à oxygène, ou électrodes de Clark (Clark et al., 1958; Vaupel et al., 1991; Höckel et al., 1993). Ces dernières peuvent mesurer quelques micromètres de diamètre et sont composées d'une cathode et d'une anode, entre lesquelles un courant dépendant de la quantité d'O_2 circule, permettant ainsi une mesure précise de la PaO_2 du tissu ciblé. Cependant, cette technique présente plusieurs inconvénients, tels que son caractère invasif, et une faible résolution spatiale. Or, il apparaît essentiel de déterminer précisément les cibles privilégiées de l'hypoxie pour adapter au mieux les traitements.

L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) fonctionnelle a ainsi vu le jour afin de répondre à cette problématique. Elle repose sur le signal *blood-oxygen-level dependant* (BOLD), traduisant les changements d'oxygénation sanguine liés à l'activité neuronale (Figure 25A) (Baudelet and Gallez, 2002). En effet, la désoxyhémoglobine, contrairement à la forme oxygénée de l'hémoglobine, est paramagnétique et détectable grâce au champ magnétique émis par un aimant supraconducteur. Une modélisation mathématique développée ces dernières années et validée *in vivo* sur des animaux hypoxiques ischémiques permet aujourd'hui de quantifier ce signal. L'IRM fonctionnelle permet donc de déterminer et de comparer la saturation en O_2 dans les différentes zones du cerveau (An and Lin, 2000, 2009).

De plus, une autre méthode d'imagerie médicale, la tomographie par émission de positons (TEP), peut également être utilisée afin d'observer l'hypoxie, grâce à des molécules telles que les nitroimidazoles. Ces derniers peuvent en effet entrer dans les cellules par diffusion, et y être réduits par différentes enzymes activées en condition hypoxique (Nunn et al., 1995). Conjugués à des groupements radioactifs, les nitroimidazoles permettent alors de mettre en évidence les zones en déficit d'oxygénation grâce à la scintigraphie (Figure 25B).

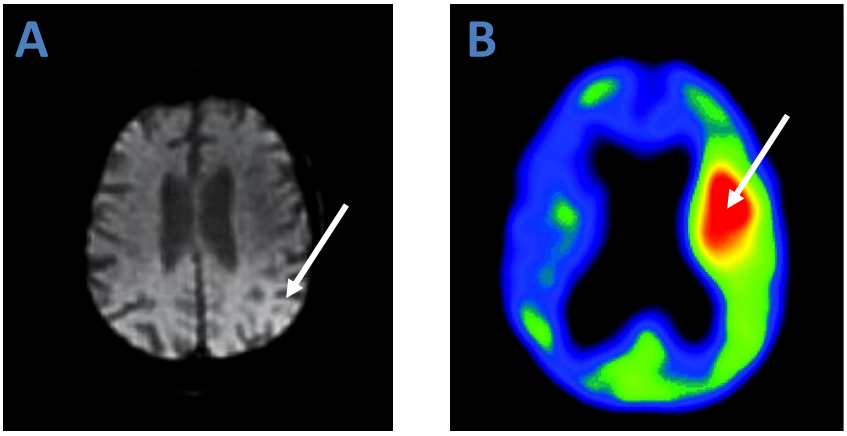


Figure 25 ◆ Illustrations de techniques d'imagerie de l'hypoxie. **(A)** Illustration du signal BOLD obtenu par IRM chez un patient atteint d'une ischémie (flèche blanche). **(B)** Illustration du signal obtenu par un nitroimidazole radioactive (18F-MISO) obtenu par TEP chez un patient atteint d'une ischémie (flèche blanche). D'après Takasawa et al., 2008 ; Christen et al., 2012.
BOLD : *blood-oxygen-level dependant* ; IRM : imagerie par resonance magnétique ; TEP : tomographie par émission de positons.

Cependant, si ces deux techniques offrent la possibilité de cartographier l'hypoxie, la résolution spatiale reste malgré tout limitée et la distinction des cibles de l'hypoxie au niveau cellulaire est impossible. Cela nécessite donc des analyses histologiques à l'aide du pimonidazole ou de marquages GLUT1 qui ne sont pas réalisables *in vivo*. Ainsi, aucune des méthodes de détection de l'hypoxie citées ci-dessus ne remplit l'ensemble des critères indispensables pour l'étude de ce phénomène en temps réel *in vivo* et avec des résolutions spatiales et temporelles optimales. Le développement de nouveaux outils est donc essentiel pour la compréhension totale des processus liés à l'hypoxie.

Pour pallier ce manque, des sondes sensibles à l'hypoxie et conçues pour la microscopie ont vu le jour. Basées sur différentes stratégies, elles ont l'avantage d'offrir une résolution spatiale à l'échelle cellulaire et de permettre une détection en temps réel du taux d'O_2. La première catégorie de sondes repose sur la qualité de quencher de fluorescence de l'O_2 (Papkovsky and Dmitriev, 2013). Ces molécules sont donc indétectables en normoxie. En revanche, lors d'une hypoxie, une fluorescence dont l'intensité est inversement proportionnelle au taux d'O_2 apparaît dans les cellules. Plusieurs de ces sondes ont déjà démontré leur efficacité dans des modèles tumoraux *in vitro* mais aussi *in vivo* (Liu et al., 2017). Une autre stratégie de détection de l'O_2 consiste à mesurer indirectement le degré oxydoréducteur environnemental. En effet, outre l'accumulation de ROS, l'hypoxie conduit à l'activation d'enzymes réductrices, comme les nitro- et les azo-réductases, capables de réduire respectivement les groupements nitroaromatiques ou azobenzènes. Fixés à une

sonde, ces composés agissent comme des quenchers de fluorescence mais sous l'effet des réductases induites par l'hypoxie, ils sont clivés, rendant ainsi la sonde fluorescente détectable. Les premières sondes développées à partir de ce principe dans les années 1990 sont composées d'un groupement nitro les rendant peu fluorescentes, mais présentent une très faible sensibilité à une carence en O_2 (Hodgkiss et al., 1991). Depuis, de nombreuses études se sont donc attelées à améliorer les différentes performances de ces molécules, en utilisant notamment des dérivés azo, plus sensibles à l'hypoxie. Ainsi, Piao et al. (2013) ont conjugué un groupement azo à une rhodamine, composé fluorescent très couramment utilisé en microscopie. En hypoxie, le clivage de la double liaison N=N de la mono-azo rhodamine (MAR) par les azo-réductases libère le quencher (Figure 26A) et induit une fluorescence détectable en microscopie confocale (Figure 26B), dépendante de la sévérité de l'hypoxie.

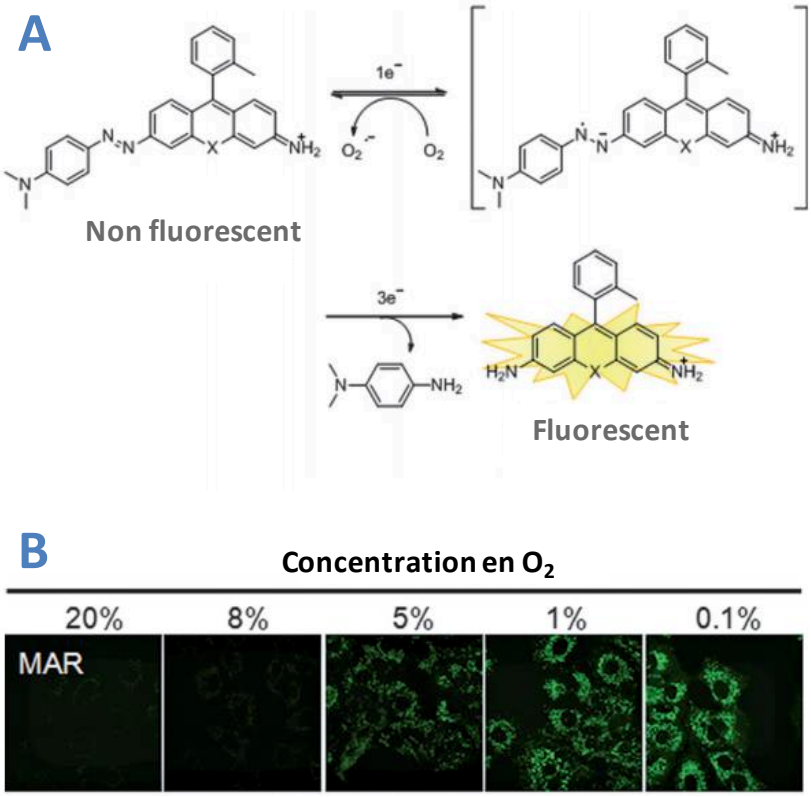


Figure 26 ◆ Mécanisme de clivage de la sonde MAR (A) et illustration de la fluorescence émise en hypoxie (B). D'après Piao et al., 2013. MAR : mono-azo rhodamine ; O_2 : dioxygène.

Par ailleurs, dans les études d'imagerie microscopiques effectuées *in vivo* chez l'animal, l'emploi de la microscopie biphotonique est préférable car elle permet de réduire le risque de photoblanchiment et d'endommagement des tissus tout en témoignant d'une meilleure pénétrabilité. A l'heure actuelle, elle constitue ainsi la seule technique permettant une analyse à l'échelle cellulaire en temps réel et en profondeur dans les tissus. En 2013, le groupe de Serge Charpak a mis au point l'utilisation d'une sonde fluorescente sensible à la PaO_2 tissulaire dans le

cerveau (Lecoq et al., 2011). Cette sonde, la PtP-C343, a permis de caractériser le couplage neuro-métabolique avec une résolution spatiale et temporelle inégalée. Cependant, cette molécule est d'une structure chimique si complexe (Figure 27) qu'elle se révèle trop compliquée à synthétiser et n'a quasiment jamais été exploitée depuis.

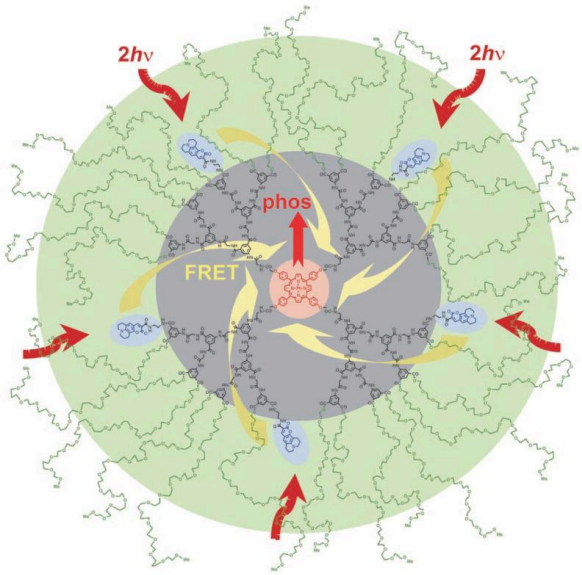


Figure 27 ◆ Structure de la sonde PtP-C343 et de son excitation menant à l'émission de fluorescence par le cœur de la molécule.

L'un des fluorophores les plus utilisés en microscopie biphotonique du cerveau est la sulforhodamine-101 (SR101 ; Figure 28A). Ce marqueur, non toxique et neutre à faible concentration, constitue un agent de contraste qui s'accumule au sein des astrocytes tout en étant rejeté par les neurones (Nimmerjahn et al., 2004). Il permet donc de discriminer ces deux types cellulaires au sein du cerveau. En 2015, Chevalier et al. ont alors mis à profit ces caractéristiques afin de développer des sondes sensibles à l'hypoxie dérivées de la SR101. Ils ont ainsi produit différentes sondes comprenant une base de la SR101, un quencher azobenzène et un radical variable permettant de modifier le comportement biochimique de la molécule (Figure 28B). En hypoxie, le groupement azobenzène se trouve converti en aniline par les azo-réductases, permettant l'élimination du radical au niveau de la double liaison N=N, et l'émission de fluorescence.

Ainsi, la SR-101-NaphtNH_2-Hyp-X a été validée en microscopie confocale monophotonique sur la lignée cellulaire A549 de carcinome de poumon humain. La sensibilité est supérieure à la sonde mono-azo Si-rhodamine (MASR) de Piao et al. (2013), et l'intensité de fluorescence est bien proportionnelle au taux d'O_2 (Figure 29). De plus, le fait que cette molécule émane de la SR101 la place parmi les meilleurs candidats pour une utilisation en imagerie biphotonique. A terme, la SR101-NaphtNH_2-Hyp-X et ses dérivés pourraient donc représenter un outil de choix pour l'étude de

l'hypoxie *in vivo* à l'échelle cellulaire et faciliter la compréhension des mécanismes impliqués dans les pathologies telles que l'ischémie, le cancer ou encore l'ADP.

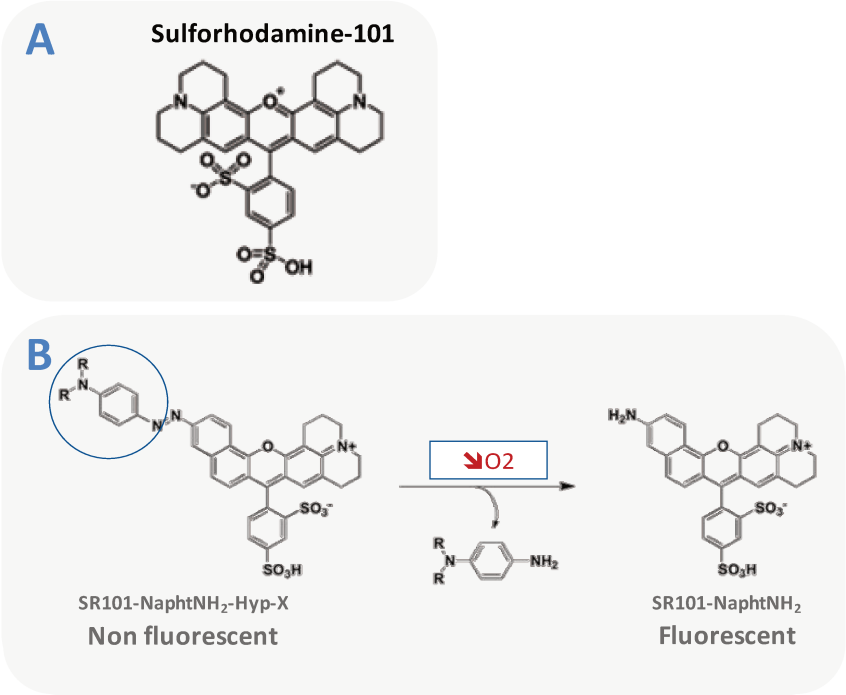


Figure 28 ◆ Structure de la sulforhodamine-101 (A) et mécanisme de clivage de la SR101-NaphtNH$_2$-Hyp-X en hypoxie (B). D'après Chevalier et al., 2015. O_2 : dioxygène ; SR101 : sulforhodamine-101.

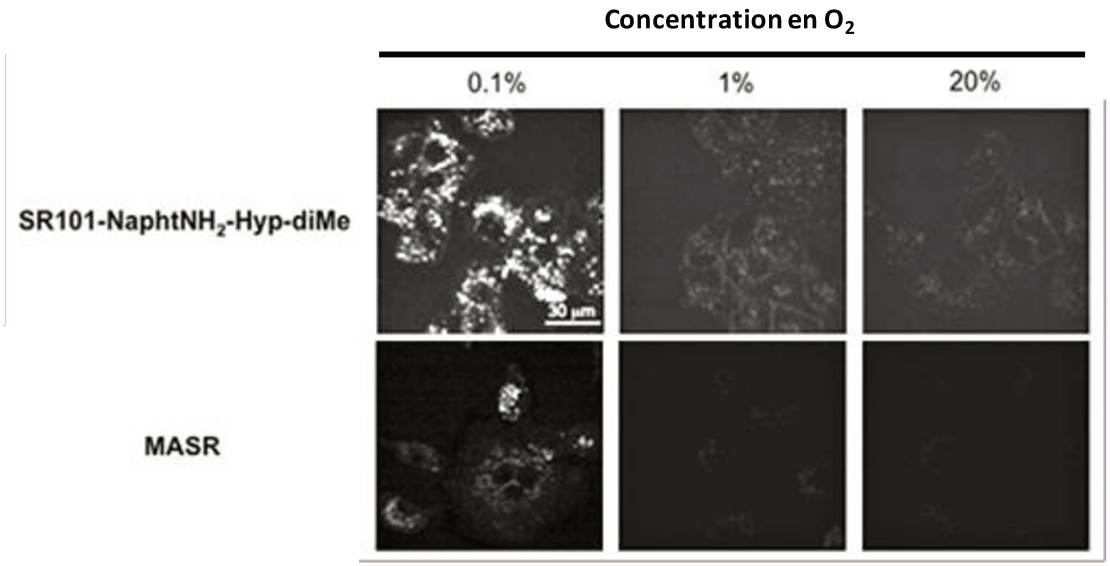


Figure 29 ◆ Images comparatives de la fluorescence émise par la SR101-NaphtNH$_2$-Hyp-diMe et de la MASR en normoxie et en hypoxie. D'après Piao et al., 2013 ; Chevalier et al., 2015. MASR : mono-azo Si-rhodamine ; SR101 : sulforhodamine-101.

OBJECTIFS

Les données de la littérature présentées au cours de cette introduction démontrent que le cervelet pourrait constituer une cible privilégiée de l'hypoxie périnatale. Cette pathologie s'avère extrêmement fréquente mais son impact sur le cervelet n'a été que très peu étudié. Pourtant, le développement de cette structure se déroule principalement pendant la période postnatale chez l'Homme, et son immaturité à la naissance le rend vulnérable à des incidents tels que l'hypoxie périnatale. De plus, les troubles observés chez les enfants ayant subi une hypoxie à la naissance se révèlent proches des fonctions que contrôle le cervelet, telles que la coordination motrice ou encore l'apprentissage. Ces observations nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'hypoxie pourrait ainsi affecter de façon privilégiée le cervelet immature, altérant son développement et les fonctions qu'il contrôle.

Dans ce contexte, la première partie de ce projet a pour objectif de développer une chambre d'hypoxie, permettant de mimer à la fois une hypoxie aiguë et l'ADP chez la Souris. Ce modèle animal est particulièrement adapté à cette étude, car, tout comme chez l'Homme, le développement de son cervelet se fait en majorité lors de la période postnatale. Après optimisation, la conception de la chambre doit permettre de réaliser *(i)* des hypoxies continues de 40 minutes à 5 % d'O_2 et *(ii)* des hypoxies intermittentes de 20 secondes à 5 % d'O_2 toutes les 2 minutes pendant six heures. La stabilité des paramètres environnementaux sera vérifiée pendant toute la durée des protocoles ainsi que le taux de mortalité des animaux.

Par la suite, la chambre d'hypoxie sera tout d'abord utilisée pour étudier les conséquences d'une hypoxie continue sur le développement de cervelet de souris à l'âge de 6, 12 ou 21 jours postnataux pour connaître la période la plus sensible à un déficit en O_2. Nous nous attacherons alors à déterminer les effets de la carence en oxygène sur l'induction d'une production de ROS, témoignant d'un stress oxydatif. L'activité caspase-3/7 et la localisation des cellules en apoptose seront également analysées pour connaitre la cible privilégiée de l'hypoxie continue au sein du cervelet. Enfin, l'histologie générale du cortex cérébelleux permettra de définir si les mécanismes délétères liés au manque d'O_2 induisent une modification de la structure à court et long terme.

La suite du travail s'attachera à étudier un modèle animal d'ADP et ses conséquences sur le développement du cervelet. Le stress oxydatif, la mort cellulaire par apoptose et l'organisation structurale du cortex cérébelleux seront de nouveau analysés à court et long terme. Puis, des études comportementales sont envisagées pour tenter de corréler les altérations histologiques avec des déficits comportementaux chez le souriceau et chez l'adulte. L'objectif est de pouvoir mettre en parallèle ces troubles avec des défauts observés chez les patients ayant souffert d'ADP.

Enfin, afin d'approfondir l'étude des mécanismes cellulaires liés aux hypoxies périnatales *in vivo*, nous caractériserons différentes sondes fluorescentes sensibles à l'hypoxie en vue d'une utilisation chez l'animal en imagerie biphotonique. Les profils d'excitation et d'émission des composés en microscopie biphotonique seront réalisés pour sélectionner les meilleurs candidats, puis une étude de stabilité au cours du temps sera effectuée sur ces molécules. Une optimisation du protocole d'anesthésie, de chirurgie et d'observation sera également nécessaire pour imager le cervelet du souriceau *in vivo* en temps réel.

MATERIELS ET METHODES

INDUCTION DES HYPOXIES PERINATALES

Animaux : les souris mâles et femelles utilisées dans cette étude appartiennent à la souche C57/Bl6J. Les animaux sont nés et hébergés au sein de l'animalerie de l'Université de Rouen et ont un accès libre à l'eau et à la nourriture dans un environnement thermorégulé à 21 °C ± 1 °C avec un cycle de 12 h jour/12 h nuit.

Développement d'une chambre d'hypoxie : aucun dispositif disponible sur le marché ne nous permettait de réaliser les cycles d'HP inclus dans notre protocole. Ainsi, une chambre d'hypoxie a été développée au sein de l'Université de Rouen tout en respectant un cahier des charges précis. Le dispositif doit ainsi pouvoir permettre la réalisation de cycles de 2 minutes avec des phases de transition entre l'hypoxie et la normoxie d'environ 30 secondes. De ce fait, le volume de l'enceinte doit être réduit afin de permettre des échanges gazeux rapides, mais suffisamment grand pour contenir une cage de souris (15x35 cm) et un biberon. De plus, la surveillance visuelle des animaux depuis l'extérieur de la chambre doit être possible et différents paramètres environnementaux (pression atmosphérique, température, hygrométrie) doivent être monitorés. Enfin, l'ensemble des cycles d'hypoxie doit être automatisé et programmable par un ordinateur.

Protocole d'hypoxie périnatale continue : des souriceaux âgés de 6, 12 ou 21 jours postnataux (P6, P12, P21) sont placés pendant 40 minutes dans une chambre d'hypoxie, soit en condition normoxique (≈ 21 % d'O_2 ; groupe NC), soit en condition hypoxique (≈ 5 % d'O_2 ; groupe HC). Les cervelets des souris sont par la suite prélevés soit immédiatement (T0), soit 6 heures (T6) ou 24 heures (T24) après l'hypoxie.

Protocole d'hypoxie périnatale intermittente : des souris femelles gestantes sont placées dans une chambre d'hypoxie quelques jours avant la naissance des souriceaux pour limiter le stress lié au changement d'environnement. Lorsque ceux-ci sont âgés de P2, ils sont soumis à des épisodes répétés d'hypoxie et de réoxygénation (groupe HI). Chaque cycle dure 2 minutes et est constitué : *(i)* d'une phase de diffusion d'azote pendant 40 secondes afin de diminuer le taux ambiant d'O_2 dans la chambre, *(ii)* d'une hypoxie (≈ 5 % d'O_2) de 20 secondes, *(iii)* d'une étape de réoxygénation de 20 secondes grâce à un apport d'air ambiant extérieur et d'O_2, et enfin *(iv)* d'une période de normoxie (≈ 21 % d'O_2) de 40 secondes. Ces cycles sont répétés pendant 6 heures au cours de la phase de sommeil des animaux (10 h - 16 h) pendant dix jours. Les souriceaux contrôles (groupe NI) sont, quant à eux, élevés en normoxie dans une seconde chambre juxtaposée. Ainsi, ils subissent le même stress sonore induit par le déclenchement des électrovannes de la chambre

hypoxique. Les cervelets sont par la suite prélevés à la fin du protocole d'hypoxie à P12 ou les souriceaux sont élevés par la mère et sevrés à P21 jusqu'à prélèvement des cervelets à 3 mois.

Prélèvement des cervelets : les souriceaux âgés de P6 à P21 sont décapités après une anesthésie par inhalation d'isoflurane (1000 mg/g d'iso-vet®). Les souris adultes de 3 mois sont, quant à elles, anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (100 mg/kg ; 100 mg/mL) et de xylasine (10 mg/kg ; 20 mg/ml). Une perfusion intracardiaque de solution de chlorure de sodium 9 % suivi de paraformaldéhyde (PFA) 4 % est ensuite réalisée pour fixer le cervelet avant son prélèvement.

Pour les études de prolifération et migration, des injections de bromodésoxyuridine (BrdU) sont réalisées à P6 et P12. Puis, pour l'ensemble des analyses immunohistochimiques, les encéphales entiers sont prélevés et post-fixés dans 5 mL de PFA 4 % pendant une nuit puis conservés dans 5 mL de *phosphate buffer saline* (PBS) 1X. Pour les autres analyses, seuls les cervelets sont prélevés puis broyés dans 500 ou 1000 µL de *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM). En effet, les cervelets de souris ayant subi une HI étant beaucoup plus petits que dans les expériences de NC et HC, le volume de DMEM utilisé a été diminué pour le groupes NI et HI afin d'éviter l'effet dilution. Ils sont ensuite conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

ETUDES DU DEVELOPPEMENT CEREBELLEUX

Etude histologique du cervelet : l'histologie du cortex cérébelleux a été étudiée par des analyses immunohistochimiques. Pour cela, des coupes de 80 µm d'épaisseur de cervelet préalablement fixés au PFA 4 % ont été réalisées au vibratome (Leica Microsystems VT1000S), puis placées dans une plaque 24 puits. Un blocage des sites non spécifiques est tout d'abord réalisé durant une heure en présence de *normal donkey serum* (NDS) dilué au facteur 1:50 dans une solution d'incubation contenant du PBS 1X, du Triton X-100 (0,3 %) et de la *bovine albumine serum* (1 %). Les coupes sont ensuite incubées une nuit à 4 °C avec différents anticorps spécifiques (Table 1) dilués dans la même solution d'incubation que le NDS. Les tissus sont ensuite rincés avec du PBS 1X et les anticorps secondaires appropriés sont dilués au facteur 1:200 et appliqués pendant 2 heures à température ambiante (Table 1). Cette étape est suivie de nouveaux rinçages, puis les tissus sont incubés en présence de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; 1 µg/mL) pendant une minute afin de réaliser un marquage nucléaire. Après un dernier rinçage, les coupes sont montées entre lame et lamelle à l'aide de Mowiol.

Les tissus sont alors observés à l'aide de différents microscopes, à raison de 4 coupes par cervelet. L'étude de l'épaisseur des couches corticales du cervelet est réalisée à l'aide d'un microscope statif droit Eclipse 600D (Nikon) alors que la densité des cellules apoptotiques est déterminée grâce au macroscope confocal LSI (Leica Microsystems). Ces données sont analysées sur le logiciel ImageJ (version 1.46). La prolifération et la migration sont observées sur le microscope confocal TCS SP8 MP (Leica Microsystems) et quantifiées à l'aide du logiciel Imaris.

Anticorps primaire	Marqueur	Dilution	Espèce	Fournisseur	Anticorps secondaire
BrdU	Cellule en migration/prolifération	1:400	Mouton	Abcam (#ab1893)	DAS-633
Calbindine	Cellule de purkinje	1:1000	Souris	Sigma-Aldrich (#C9848)	DAM-594
Caspase-3-clivée	Cellule apoptotique	1:400	Lapin	Cell Signaling Technology (#9661S)	DAR-488
GFAP	Astrocyte (glie de Bergmann)	1:600	Lapin	Dako (#Z0334)	DAR-488

Table 1 ◆ Tableau récapitulatif des marqueurs immunohistochimiques utilisés.
BrdU : bromodésoxyuridine ; GFAP : *glial fibrillary acidic protein* ; DAM : *donkey anti-mouse ;* DAR : *donkey anti-rabbit* ; DAS : donkey anti-sheep.

Dosage des espèces réactives de l'oxygène : la production de ROS est évaluée grâce à la sonde *2',7'-dichlorofluorescein diacetate* (DCFDA ; Sigma-Aldrich). 100 µL d'échantillons de cervelets broyés et dilués au facteur 1:10 sont placés en duplicate dans une plaque noire 96 puits à fond transparent (Costar). Chaque échantillon est incubé avec 2 µL de DCFDA (0,2 mM). En présence de ROS, le DCFDA est clivé en *2',7'-dichlorofluorescein* (DCF) fluorescent (λ_{Ex} = 504 nm ; λ_{Em} = 529 nm). Après agitation, l'intensité de fluorescence est mesurée grâce au lecteur de plaque Infinite F200 Pro (Tecan) toutes les 15 minutes pendant 45 minutes (λ_{Ex} = 485 nm ; λ_{Em} = 535 nm). La réalisation d'une gamme étalon de DCF (Sigma-Aldrich) permet de convertir cette intensité de fluorescence en concentration de DCF, proportionnelle à la quantité de ROS contenue dans les échantillons. Les valeurs obtenues sont normalisées grâce à un dosage de la quantité de protéines de chaque échantillon (en µg/mL) par la technique de Bradford, et les données finales (nmol de DCF/µg de protéines) sont exprimées en pourcentage de contrôle.

Mesure de l'activité caspase : l'activité enzymatique des caspases-3/7 est dosée grâce au kit *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega). Pour cela, 100 µL d'échantillons de cervelets broyés et dilués au facteur 1:10 sont placés en duplicate dans une plaque noire 96 puits à fond transparent. Chaque échantillon est incubé à 37 °C avec 100 µL de sonde *rhodamine 110, bis-(N-CBZL-aspartyl-L-glutamyl-L-aspartic acid amide)* diluée dans le tampon du kit (99 µL de tampon + 1 µL de sonde). En présence des enzymes caspase-3 et/ou -7, cette sonde est clivée et devient fluorescente (λ_{Ex} = 498 nm ; λ_{Em} = 512 nm). Après agitation, l'intensité de fluorescence est mesurée grâce au lecteur de plaque Inifinite F200 Pro toutes les 6 minutes pendant 3 heures (λ_{Ex} = 485 nm ; λ_{Em} = 535 nm). Les valeurs obtenues sont normalisées grâce à un dosage de la quantité de protéines de chaque échantillon (en µg/mL) par la technique de Bradford, et les données finales (unité de fluorescence/µg de protéines) sont exprimées en pourcentage de contrôle.

ETUDES COMPORTEMENTALES

Pour chaque test comportemental, les animaux sont placés dans la pièce du dispositif une heure avant le début des tests, de façon à les habituer à cet environnement. Le plan chronologique des tests est indiqué sur la Figure 30.

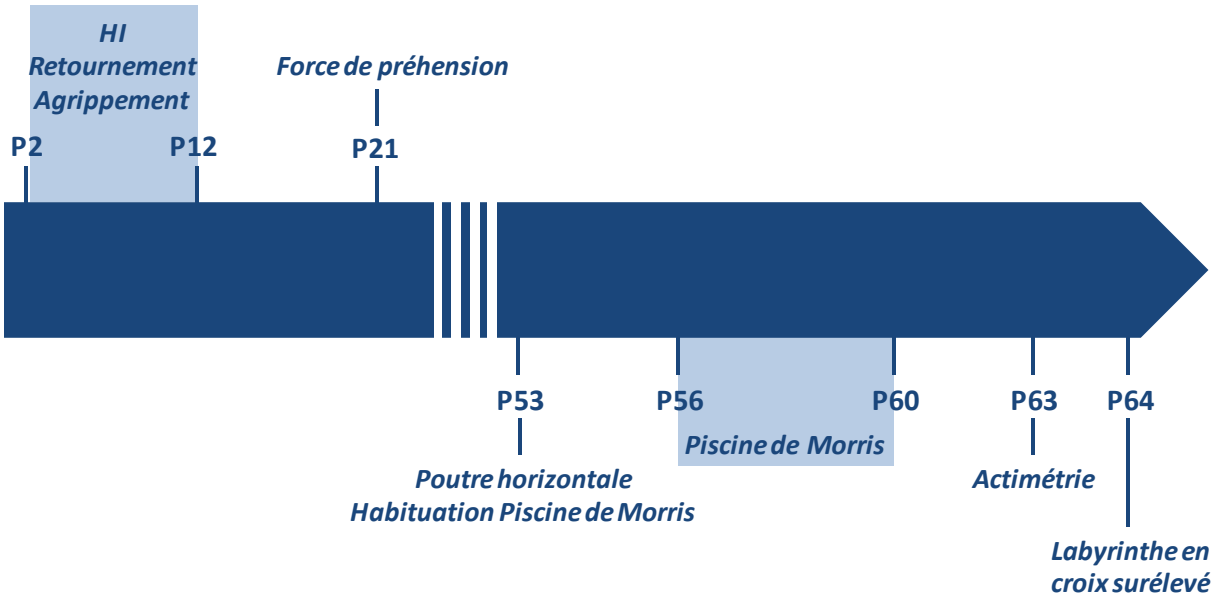


Figure 30 ◆ Frise chronologique récapitulative des études comportementales réalisées chez la souris en développement et adulte. HI : hypoxie intermittente ; PX : jour postnatal X.

Test du réflexe de retournement : ce test permet d'évaluer le développement sensori-moteur de l'animal et ses fonctions vestibulaires. Le souriceau est placé sur le dos sur une planche horizontale et le temps nécessaire à son retournement complet sur ses 4 pattes est mesuré (Figure 31). Deux essais consécutifs sont réalisés tous les jours de P2 à P11 et la durée limite de chaque essai est fixée à 1 minute.

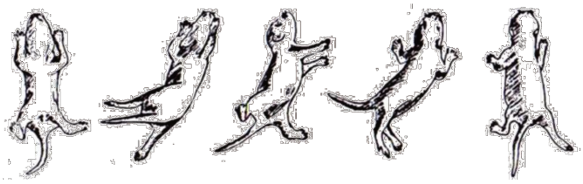


Figure 31 ◆ Illustration du protocole du test de réflexe de retournement chez le souriceau.

Test du réflexe d'agrippement : ce test est réalisé afin de mesurer les capacités de coordination motrice de l'animal et son développement sensori-moteur. Le souriceau est suspendu par les pattes antérieures à un fil de nylon grâce à un réflexe d'agrippement. Le temps de maintien en suspension est mesuré (Figure 32). Deux essais consécutifs sont réalisés tous les jours de P2 à P11, et la durée limite de chaque essai est fixée à 1 minute.

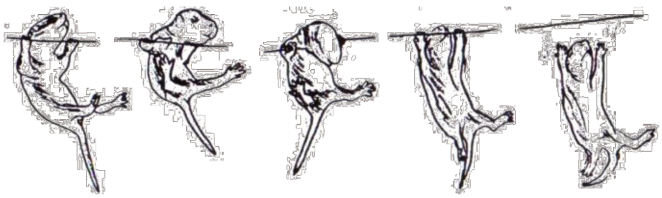


Figure 32 ◆ Illustration du protocole du test de réflexe d'agrippement chez le souriceau.

Test de force de préhension : grâce à ce test comportemental, la force musculaire des souris est évaluée. Les animaux âgés de P21 sont amenés près d'un fil pour qu'ils s'y accrochent par les pattes antérieures, puis l'expérimentateur tente de les décrocher en les tirant progressivement par la queue. La résistance musculaire à la traction est mesurée et quatre essais sont réalisés pour chaque animal.

Test de la poutre horizontale : ce dispositif permet d'apprécier les capacités de coordination motrice des souris. Il est constitué d'une poutre cylindrique d'1 m de long et 0,5 cm de diamètre, au bout de laquelle se situe une plate-forme accolée à la cage de l'animal. Chaque souris P53 est tout d'abord placée sur la plate-forme et doit retourner d'elle-même dans sa cage. Cette expérience est répétée 4 fois, après quoi l'animal est placé sur la poutre à une distance de 0, 10, 20 puis 50 cm de la plate-forme et doit parcourir ce chemin afin d'y retourner. Chaque essai est réalisé 2 fois avant de passer à la distance supérieure afin d'apprendre à l'animal à rejoindre directement sa cage et ainsi éviter les

biais liés à d'éventuels arrêts spontanés au milieu de la poutre. Enfin, l'animal est positionné sur la poutre à 1 m de la plate-forme, et le temps nécessaire pour y revenir ainsi que les trébuchements effectués sur le parcours sont mesurés. Pour chaque animal, le test est effectué trois fois.

Test d'actimétrie : au travers de cette expérience, l'activité locomotrice spontanée des animaux dans un environnement nouveau est mesurée. Les souris âgées de P63 sont placées pendant 10 minutes au centre d'une boîte de 45x45x30 cm reliée à un système de détection et d'analyse informatique Any-MAZE®, puis la distance parcourue et la vitesse moyenne sont calculées.

Test du labyrinthe en croix surélevé : ce test est couramment utilisé afin d'étudier l'anxiété chez le rongeur. Le dispositif est constitué de deux branches croisées de 45 cm de longueur, constituées respectivement de deux bras ouverts et deux bras fermés (Figure 33). Un test de 5 minutes est effectué pour chaque animal âgé de P64, qui est placé à l'intersection des deux branches. Un système de détection situé au-dessus du labyrinthe permet de déceler les mouvements de l'animal et d'analyser les entrées et le temps passé dans chaque bras.

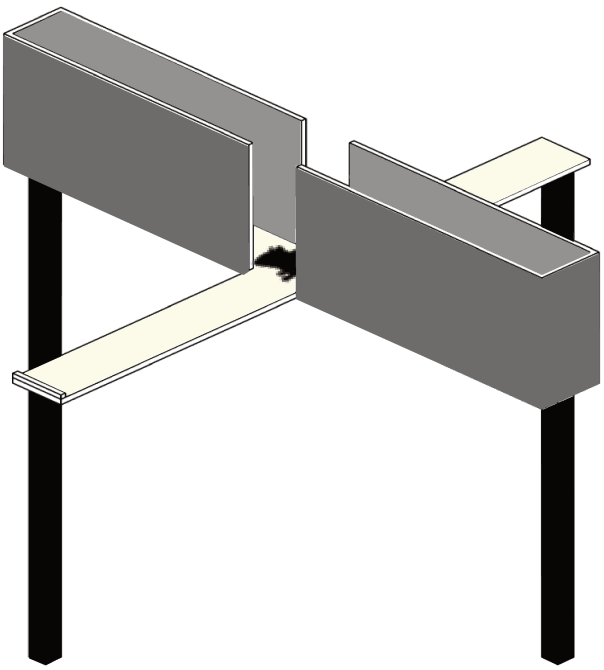


Figure 33 ◆ Illustration du test du labyrinthe en croix surélevé.

Test du labyrinthe aquatique de Morris : ce test dit de « la piscine de Morris » évalue l'apprentissage spatial chez les animaux. Le dispositif circulaire (Ø 120 cm) rempli d'eau rendue opaque est entouré de quatre indices visuels (nord, est, sud, ouest) et est virtuellement divisé en quatre quadrants (nord-est, sud-est, sud-ouest, nord-ouest) (Figure 34). Une caméra est située au-dessus de la piscine, permettant de suivre le trajet des animaux et d'analyser différents paramètres comportementaux grâce au logiciel Any-MAZE®. Une première phase d'habituation est réalisée à P53, au cours de laquelle chaque animal est placé au centre de la piscine afin qu'il puisse explorer librement le bassin pendant 60 secondes.

Puis, pendant 5 jours consécutifs, une phase d'acquisition est effectuée entre P56 et P60. Une plate-forme (Ø 8 cm) est alors immergée à 1 cm sous la surface de l'eau dans le quadrant cible (nord-ouest), à équidistance du bord et du centre de la piscine. Chaque animal est placé dans le bassin face à la paroi et à un indice visuel. Il dispose alors d'un maximum de 60 secondes pour trouver la plate-forme invisible et y rester pendant 5 secondes. Si l'animal ne trouve pas la plate-forme, il y est guidé et laissé pendant 20 secondes. Chaque jour, quatre essais par animal sont réalisés à quatre points de départ différents (sud, est, nord, ouest). Afin d'éviter que l'animal n'utilise toujours la même stratégie pour trouver la plate-forme et l'inciter à se baser sur les indices visuels de la pièce, le premier essai de chaque jour est fait à un point de départ différent (sud, ouest, nord, est, et à nouveau sud). Plusieurs paramètres sont analysés au cours de ces 5 jours, parmi lesquels le distance parcourue, le temps nécessaire pour atteindre la plate-forme, le temps d'immobilité dans l'eau ou encore le *path efficiency*, permettant d'évaluer la complexité du trajet effectué jusqu'à la plate-forme.

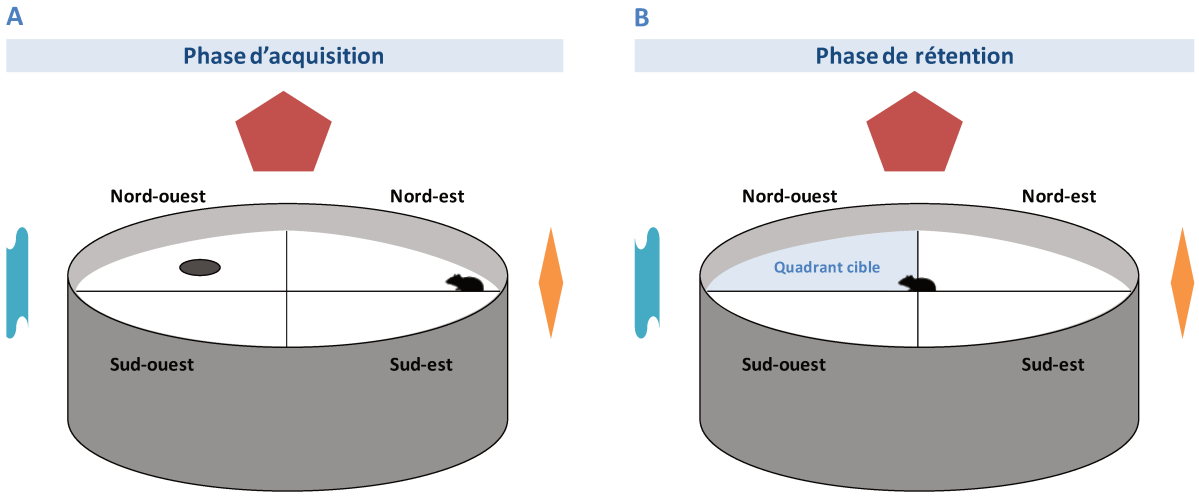


Figure 34 ◆ Illustration du test du labyrinthe aquatique de Morris. (A) Lors de la phase d'acquisition, l'animal est placé à l'un des quatre points cardinaux et doit retrouver la plate-forme immergée. **(B)** Lors de la phase de rétention, l'animal est placé au centre de la piscine et explore librement l'environnement. Dans les deux phases, la piscine est entourée de 4 repères visuels placés aux quatre points cardinaux (l'expérimentateur se situe au sud).

Le dernier jour, un test de rétention est réalisé lors duquel la plate-forme est retirée de la piscine (Figure 34). Chaque souris est alors placée au centre du bassin et dispose de 60 secondes pour l'explorer. Durant cet essai unique, le temps passé et la distance parcourue dans le quadrant cible où se trouvait initialement la plate-forme sont mesurés.

ETUDE DE L'HYPOXIE PERINATALE EN TEMPS REEL

Caractérisation spectrale des sondes sensibles à l'oxygène : les profils d'excitation (690 nm < λ_{Em} < 1080 nm) et d'émission (λ_{Ex} = 815 nm) de différentes sondes dérivées de la SR-101 sont réalisés grâce à un microscope biphotonique TCS SP8 MP (Leica Microsystems). Pour ce faire, chaque sonde est dissoute à une concentration de 10 mM dans du diméthylsulfoxyde et diluée à 100 µM dans du tampon HEPES (pH = 7,4). Puis, une goutte de cette solution est prélevée et placée entre lame et lamelle pour une observation en microscope biphotonique. Afin de faire la mise au point au plan focal optimal, un stack en z est tout d'abord réalisé, permettant de déterminer les coordonnées auxquelles est émis le maximum de fluorescence. Ces coordonnées sont par la suite utilisées pour réaliser la caractérisation spectrale de la sonde.

Imagerie intravitale du cervelet : des souris âgées de P10 sont anesthésiées avec du valium injecté en intrapéritonéale (1 µL/mg de poids corporel, 10 mg/2 mL) et de l'isoflurane gazeux (5 % lors de l'induction de l'anesthésie puis 1,5 à 3 % pendant la chirurgie). Elles sont maintenues à 37°C grâce à une couverture chauffante thermostatée. Une craniotomie de 2 mm de diamètre est alors réalisée au niveau du cervelet à l'aide d'une fraise chirurgicale et la dure-mère est reséquée afin d'exposer la surface du cortex cérébelleux. La SR101 (10 µM, 5 µL) est appliquée en bain pendant 15 minutes puis rincée avec un tampon HEPES. La craniotomie est ensuite recouverte d'une lamelle fixée par du ciment dentaire. Enfin, l'extrémité d'un bras métallique de 4 cm est collée sur le reste du crâne afin de pouvoir immobiliser la souris sous l'objectif du microscope. Après la chirurgie, l'animal est maintenu sédaté par une nouvelle injection intrapéritonéale de valium (1 µL/mg). L'acquisition d'images du cortex cérébelleux en temps réel est effectuée grâce au microscope biphotonique TCS SP8 MP (Leica Microsystems ; λ_{Ex} = 900 nm).

ANALYSES STATISTIQUES

Le logiciel *Graphpad Prism®* (version 6.04) est utilisé pour l'ensemble des analyses statistiques. Pour les données non paramétriques concernant l'étude du développement cérébelleux et les tests

comportementaux de la poutre horizontale, l'actimétrie, le labyrinthe en croix surélevé et le test de rétention du labyrinthe de Morris, les résultats sont analysés par un test de Mann-Whitney. Les autres données comportementales nécessitant un suivi temporel (la surveillance pondérale des animaux, les tests de retournement et d'agrippement ainsi que la phase d'acquisition du labyrinthe de Morris) sont analysées par une ANOVA répétée à 2 facteurs (temps et hypoxie) suivie d'un test de Sidak.

RESULTATS

PARTIE I – VALIDATION TECHNIQUE ET *IN VIVO* DE LA CHAMBRE D'HYPOXIE

1. DESCRIPTION GENERALE DE LA CHAMBRE D'HYPOXIE

Afin de pouvoir réaliser des protocoles d'hypoxies périnatales, nous avons développé une chambre d'hypoxie en collaboration avec l'Institut Universitaire de Technologie de l'Université de Rouen Normandie (Figures 35 et 36). Selon les critères imposés par le cahier des charges (cf. Matériels et méthodes), le dispositif est composé d'une enceinte de 21 L (23x23x39 cm) en plexiglas, permettant ainsi une surveillance visuelle des animaux. De plus, la chambre est équipée de plusieurs capteurs qui assurent le monitoring de différents paramètres dont l'O_2, la température, la pression atmosphérique et l'hygrométrie. L'induction de l'hypoxie est réalisée par l'injection d'azote, tandis que le retour en normoxie se fait par une entrée d'air *via* une pompe à un débit de 60 NL/min, associé, dans le cas d'une HI, à de l'oxygène pour une transition plus rapide. Dans l'enceinte, un ventilateur permet de mélanger les gaz. Ces derniers rejoignent la chambre grâce à des tuyaux de cuivre (8 mm) et de PVC (10 mm). Afin de réduire au maximum la puissance sonore et de réchauffer et humidifier les gaz, la longueur des tubes de PVC utilisés est de 5 m et des silencieux ont été posés à chaque entrée de gaz. Les flux gazeux entrant dans l'enceinte du dispositif sont contrôlés en amont par des manomètres, des débitmètres et des électrovannes. Afin de pouvoir réaliser des cycles d'hypoxie réguliers de façon automatique, l'ouverture des électrovannes et la mise en route de la pompe sont contrôlés par un automate programmable relié à un ordinateur, grâce au logiciel Arduino (Figure 36). Ce dernier permet également d'enregistrer les données transmises par les différents capteurs et de suivre en temps réel les paramètres environnementaux dans la chambre.

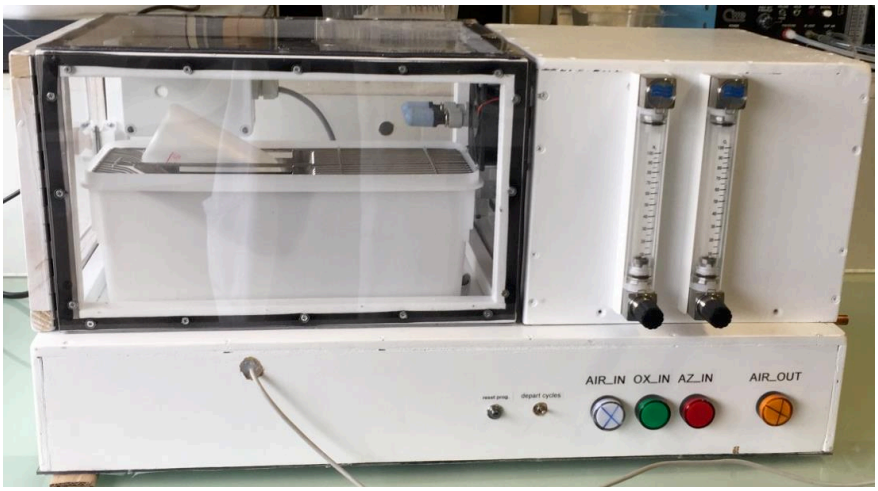


Figure 35 ◆ Photographie de la chambre d'hypoxie conçue au sein de l'Université de Rouen Normandie.

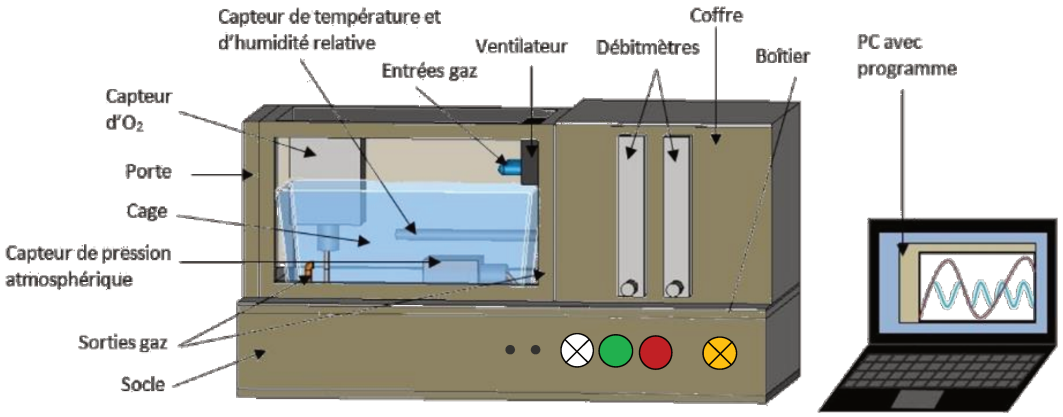


Figure 36 ◆ Représentation schématique de la chambre d'hypoxie et de ses différents composants.

2. VALIDATION TECHNIQUE DE LA CHAMBRE D'HYPOXIE

Dans un premier temps, le réglage du manomètre relié à la bouteille d'azote à une pression de 1 bar et du débitmètre à 50 L/min a permis d'obtenir une descente du taux d'O_2 de 21 % à 5 % en 40 secondes. Dans le cas d'une HC, il est possible de constater une très faible augmentation de la concentration d'O_2 sur les 40 minutes d'hypoxie (Figure 37A). Cela peut notamment s'expliquer par une potentielle fuite au niveau des joints de l'enceinte qui pourrait induire une légère entrée d'air dans la chambre. Cependant, le taux d'oxygène reste à une valeur de 5 % ± 1 %, à l'instar de ce qui est prévu dans le protocole. Malgré tout, une sécurité a été ajoutée au programme afin d'induire une nouvelle injection d'azote dans la chambre dans l'hypothèse où le pourcentage d'O_2 dépasserait les 6 %. Par ailleurs, cette entrée d'air n'impacte pas les cycles d'HI car la durée de l'hypoxie est très courte (20 secondes ; Figure 37B). Pour le retour à la normoxie après l'HC, les animaux sont sortis de l'enceinte après 40 minutes et l'azote est évacué grâce à la pompe à air. En revanche, lors d'une Hi, l'enceinte est maintenue fermée. De plus, la pompe à air n'étant pas assez efficace pour induire une remontée en normoxie en moins de 30 secondes, de l'O_2 est injecté conjointement à l'air à une pression de 1 bar et un débit de 20 L/min, jusqu'à atteindre 18% d'O_2. Puis, seule la pompe reste active jusqu'à la normoxie.

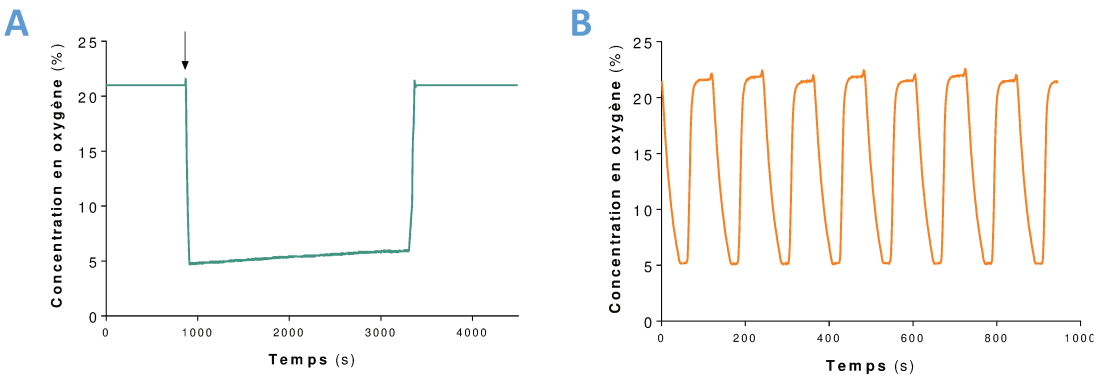


Figure 37 ◆ Représentation d'une hypoxie continue (A) et des cycles d'hypoxie intermittente (B).

Par ailleurs, les gaz étant sous haute pression, froids et secs en sortie de bouteille, nous nous sommes attachés à vérifier ces trois paramètres environnementaux. Nos données indiquent que la pression atmosphérique et la température restent stables au cours des deux protocoles d'hypoxie (Figure 38).

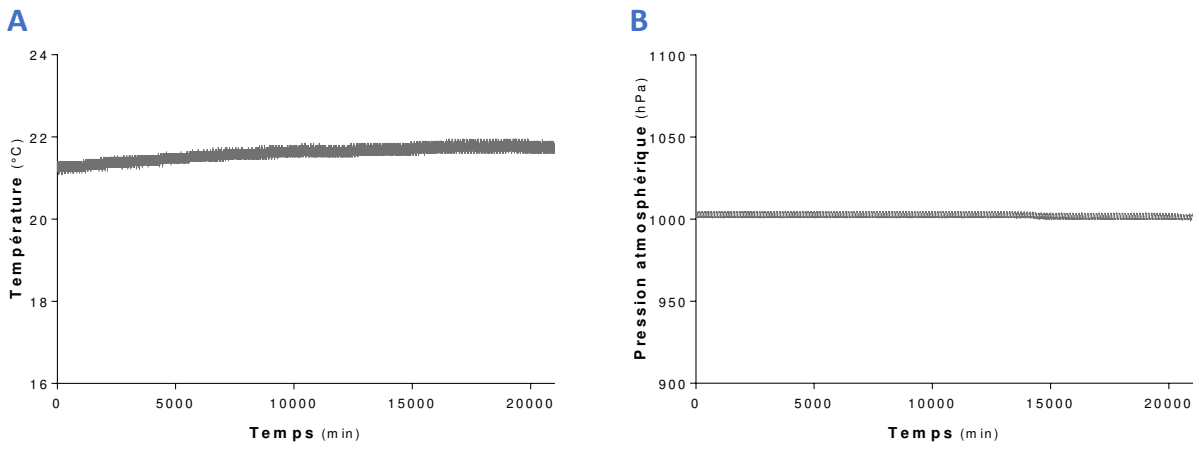


Figure 38 ◆ Evolution de la température (A) et de la pression atmosphérique (B) en fonction du temps au cours des cycles d'hypoxie.

En revanche, les valeurs du capteur d'hygrométrie révèlent que le taux d'humidité dans la chambre d'hypoxie varie lors les différentes phases des cycles d'HI (Figure 39). Ainsi, l'injection d'azote au sein du dispositif pendant l'hypoxie induit une diminution du taux d'humidité ambiant, qui remonte lors du retour à la normoxie. Cependant, les fluctuations n'excédant pas 10%, ce paramètre n'a pas d'incidence sur les résultats obtenus *in vivo*.

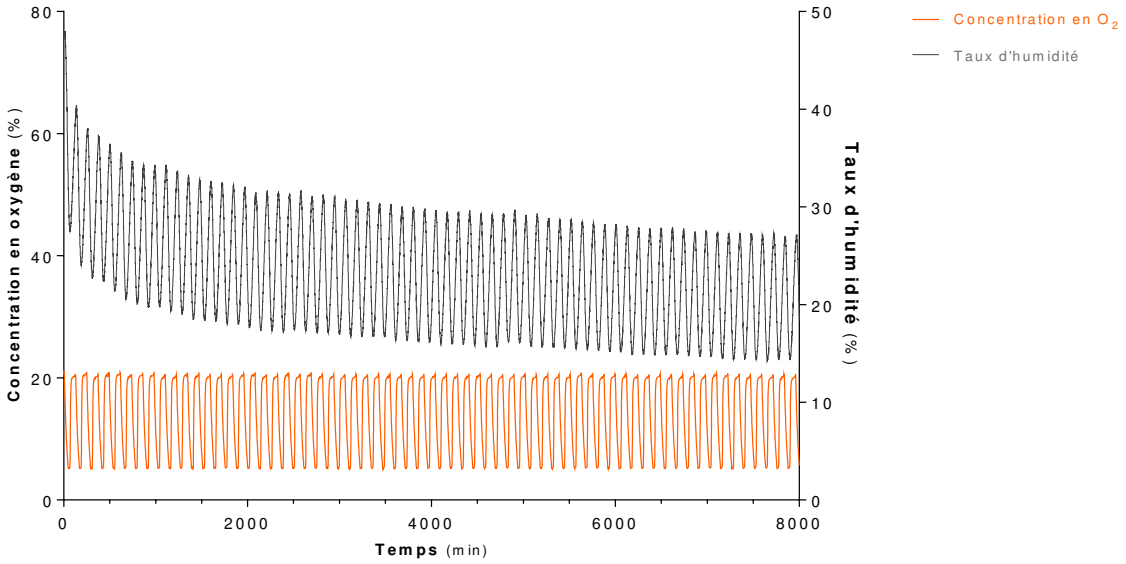


Figure 39 ◆ Evolution du taux d'humidité et du niveau d'oxygène en fonction du temps au cours des cycles d'hypoxie intermittente.

Au niveau sonore, des silencieux ont été ajoutés pour limiter le bruit des gaz entrants dans l'enceinte, permettant d'obtenir une puissance acoustique ambiante comprise entre 65 et 88 dB (Figure 40). En revanche, l'ouverture et la fermeture des électrovannes génèrent un son court et inévitable pouvant atteindre 100 dB (Figure 40). Bien que la surveillance visuelle n'ait pas révélé de comportement de stress lié à ce bruit, les animaux contrôles ont été placés dans une enceinte similaire et soumis aux sons des électrovannes lors des expériences, pour les placer dans les mêmes conditions environnementales.

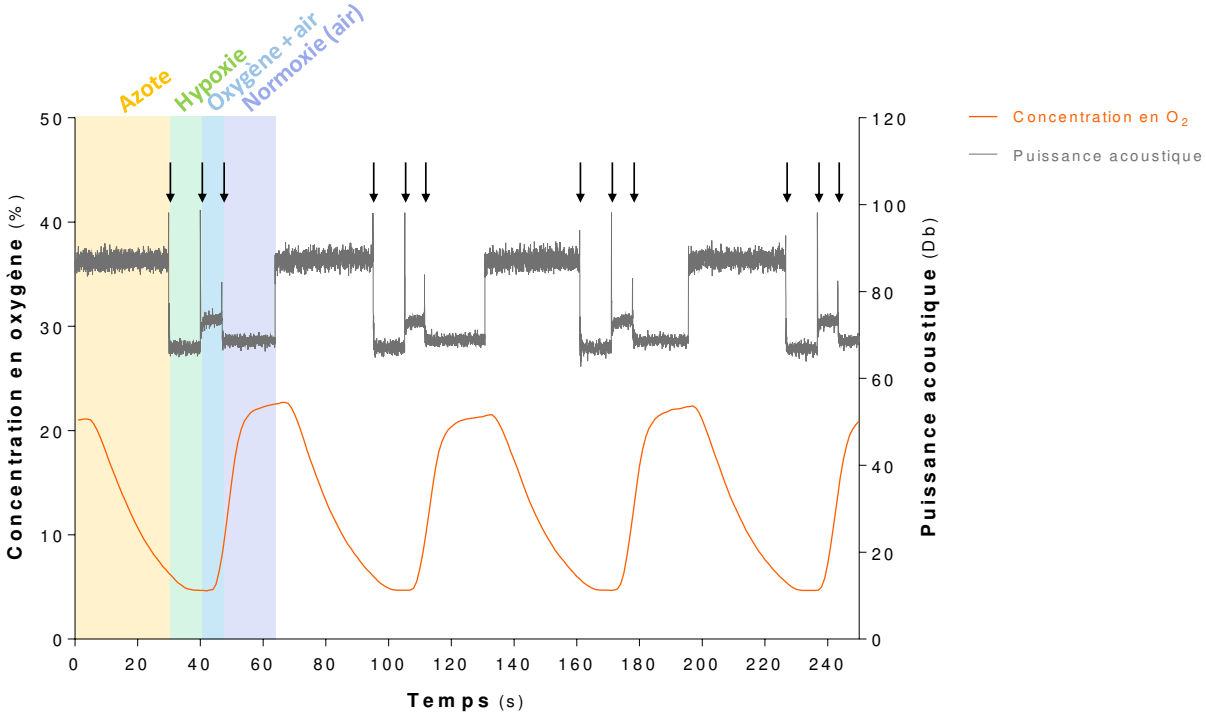


Figure 40 ◆ Evolution de la puissance acoustique et du niveau d'oxygène en fonction du temps au cours des cycles d'hypoxie intermittente. Le niveau sonore évolue selon les phases des cycles d'HI, à savoir l'injection d'azote, l'hypoxie, l'injection d'oxygène et d'air, et l'injection d'air seul en normoxie. La transition entre chaque phase est marquée par une augmentation du bruit due aux électrovannes, indiquée sur la figure par une flèche.

3. VALIDATION PHYSIOLOGIQUE DE LA CHAMBRE D'HYPOXIE : EFFET D'UNE HYPOXIE PERINATALE AIGUË SUR LE CERVELET AU COURS DU DEVELOPPEMENT

Cette étape de validation a 3 objectifs : *(i)* vérifier que le taux de 5% d'oxygène prévu dans les protocoles n'induit pas un taux de mortalité trop important, *(ii)* déterminer si l'hypoxie induit des altérations détectables au niveau du cervelet et *(iii)* définir l'âge auquel la sensibilité du cervelet est la plus significative. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet d'une HC (40 min ; 5% d'O_2) sur le cervelet de souriceaux âgés de 6, 12 et 21 jours postnataux. Nos résultats sur la survie indiquent que l'HC

induit un taux de mortalité faible chez les animaux à P6 et P12 (respectivement 2,7 % et 1,3 % de mortalité à 40 minutes), mais entraîne la mort de 16,7 % des souris âgées de P21 (Figure 41).

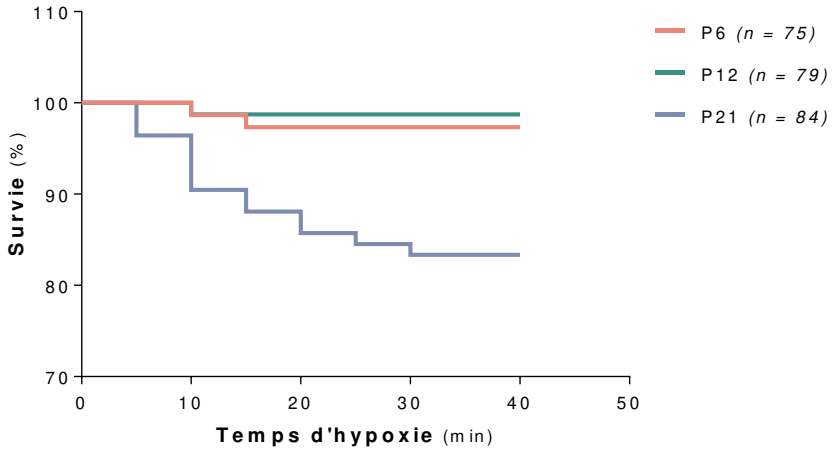


Figure 41 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la survie des souris en fonction de leur âge. Le pourcentage de survie de souris ayant subi une hypoxie continue (40 min ; 5% O_2) à 6 (P6), 12 (P12) et 21 (P21) jours postnataux est mesuré au cours des 40 minutes de protocole. Le nombre d'animaux utilisés au sein de chaque groupe expérimental (*n*) est indiqué en légende.

Une étude de suivi pondéral à moyen terme a également été menée afin de voir si l'HC induit une perte ou une prise de poids chez les animaux, pouvant témoigner d'un stress, d'un retard de croissance ou de modifications comportementales. Nous pouvons ainsi observer qu'une hypoxie périnatale aiguë réalisée à P6 n'induit pas de variation de masse corporelle lorsque les animaux atteignent l'âge de 12 et 21 jours (Figure 41).

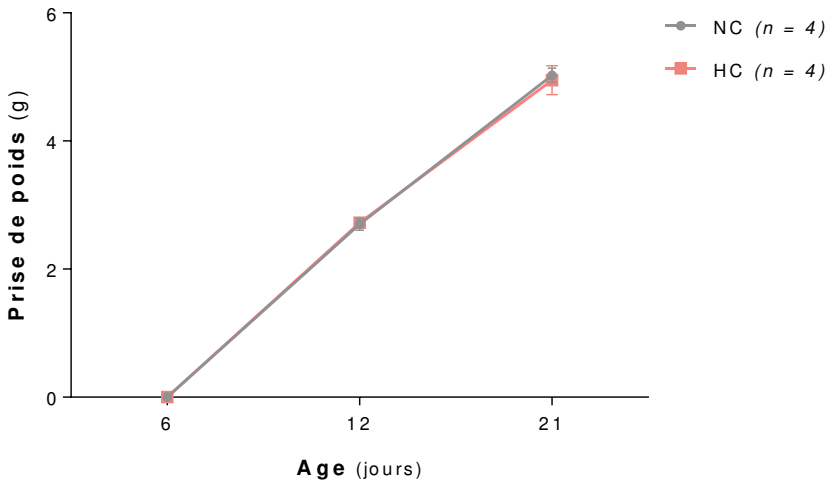


Figure 42 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la masse corporelle des souris. Le poids des animaux ayant subi une hypoxie continue (40 min ; 5% O_2) est mesuré avant l'hypoxie puis à P12 et P21. Le nombre d'animaux utilisés au sein de chaque groupe expérimental (*n*) est indiqué en légende.

Nous avons ensuite déterminé si la diminution de l'oxygène ambiant induit une stress oxydatif au niveau cérébelleux chez les animaux. Pour ce faire, une mesure de la production de ROS dans le cervelet a été réalisée 0, 6 et 24 h post-hypoxie (Figure 43). Chez les souris âgées de 6 et 12 jours, la carence en O_2 entraîne une augmentation significative immédiate du taux cérébelleux de ROS par rapport aux animaux contrôles (respectivement + 16,9 ± 3,552 % et + 13,6 ± 2,504 % ; Figures 43A et 43B). Cette surproduction, bien que non significative, reste visible 6h et 24h après l'HC chez les animaux P6 mais disparaît chez les souris P12. De plus, l'hypoxie aiguë n'a aucun effet sur la concentration de ROS dans le cervelet à P21, quel que soit le temps post-hypoxie auquel les prélèvements ont été effectués (Figure 43C).

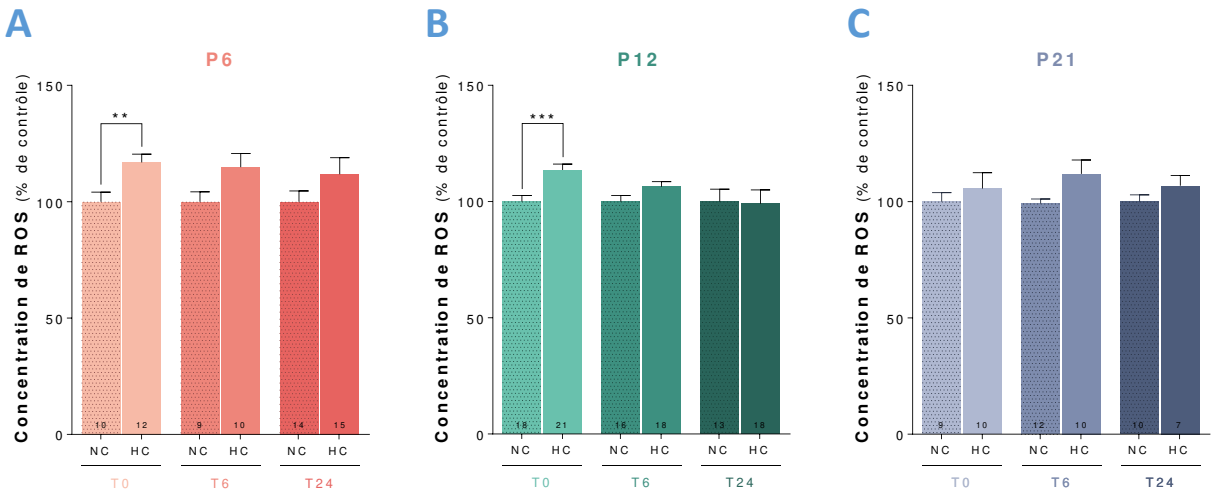


Figure 43 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la production d'espèces réactives de l'oxygène dans le cervelet. La concentration cérébelleuse de ROS est mesurée à 0, 6 et 24 heures post-hypoxie chez des souris contrôles (NC) et hypoxiques (HC) âgées de P6 **(A)**, P12 **(B)** ou P21 **(C)**. Le nombre d'animaux utilisés au sein de chaque groupe expérimental est indiqué dans les barres d'histogrammes. ROS : espèces réactives de l'oxygène ; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Par la suite, l'activité enzymatique des caspases-3/7 a été mesurée au sein du cervelet, afin de vérifier si les modifications liées au stress oxydatif sont accompagnées d'une mort cellulaire. Chez l'ensemble des animaux, aucune modification de l'activité apoptotique n'est observée 0 et 6 heures suivant l'hypoxie (Figure 44). En revanche, quel que soit l'âge des souris au moment de l'HC, cette dernière entraîne une augmentation significative de l'activité des caspases-3/7 dans le cervelet après 24 heures (+ 19,9 ± 6,853 % à P6 (Figure 44A) ; + 12,5 ± 3,342 % à P12 (Figure 44B) ; + 10,2 ± 4,424 % à P21 (Figure 44C)). Cette étude a été complétée par une analyse immunohistochimique permettant de déterminer la densité des cellules en apoptose en fonction des couches cérébelleuses.

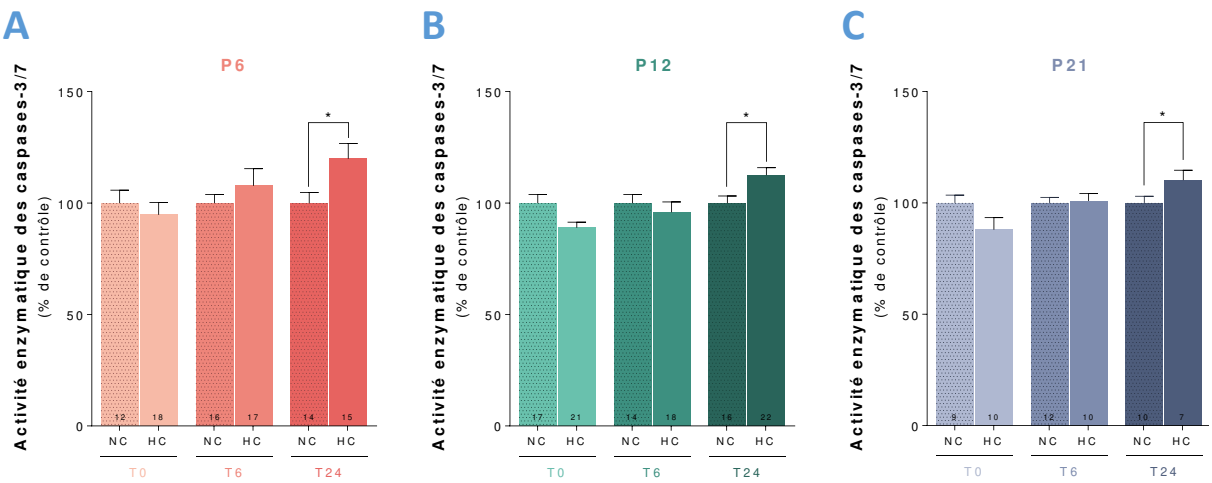


Figure 44 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur l'activité enzymatique des caspases-3/7 dans le cervelet. L'activité apoptotique des caspases-3/7 est mesurée à 0 (T0), 6 (T6) et 24 (T24) heures post-hypoxie chez des souris âgées de 6 (P6 ; **(A)**), 12 (P12 ; **(B)**) ou 21 (P21 ; **(C)**) jours postnataux en condition contrôle (NC) ou après une hypoxie continue (HC ; 40 minutes ; 5 % O_2). Le nombre d'animaux utilisés au sein de chaque groupe expérimental est indiqué dans les barres d'histogrammes. * $P < 0,05$.

Nos résultats, déterminés sur des souris P12 à 24 heures post-hypoxie, révèlent que les cellules caspase-3-clivée-immunoréactives sont plus nombreuses chez les souris HC que chez les souris contrôles (+ 162.8 ± 12.829 % ; Figure 45A). Cette augmentation est liée à une densité de cellules en apoptose plus élevée dans la CM (+ 187.1 ± 15.177 %), la CP (+ 393.9 ± 26.727 %) et la CGI (+ 155.8 ± 11.735 %) (Figures 45B et 45C). En revanche, l'HC n'a pas d'effet pro-apoptotique significatif dans la substance blanche et la CGE (Figures 45B et 45C).

Par ailleurs, nos données ne montrent pas de différences entre les animaux contrôles et hypoxiques tant au niveau de l'épaisseur totale du cortex cérébelleux que dans l'organisation des différentes couches cérébelleuses (Figure 46A-D). La structure globale du cervelet est donc similaire 6 et 15 jours après une HC, comme le révèle le marquage immunohistochimique des différentes couches du cortex cérébelleux (Figures 46E et 46F).

Ainsi, au cours de cette première partie du projet, nous avons développé une chambre d'hypoxie fonctionnelle nous permettant de réaliser deux types d'HP, continue et intermittente, tout en conservant des conditions environnementales compatibles avec la survie des animaux. Les résultats obtenus sur un modèle d'HC démontrent qu'un manque d'oxygénation aigu en période périnatale peut induire des modifications à l'échelle cellulaire, en induisant un stress oxydatif et une mort apoptotique, sans toutefois affecter la structure globale du cervelet.

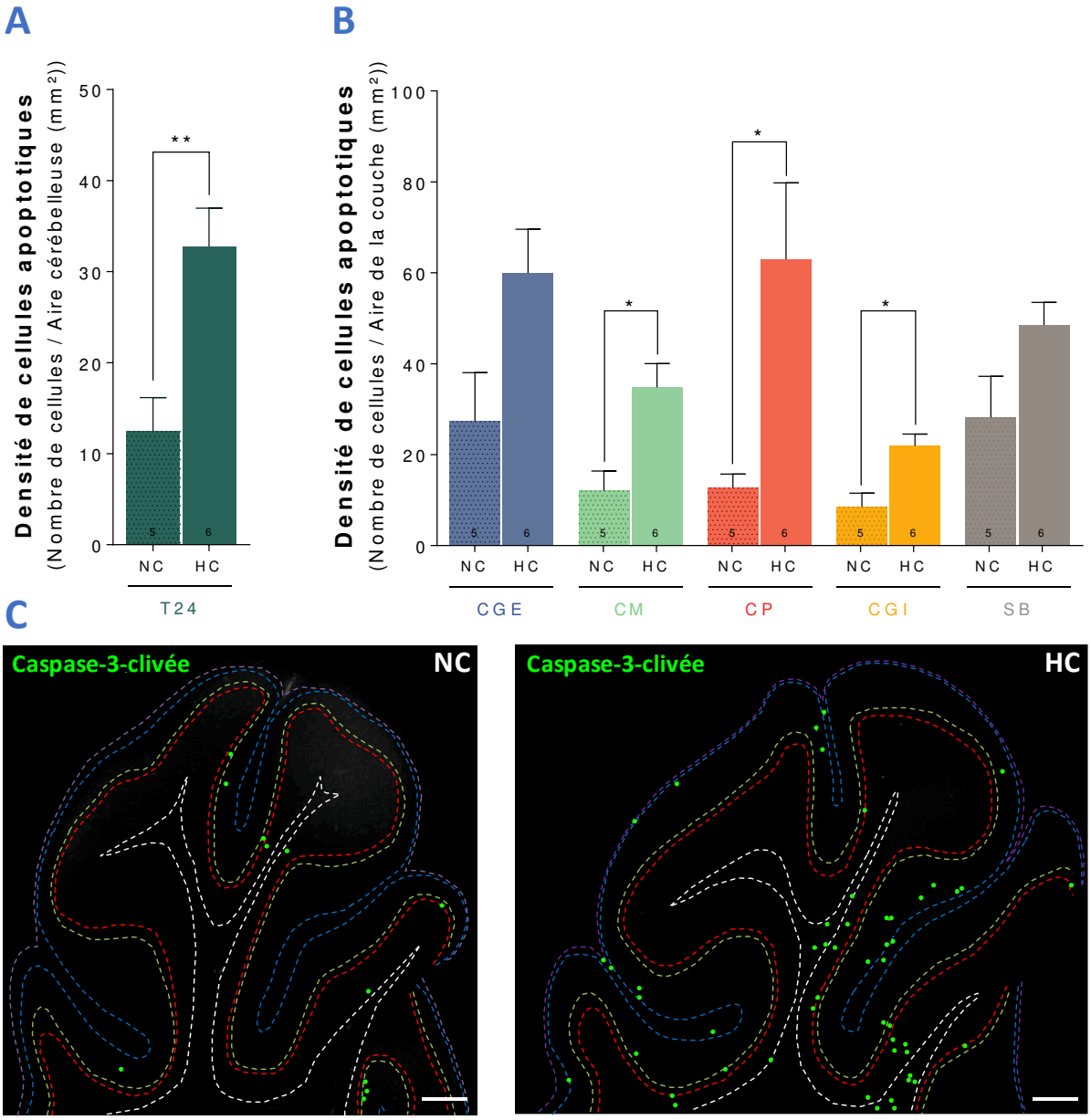


Figure 45 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur la densité de cellules apoptotiques dans le cervelet de souris. 24 heures (T24) après la fin du protocole, un marquage de cellules apoptotiques a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-caspase-3-clivée dans le cervelet de souris âgées de 12 jours postnataux (P12), en condition contrôle (CN) ou après une hypoxie continue (HC ; 40 minutes ; 5 % O_2). La densité de cellules immunoréactives est mesurée dans l'ensemble du cervelet **(A)** et au sein de des différentes couches cérébelleuses **(B)**. Une illustration de la distribution des cellules en apoptose (points verts) chez les souris contrôles (CN) et hypoxiques (HC) est représentée en **(C)**. Le nombre d'animaux utilisés au sein de chaque groupe expérimental est indiqué dans les barres d'histogrammes. CGE ; couche granulaire externe ; CGI : couche granulaire interne ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje ; SB : substance blanche ; échelle = 200 µm ; * $P < 0,05$; * $P < 0,01$.

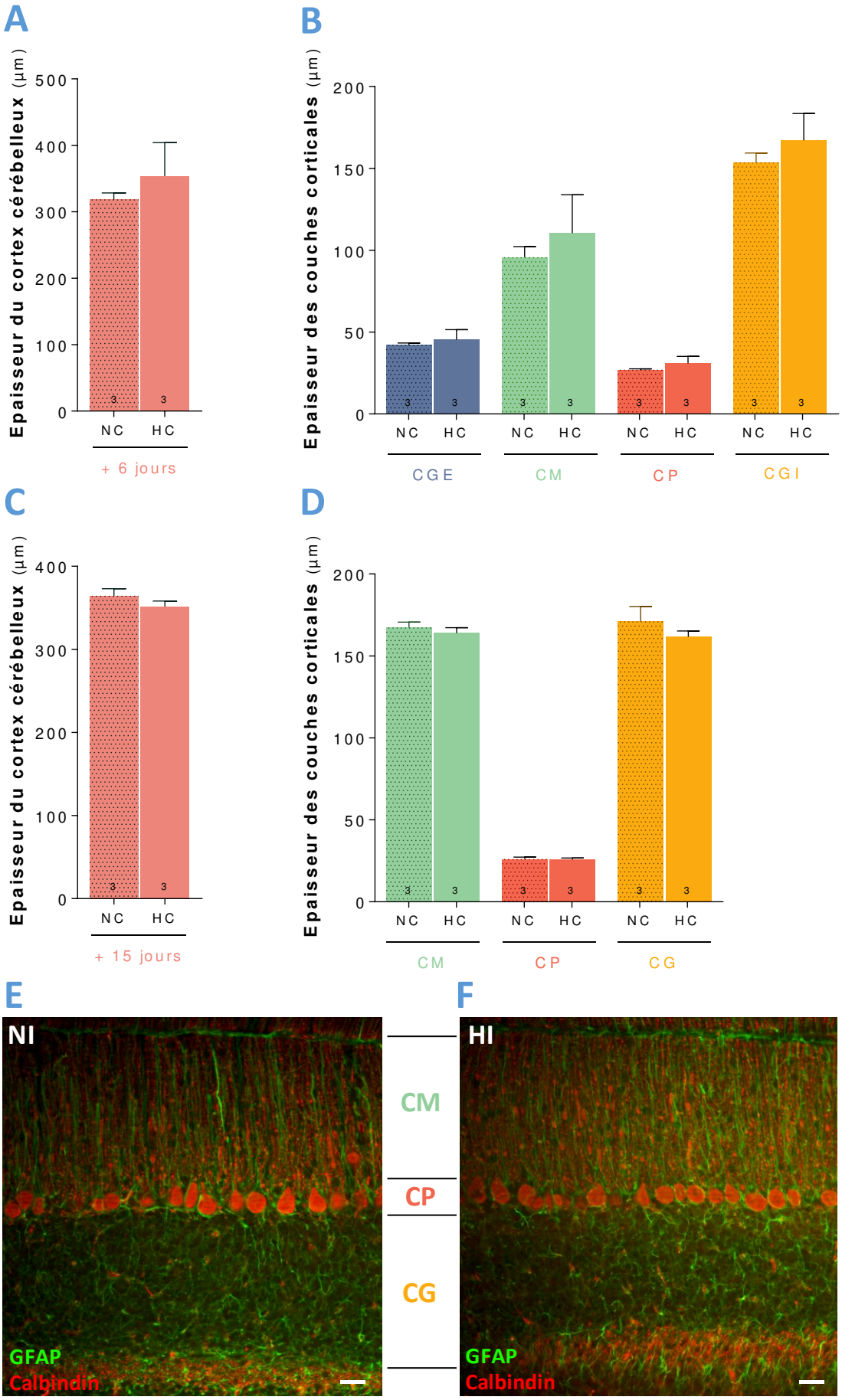

A
Epaisseur du cortex cérébelleux (µm)
500
400
300
200
100
0
3
3
NC
HC
+ 6 jours
B
Epaisseur des couches corticales (µm)
200
150
100
50
0
NC
HC
CGE
CM
CP
CGI
C
Epaisseur du cortex cérébelleux (µm)
+ 15 jours
D
Epaisseur des couches corticales (µm)
CM
CP
CG
E
NI
CM
CP
CG
GFAP
Calbindin
F
HI
GFAP
Calbindin

Figure 46 ◆ Effets d'une hypoxie périnatale continue sur l'organisation histologique du cervelet de souris. 6 **(A, B)** et 15 **(C, D)** jours après la fin du protocole, un marquage immunohistochimique des cellules de Purkinje et des cellules gliales de Bergmann a été réalisé respectivement à l'aide d'anticorps anti-calbindine et anti-GFAP dans le cervelet de souris en condition contrôle (NC) ou après une hypoxie continue (HC ; 40 min ; 5 % O_2) réalisée à P6. L'épaisseur du cortex **(A, C)** et des différentes couches cérébelleuses **(B, D)** a été mesurée grâce à ces marquages. Le nombre d'animaux utilisés au sein de chaque groupe expérimental est indiqué dans les barres d'histogrammes. **(E, F)** Représentation du marquage immunohistochimique des cellules gliales de Bergmann (vert) et des cellules de Purkinje (rouge) au sein du cortex cérébelleux de souris contrôle (NI) ou hypoxique (HI) âgées de 21 jours. CGE ; couche granulaire externe ; CGI : couche granulaire interne ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje ; GFAP : *glial fibrillary acidic protein* ; échelle = 50 µm ; * $P < 0,05$; * $P < 0,01$.

PARTIE II – EFFETS DE L'APNEE DU PREMATURE SUR LE DEVELOPPEMENT DU CERVELET : ETUDE D'UN MODELE D'HYPOXIE PERINATALE INTERMITTENTE CHEZ LA SOURIS

L'hypoxie est associée à un retard de développement du cervelet et à des déficits fonctionnels sur le long terme dans un modèle murin d'apnée du prématuré

Sarah Leroux, Arnaud Arabo, Magali Basille-Dugay, David Vaudry et Delphine Burel

En préparation

L'apnée du prématuré est une pathologie fréquente, affectant plus de la moitié des enfants nés prématurément. Si les observations cliniques ont démontré qu'elle induit des conséquences sur le long terme en conduisant à différents troubles neurodéveloppementaux, son étude reste difficile du fait du manque d'homogénéisation des modèles animaux. Par ailleurs, très peu de travaux se sont intéressés à son impact sur le cervelet, qui contrôle pourtant une majorité des fonctions affectées chez les enfants prématurés ayant subi des apnées. Notre travail a donc consisté à :

- Déterminer les effets de l'hypoxie périnatale intermittente sur les mécanismes cellulaires du développement cérébelleux chez un modèle murin d'apnée du prématuré : stress oxydatif, mort cellulaire, *prolifération et migration (actuellement en cours de réalisation)*.
- Mettre en évidence les conséquences de cette pathologie sur la mise en place et l'organisation du cortex cérébelleux à court et long terme
- Caractériser l'impact fonctionnel de ces hypoxies en étudiant le comportement des souris au cours de leur développement mais aussi à l'âge adulte

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude font l'objet d'un article actuellement en cours de préparation.

Key words: cerebellum; apnea of prematurity; development; histology; motor coordination; spatial learning.

Hypoxia is associated with a retardation of cerebellar development and long-term functional deficits in a mouse model of apnea of prematurity.

Leroux S.[1], Arabo A.[2], Basille-Dugay M.[1], Vaudry D.[1,3], Burel D.[1]

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France.

[2]Faculty of Sciences, Experimental investigation - Service Ressources Biologiques (SRB), Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University Rouen Normandie, Mont-Saint-Aignan, France.

[3]Regional Platform for Cell Imaging of Normandy (PRIMACEN).

Acknowledgments: S.L. was the recipient of a doctoral fellowship from Normandy Region. This work was supported by INSERM (U1239), Rouen University, Normandy Region and European Union. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Abstract

Apnea of prematurity (AOP) is a common injury as it is involved in more than 50 % of premature newborns. This pathology, due to the immaturity of respiratory control has already been shown to induce various neurodevelopmental disorders in children. However, the pathogenesis of the disease is not completely known and its effects on the central nervous system are not clearly determined. Yet cerebellum could be a target of AOP because of its immaturity during the perinatal stage and its vulnerability in premature babies. Moreover, a correlation has been shown between the cerebellar functions and the deficits observed in children after AOP, such as motor deficits or learning disorders, suggesting that this structure could be affected.

Thus, this study aims to identify the effects of AOP on cerebellar development using an animal model based on intermittent hypoxia (HI). The protocol consists of 2-minute cycles of hypoxia and reoxygenation repeated over 6 hours on C57Bl6/J mice during 10 days from postnatal day 2.

Firstly, we showed that ROS production increases after HI, indicating that it actually affects cerebellum. However, surprisingly, this oxidative stress is associated with a decrease in the caspases-3/7 activity. Moreover, HI induces a decrease in the cerebellum thickness and a disorganization of the cortical layers. However, these cellular and histological alterations are transient, suggesting that the cerebellum may trigger a long-term neuroprotective process during development to compensate an early cell death induced by the O_2 deprivation. Finally, our AOP model is associated with a development retardation including a less weight gain and delays in righting and grasping reflexes. These functional alterations are long lasting, as deficits in motor coordination and spatial learning are observed in adult mice submitted to perinatal HI.

To conclude, this work demonstrates that the cerebellum is sensitive to apnea of prematurity, with modifications in cellular mechanisms involved in cerebellar development such as oxidative stress or apoptosis, leading to retardation in the structure maturation and long-term behavioral deficits. In the long term, our data aim to correlate the functional deficits observed in children who have suffered from PH with cerebellum alterations to improve their health care.

Introduction

Apnea of prematurity (AOP) is a developmental disorder characterized by a sudden cessation of breathing, lasting at least 20 seconds and/or associated with bradycardia or oxygen desaturation (Eichenwald, 2016). This condition affects at least 50 % of premature infants and nearly 100 % of extremely preterm neonates, born before 29 weeks of gestation (Zhao et al., 2011). Although it has been shown that apneas are mostly due to a physiological immaturity of respiratory control, the pathogenesis of and neurological consequences of this disease remain unclear (Abu-Shaweesh and Martin, 2008).

However, as improvements in healthcare have helped to reduce mortality in recent years, long term deficits following AOP are now noticeable. Indeed, a correlation has been established between apnea duration and neurodevelopmental disorders, including language, cognitive and motor impairments (Janvier et al., 2004). These deficits appear to reflect the severity of AOP, with short respiratory arrests being inconsequential and longer ones deleterious (Pillekamp et al., 2007). Thus, it has been shown that apneas in preterm babies are associated with an increased risk of periventricular leukomalacia (Kakita et al., 2009; Huang et al., 2017).

To better understand of the pathogenesis and outcomes in humans, several animal models have been developed based on intermittent hypoxia (Cai et al., 2011; Oorschot et al., 2013; Goussakov et al., 2019). Repeated cycles of hypoxia and reoxygenation represent the main components of the disease and have been shown to induce cellular impairments and oxidative stress, leading to injuries in the central nervous system. Indeed, Cai et *al.* (2012) demonstrated oligodendrocyte and synaptic alterations in the striatum and corpus callosum following perinatal intermittent hypoxia. Moreover, a decreased long-term potentiation and memory disorders are also observed (Oorschot et al., 2013; Goussakov et al., 2019).

However, despite the increasing number of studies trying to assess the effects of AOP on the brain, very few researches investigate the impact of this pathology on the rest of the nervous system, such as the cerebellum. Indeed, the cerebellar cortex is immature at birth (Volpe, 2009) and consists of 4 layers which undergo an important maturation from the last trimester of pregnancy to the postnatal period. In humans, the granular neuron precursors firstly proliferate in the external granular layer (EGL), which reaches a peak of thickness between the 20th and the 30th weeks of gestation. Then, thanks to the Bergmann glia, these precursors migrate through the molecular layer (ML), cross the Purkinje cell layer (PL) and differentiate to form the internal granular layer (IGL;

Rahimi-Balaei et al., 2018). In the meantime, Purkinje cells develop their dendritic arborization. This allows the establishment of synaptic contacts with granule cell axons, called parallel fibers and the enlargement of the ML. As a result, these neurons receive indirect information from mossy fibers and compare it with data directly supplied by the climbing fibers of the olivary nucleus.

Thus, the cerebellum controls various motor behaviors such as equilibrium or motor coordination, but also higher functions such as language, learning or spatial orientation (Petrosini, 1998; Lavond, 2002; Guell et al., 2015). It appears that most of these processes are altered in children affected by AOP (Janvier et al., 2004; Pillekamp et al., 2007). In particular, Sathyanesan et *al*. (2018) has demonstrated that chronic perinatal hypoxia leads to persistent motor coordination disorders and learning deficits. These data suggest that perinatal incidents such as apnea could impact the cerebellar development and lead to behavioral deficits. According to this hypothesis, it has been shown that intermittent hypoxia in rodent provokes Purkinje cell alterations, hypomyelination and oxidative stress (Biran et al., 2011; Cai et al., 2011; Cai et al., 2012; Chiu et al., 2012).

In this work, we decided to analyze the cerebellum histology during development, as well as the young and adult behavior in a mouse model of AOP. We first determined the effect of intermittent hypoxia on oxidative stress, proliferation, apoptosis and cortical layer organization. Moreover, we investigated short term and long-term motor and learning functions to find out whether the cellular defects revealed were associated with behavior disorders. With time, our results aim to correlate cerebellar alterations with the long-term deleterious consequences observed in preterm children.

Materials and methods

Animals **–** Animals used in this study were wild type C57/Bl6J mice born and bred in an accredited animal facility (approval B.76-451-04) in accordance with the French Ministry of Agriculture and the European Community Council Directive 2010/63/UR of September 22nd, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The mice were kept under a 12-hour light/dark cycle and had free access to food and water.

Intermittent hypoxia protocol **–** The model of intermittent hypoxia is based on the paradigm developed by Cai et al. (2011) and consisted of 2-minute cycles of hypoxia (5 % O_2; 20 seconds/cycle) and reoxygenation for 6 hours per day. The protocol was initiated in neonatal C57Bl6/J pups (HI group) aged of 2 days (P2) and continued for 10 consecutive days. Oxygen concentration, temperature, hygrometry and atmospheric pressure in the hypoxic chamber were continuously monitored. Control pups (NI group) were placed in another chamber in the same environment but in normoxic conditions and in the same environmental conditions. Upon completion of an intermittent hypoxia course, some mice were used for enzymatic and oxidative assays. For histological studies, P12 or P21 mice were sacrificed after being anaesthetised by isoflurane inhalation (1000 mg/g; Iso-vet) and brains were rapidly removed and fixed overnight in 4 % paraformaldehyde. Then, they were rinsed in phosphate buffer saline (PBS) prior to section into frontal 80-µm thick slices with a vibratome (VT1000S, Leica Microsystems). The remaining mice were raised until P64 and used for behavioural assessments.

ROS production assay **–** Cerebellar ROS production was evaluated with 2’,7’-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA; Sigma-Aldrich). 100 µL of homogenized cerebellum were incubated with 2 µL of DCFDA. In the presence of ROS, DCFDA is converted to fluorescent 2’,7’-dichlorofluorescein (DCF). The fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm every 15 minutes during 45 minutes with an Infinite 200 microplate reader (Tecan). Data were standardized after protein quantification of each sample with a Bradford assay.

Caspases-3/7 activity assay **–** The enzymatic activity of caspases-3/7 in the cerebellum was evaluated with the Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). 100 µL of homogenized cerebellum were incubated at 37 °C with 100 µL of caspase assay buffer containing the Z-DEVD-aminoluciferin substrate. The fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm every 6 minutes during 3 hours with

an Infinite 200 microplate reader. Data were standardized after protein quantification of each sample with a Bradford assay.

Immunolabelling **–** For immunohistochemical studies, brain slices were blocked at room temperature with normal donkey serum diluted at 1:50 in a buffer containing 0.3 % Triton X-100. Then, the tissues were incubated at 4 °C with primary antibodies diluted in the same buffer **(Table 1)**. After three 10-minute washes in PBS, the tissues were incubated at room temperature for 2 hours with the corresponding secondary antibodies diluted at 1:250 **(Table 1)**. The slices were rinsed three times for 10 minutes in PBS and labelled for 1 minute with DAPI (2 µg/mL) for nucleus counterstaining before a last wash in PBS. Finally, they were mounted with Mowiol. Image acquisition was performed with a confocal microscope (TCS SP8 MP, Leica Microsystems), and cerebellar and cortical layer thickness were analysed using the ImageJ software.

Behavioral studies

Mice were accustomed to the testing room for at least one hour prior to the experiments.

Righting reflex test **–** In this test, pups were placed in a supine position and the time needed to recover a complete prone position was measured. Two daily consecutive trials were performed on each pup from P2 to P11 with a 60 seconds cut-off period.

Grasping reflex test **–** In this test, pups were hanging by their forepaws on a stretched string and the latency before falling was measured. Two daily consecutive trials were performed on each pup from P2 to P11 with a 60 seconds cut-off period.

Muscular strength test **–** In this test, mice were held by the tail and allowed to grasp a string with their forepaws. Then, they were progressively pulled backward by the tail. The maximal force was recorded by a dynamometer linked to the grip-strength apparatus. Four trials were performed on each mouse at P21.

Horizontal beam test **–** In this test, mice were placed on a wooden beam (1 m length, 0.5 cm diameter) and the time needed to cross the beam was measured, as well as the number of missteps. Three trials were performed on each mouse at P53.

Morris water-maze test **–** This test requires a round pool of 120 cm of diameter, surrounded with visual clues and filled with water mixed with an opaque white dye. Each mouse aged P53 was given

60 seconds to habituate to the pool. Then, a cue session was performed at P56 and during 5 consecutive days, corresponding to the acquisition and consolidation phases. An invisible platform was placed in the northwest quadrant and submerged approximately 1 cm below the water surface. Each animal was placed in the pool and had 60 seconds to find the platform and to stay on it for 5 seconds. If mice did not find the platform, they were gently guided to it and stayed there for 20 seconds. Four trials with different starting positions were performed each day. On the last day, a probe session was conducted, referring to the retrieval phase. The platform was removed and each mouse was placed in the centre of the pool. Mice were given 60 seconds to explore the environment. The animal behavior and different parameters such as freezing time or distance travelled were analysed with a video tracking software Any-MAZE.

Actimetry test **–** In this test, P63 mice were placed in the middle of a 45x45x30 box and their spontaneous locomotor activity was recorded during 10 minutes with the video tracking software Any-MAZE. Various parameters such as distance and mean speed were measured, and the grooming time and the number of rearing were logged.

Elevated plus maze **–** In this test, P64 mice were placed at the intersection of a maze consisting of 2 opposed closed arms crossing 2 opposed open arms. The animals were tracked during 5 minutes by Any-MAZE software. The time spent and the number of entries in each arm were recorded.

Statistical analysis – Statistical analysis was performed with GraphPad Prism® (version 6.04). Data from ROS and caspases-3/7 assays were assessed using a Mann-Whitney test, as for horizontal beam test, actimetry test, elevated plus maze and cue session of the Morris water-maze test. The other behavioral analyzes requiring time tracking (weight, righting and grasping reflex tests, probe session of the Morris water-maze test) were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA). For all analysis, $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

Effects of perinatal intermittent hypoxia on cellular mechanisms of development

In order to mimic apnea of prematurity, cycles of hypoxia and reoxygenation were performed in neonatal mice (2 min/cycle, 6 hours/day, 10 days). To evaluate the oxidative stress induced by hypoxia in the cerebellum, we measured the concentration of ROS produced in mice cerebella at the end of the apnea protocol. We observed that the rate of ROS production is increased in HI-treated animals compared to controls (+ 20 %; **Fig 1A**). We also examined the enzymatic activity of caspases-3/7 to determine if this overproduction of oxygenated radicals leads to cellular death. Our results revealed that following intermittent hypoxia, pro-apototic activity is decreased in the cerebellum of HI mice (- 8.83 %; **Fig 1B**).

Effects of perinatal intermittent hypoxia on the structural organization of the cerebellum

Immunohistochemical studies were performed by using DAPI, GFAP and calbindin labelling at the end or 9 days after the protocol in order to analyse the histology of the cerebellum in short and long term. Immunofluorescent imaging revealed a rapid disorganisation of the cerebellar cortex in HI-treated mice compared to controls **(Fig 2A-D)**. The measurement of cerebellar cortex thickness at P12 shows a reduction in HI mice (- 106.7 ± 18.72 µm; **Fig 2E**), associated to a decrease in the internal granular layer (IGL) and molecular layer (ML) thickness (respectively - 58.07 ± 3.872 µm and - 50.25 ± 8.116 µm; **Fig 2F**).

We also calculated the relative proportion of each layer with respect to the size of the cortex. We interestingly found that despite the thickness reduction of both layers, only the ML proportion is diminished in hypoxic animals (- 17.49 ± 4,99 %; **Fig 2G**). In contrast, the external granular layer (EGL) is not altered by intermittent hypoxia **(Fig 2F)**, but size relative to the HI cortex is significantly increased (+ 63.66 ± 12.193 %; **Fig 2G**).

However, all these histological alterations are no longer visible at P21. **(Fig 2H-J)**.

Effects of perinatal intermittent hypoxia on physical and behavioral development

We performed two different tests to investigate if perinatal intermittent hypoxia could alter behavioral development in pups. Firstly, we found that in the righting reflex test, hypoxic mice take longer to right at P6 and P7 compared to the control ones (respectively + 26.56 ± 6.266 s and + 32.79 ± 6.45 s; **Fig 3A**). Our data also revealed that the hanging time of hypoxic mice is shorter than the one of the control pups from P9 to P11 in the grasping reflex test (respectively - 2.92 ± 0.63 s; 6.52 ± 0.897 s; - 10.29 ± 0.45 s; **Fig 3B**). Moreover, intermittent hypoxia induces a growth

delay from P4 to P11 in HI-treated mice with lower weight gain at the end of the protocol (- 1.93 ± 0.105 g at P11; **Fig 3C**) but has no effect on the muscular strength of mice at P21.

Long term effects of perinatal intermittent hypoxia on locomotor activity

Adult mice were subjected to an actimetry test in order to examine whether perinatal intermittent hypoxia could lead to changes in spontaneous motor activity. However, our results do not highlight any effect on the mean speed or on the distance travelled by HI-treated animals compared to the control ones **(Fig 4B, 6C)**.

Long term effects of perinatal intermittent hypoxia on motor coordination

We examined motor coordination in adult mice with the horizontal beam test to evaluate if perinatal intermittent hypoxia could induce long term alterations linked to cerebellar functions. As shown in **Fig 4**, the body weight of hypoxic mice is no longer altered at P49 **(Fig 4A)** and they spend the same time walking through the horizontal beam as control mice **(Fig 4D)**. However, hypoxic mice make more missteps on their path than controls at P53 (+ 229.17 ± 23.245 %; **Fig 4E**).

Long term effects of perinatal intermittent hypoxia on spatial learning

We assessed the impact of perinatal intermittent hypoxia on spatial learning by performing the Morris water maze in adult mice. During the cue session, perinatal intermittent hypoxia increases the latency to find the platform **(Fig 5A)** and the freezing time **(Fig 5C)** and alters the path efficiency in mice **(Fig 5B)**. Moreover, in the probe test, HI-treated mice spend less time (- 25.13 ± 9.51 %) and travel a shorter distance (- 23.24 ± 8.712 %) in the target quadrant where the platform was previously, compared to control mice **(Fig 5D)**.

Long term effects of perinatal intermittent hypoxia on anxiety

Finally, we investigated the effect of perinatal intermittent hypoxia on anxiety in adult mice to check if the behavioral disorders observed in adult were not due to distress. As shown in **Fig 6**, the number of rearing and the grooming time are similar in both groups of animals **(Fig 6A, 6B)**, as is the percentage of time spent in the centre of the device (data not shown). Moreover, in the elevated plus maze test, the time and entries in both closed and open arms are the same for HI-treated and control mice **(Fig 6C-F)**.

Discussion

The development of the cerebellum begins during the embryonic stage but continues until the postnatal period (Volpe, 2009). Indeed, this structure is immature at birth and thus particularly vulnerable to several incidents. As a result, it has been shown that it is affected in premature babies, who suffer, among other things, from cerebellar atrophy (Srinivasan et al., 2006; Steggerda et al., 2009). However, the consequences of apnea of prematurity, a common pathology affecting more than 50 % of premature babies, have not been studied on this structure. Yet, the behavioral deficits observed in children suffering from this pathology have been correlated with cerebellar functions (Janvier et al., 2004; Pillekamp et al., 2007). Based on these data, we undertook to investigate the effects of intermittent hypoxia on the cerebellar development in a murine model of AOP based on Cai et al. (2011). If our protocol does not induce any mortality, we show that it leads to growth retardation in mice. This disagrees with what was previously observed when the mother was not with the pups in the hypoxia chamber, suggesting that the weight parameter depends on the dams (Cai et al., 2011). Yet, other studies showed that perinatal intermittent hypoxia causes a weight decrease in pups, whether they are with their dams or not (Farahani et al., 2008). Moreover, we do not show any weight difference or stress in the mother during intermittent hypoxia (data not shown).

Besides these morphological consequences, our data indicate that intermittent hypoxia leads to an oxidative stress in the cerebellar cortex with an overproduction of ROS at P12. The latter is associated to a decreased activity of caspases-3/7, reflecting an inhibition of apoptosis. This result disagrees with the fact that a slight increase in ROS causes apoptotic cell death (Scherz-Shouval and Elazar, 2007) but suggests that we may have used a mild protocol of AOP, which can induce neuroprotective mechanisms during development (Bouslama et al., 2015). Yet, since enzymatic activity was measured at the end of the ten days of hypoxia, it could hide an increased apoptosis during the first days. To test this hypothesis, the caspase-3/7 activity can be measured at P6. If it is validated, it suggests that cellular death is induced at the beginning of the protocol because of hypoxia, but then decreased to act as a compensatory mechanism. Furthermore, we cannot exclude a potential caspase-independent cell death, as it has been demonstrated in an *in vitro* model of intermittent hypoxia (Chiu et al., 2012).

Next, we have investigated the cerebellar cortex organization and thickness using immunohistochemical studies. We demonstrate that at the end of the protocol, HI-treated mice exhibit a decrease in the cerebellar cortex thickness which preferentially targets the molecular layer

and the internal granular layer. As a result, the external granular layer occupies a larger part in this reduced cerebellar cortex. Thus, the proportions of each cortical layer approach the ones of a cerebellum at P6. This delay in the cerebellar development is in accordance with the global growth retardation observed. However, our next result is in favour of the compensatory mechanism hypothesis because these histological alterations are not yet observed nine days after hypoxia. This could be due to the decrease of apoptotic cell death associated to a potentiated cell migration and/or proliferation. Indeed, our protocol occurs during the second phase of granular cell proliferation and migration (Biran et al., 2012), so it can affect these mechanisms. Thus, if the development of these neurons is delayed or potentiated after hypoxia, this could compensate the alterations observed.

Yet, the histological analysis of the cerebellar cortex also reveals differences in Purkinje cell labelling, the information integration centre within the cerebellum. Altogether, these data suggest that in addition to structural alterations, the cerebellar cortex could exhibit functional deficits. Indeed, during development, HI-treated pups show behavioral defects, with a delayed righting reflex and no grasping reflex. To assess that these differences are not due to the morphological underdevelopment, we demonstrate that in spite of a lower weight, hypoxic animals have the same muscular strength as control ones at P21. Moreover, the functional deficits are still present in adulthood. Indeed, we highlight motor functions defects, especially in motor coordination as we can see in the horizontal beam test. They are associated with learning problems, as HI-treated mice have lower performances in both cue and probe sessions of the Morris water-maze test. The increased freezing time of hypoxic mice in this test suggests a potentiated stress behavior but the results obtained in the openfield and elevated plus maze tests do not reveal any anxiety in these mice. Thus, we can envisage that the synaptic connexions between the Purkinje cells and climbing and/or parallel fibers are altered, leading to functional deficits. Moreover, a previous study showed that perinatal intermittent hypoxia can lead to a decreased long-term potentiation, which can partially explain the learning defects (Goussakov et al., 2019). Finally, we cannot exclude an alteration of the white matter, as most of the models based on intermittent hypoxia exhibit myelination or oligodendrocyte modifications (Darnall, 2010; Cai et al., 2012; Juliano et al., 2015; Goussakov et al., 2019). Besides, we demonstrate with this study that the functional deficits are linked to the severity of hypoxia, as in children who suffered from apnea of prematurity (Janvier et al., 2004). Indeed, data from the literature reveal that mild intermittent hypoxia do not affect learning abilities (Goussakov et al., 2019), but protocols similar to the one we used induce long-term motor and cognitive alterations (Juliano et al., 2015).

To conclude, we have investigated the effects of an apnea of prematurity model on the cerebellar development in mice. Here we demonstrated that perinatal intermittent hypoxia induces modifications of cellular mechanisms such as oxidative stress, leading to a delay in the cerebellar cortex maturation. However, these alterations seem to be compensated by several mechanisms such as a reduced cell death, allowing the cerebellar cortex to achieve its structural development. Yet, short and long-term functional deficits affecting motor coordination or learning are observed after intermittent hypoxia. This suggests that apnea of prematurity can lead to structural and functional alterations within the cerebellum, that may be at the origin of the neurodevelopmental disorders observed.

References

Abu-Shaweesh JM, Martin RJ. 2008. Neonatal Apnea: What's New? Pediatr Pulmonol 43(10): 937–944. doi: 10.1002/ppul.20832

Biran V, Heine VM, Verney C, Sheldon RA, Spadafora R, Vexler ZS, Rowitch DH, Ferriero DM. 2011. Cerebellar abnormalities following hypoxia alone compared to hypoxic–ischemic forebrain injury in the developing rat brain. Neurobiology of Disease 41(1): 138–146. doi: 10.1016/j.nbd.2010.09.001

Biran V, Verney C, Ferriero DM. 2012. Perinatal Cerebellar Injury in Human and Animal Models. Neurology Research International 2012: 1–9. doi: 10.1155/2012/858929

Bouslama M, Adle-Biassette H, Ramanantsoa N, Bourgeois T, Bollen B, Brissaud O, Matrot B, Gressens P, Gallego J. 2015. Protective effects of intermittent hypoxia on brain and memory in a mouse model of apnea of prematurity. Front Physiol 6. doi: 10.3389/fphys.2015.00313

Cai J, Tuong CM, Gozal D. 2011. A neonatal mouse model of intermittent hypoxia associated with features of apnea in premature infants. Respiratory Physiology & Neurobiology 178(2): 210 217. doi: 10.1016/j.resp.2011.06.003

Cai J, Tuong CM, Zhang Y, Shields CB, Guo G, Fu H, Gozal D. 2012. Mouse intermittent hypoxia mimicking apnoea of prematurity: effects on myelinogenesis and axonal maturation. J Pathol 226(3): 495–508. doi: 10.1002/path.2980

Chiu S-C, Huang S-Y, Tsai Y-C, Chen S-P, Pang C-Y, Lien C-F, Lin Y-J, Yang K-T. 2012. Poly (ADP-ribose) polymerase plays an important role in intermittent hypoxia-induced cell death in rat cerebellar granule cells. J Biomed Sci 19(1): 29. doi: 10.1186/1423-0127-19-29

Darnall RA. 2010. The role of CO2 and central chemoreception in the control of breathing in the fetus and the neonate. Respiratory Physiology & Neurobiology 173(3): 201–212. doi: 10.1016/j.resp.2010.04.009

Eichenwald EC, Committee on Fetus and Newborn. 2016. Apnea of Prematurity. Pediatrics 137(1): e20153757. doi: 10.1542/peds.2015-3757

Farahani R, Kanaan A, Gavrialov O, Brunnert S, Douglas RM, Morcillo P, Haddad GG. 2008. Differential effects of chronic intermittent and chronic constant hypoxia on postnatal growth and development. Pediatr Pulmonol 43(1): 20–28. doi: 10.1002/ppul.20729

Goussakov I, Synowiec S, Yarnykh V, Drobyshevsky A. 2019. Immediate and delayed decrease of long term potentiation and memory deficits after neonatal intermittent hypoxia. International Journal of Developmental Neuroscience 74: 27–37. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.03.001

Guell X, Hoche F, Schmahmann JD. 2015. Metalinguistic deficits in patients with cerebellar dysfunction: empirical support for the dysmetria of thought theory. Cerebellum 14(1): 50–58. doi: 10.1007/s12311-014-0630-z

Huang J, Zhang L, Kang B, Zhu T, Li Y, Zhao F, Qu Y, Mu D. 2017. Association between perinatal hypoxic-ischemia and periventricular leukomalacia in preterm infants: A systematic review and meta-analysis. Luo Z-C, editor. PLoS ONE 12(9): e0184993. doi: 10.1371/journal.pone.0184993

Janvier A, Khairy M, Kokkotis A, Cormier C, Messmer D, Barrington KJ. 2004. Apnea Is Associated with Neurodevelopmental Impairment in Very Low Birth Weight Infants. J Perinatol 24(12): 763–768. doi: 10.1038/sj.jp.7211182

Juliano C, Sosunov S, Niatsetskaya Z, Isler JA, Utkina-Sosunova I, Jang I, Ratner V, Ten V. 2015. Mild intermittent hypoxemia in neonatal mice causes permanent neurofunctional deficit and white matter hypomyelination. Experimental Neurology 264: 33–42. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.11.010

Kakita H, Hussein MH, Yamada Y, Henmi H, Kato S, Kobayashi S, Ito T, Kato I, Fukuda S, Suzuki S, et al. 2009. High postnatal oxidative stress in neonatal cystic periventricular leukomalacia. Brain and Development 31(9): 641–648. doi: 10.1016/j.braindev.2008.10.008

Lavond DG. 2002. Role of the Nuclei in Eyeblink Conditioning. Annals NY Acad Sci 978(1 THE CEREBELLU): 93–105. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb07558.x

Oorschot DE, Voss L, Covey MV, Goddard L, Huang W, Birchall P, Bilkey DK, Kohe SE. 2013. Spectrum of Short- and Long-Term Brain Pathology and Long-Term Behavioral Deficits in Male Repeated Hypoxic Rats Closely Resembling Human Extreme Prematurity. Journal of Neuroscience 33(29): 11863–11877. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0342-12.2013

Petrosini L. 1998. The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? Progress in Neurobiology 56(2): 191–210. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00036-7

Pillekamp F, Hermann C, Keller T, von Gontard A, Kribs A, Roth B. 2007. Factors Influencing Apnea and Bradycardia of Prematurity – Implications for Neurodevelopment. Neonatology 91(3): 155–161. doi: 10.1159/000097446

Rahimi-Balaei M, Bergen H, Kong J, Marzban H. 2018. Neuronal Migration During Development of the Cerebellum. Front Cell Neurosci 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00484

Scherz-Shouval R, Elazar Z. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. Trends in Cell Biology 17(9): 422–427. doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.009

Srinivasan L, Allsop J, Counsell SJ, Boardman JP, Edwards AD, Rutherford M. 2006. Smaller Cerebellar Volumes in Very Preterm Infants at Term-Equivalent Age are Associated with the Presence of Supratentorial Lesions. American Journal of Neuroradiology 27(3): 573–579.

Steggerda SJ, Leijser LM, Wiggers-de Bruïne FT, van der Grond J, Walther FJ, van Wezel-Meijler G. 2009. Cerebellar Injury in Preterm Infants: Incidence and Findings on US and MR Images. Radiology 252(1): 190–199. doi: 10.1148/radiol.2521081525

Volpe JJ. 2009. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. J Child Neurol 24(9): 1085–1104. doi: 10.1177/0883073809338067

Zhao J, Gonzalez F, Mu D. 2011. Apnea of prematurity: from cause to treatment. Eur J Pediatr 170(9): 1097–1105. doi: 10.1007/s00431-011-1409-6

Primary antibody	Marker	Dilution	Species	Provider	Secondary antibody
BrdU	Migrating/Proliferating cell	1:400	Sheep	Abcam (#ab1893)	DAS-633
Calbindin	Purkinje cell	1:1000	Mouse	Sigma-Aldrich (#C9848)	DAM-594
Cleaved-caspase-3	Apoptotic cell	1:400	Rabbit	Cell Signaling Technology (#9661S)	DAR-488
GFAP	Astrocyte (Bergmann glia)	1:600	Rabbit	Dako (#Z0334)	DAR-488

Table 1. Summary table of immunohistochemical markers used in this study.
BrdU : bromodeoxyuridine ; GFAP : glial fibrillary acidic protein ; DAM : donkey anti-mouse ; DAR : donkey anti-rabbit ; DAS : donkey anti-sheep.

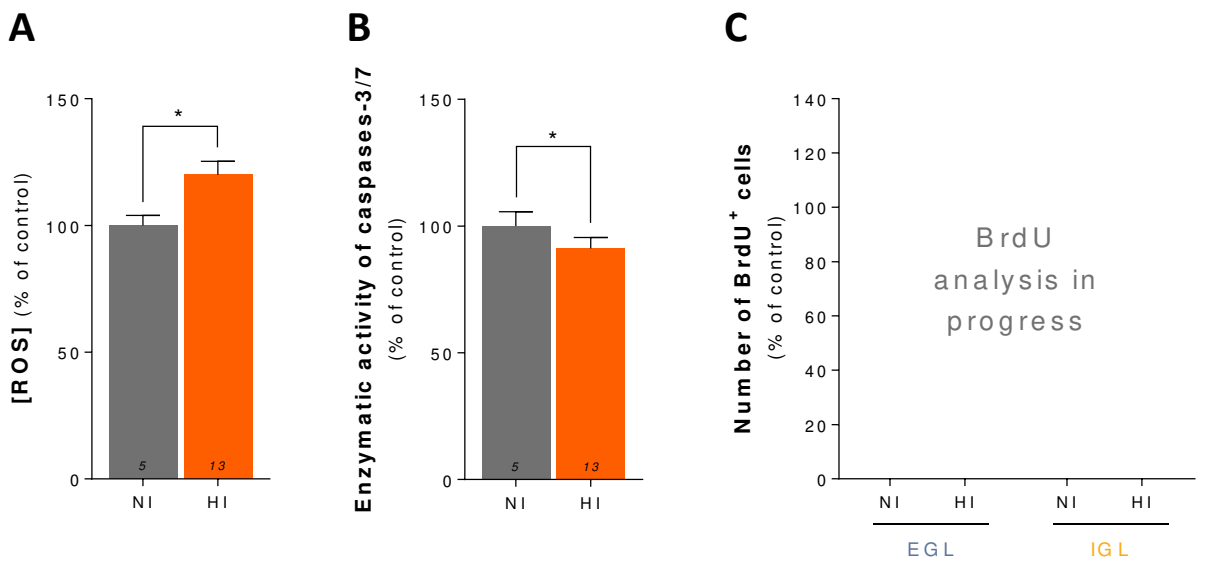


Fig 1. Effects of perinatal intermittent hypoxia on cellular mechanisms in mice.

A-C. Quantification of ROS production **(A)** enzymatic activity of caspases-3/7 **(B)** and BrdU-positive cells **(C)** in control (NI) or hypoxic (HI) mice aged of 12 days (P12). The total number of animals in each experimental group is indicated in the histogram bars. * $P < 0.05$.

BrdU: bromodeoxyuridine; EGL: external granular layer; IGL: internal granular layer; ROS: reactive oxygen species.

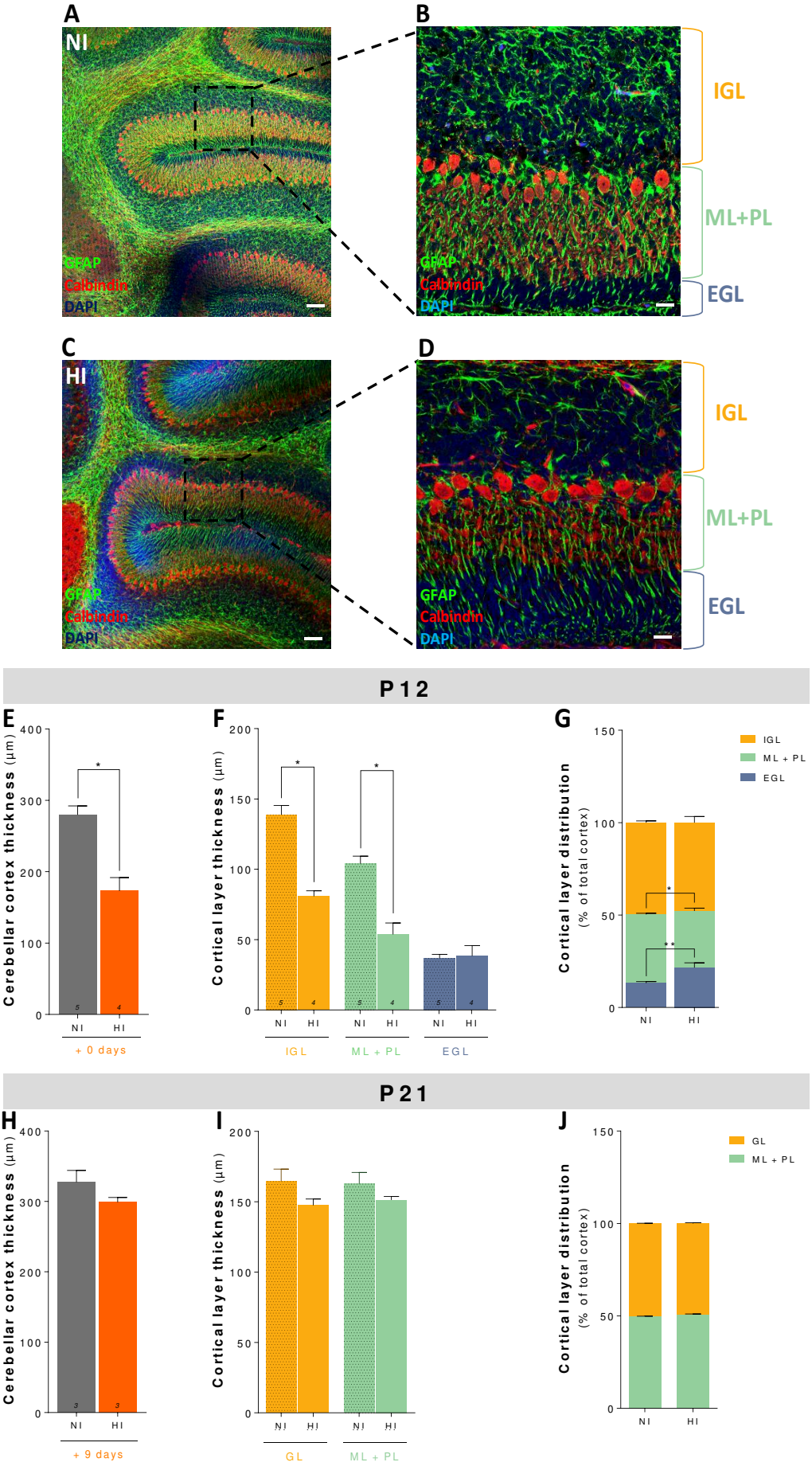

A
NI
GFAP
Calbindin
DAPI
B
IGL
ML+PL
EGL
C
HI
D
P 12
E
Cerebellar cortex thickness (µm)
+ 0 days
F
Cortical layer thickness (µm)
IGL
ML + PL
EGL
G
Cortical layer distribution (% of total cortex)
P 21
H
+ 9 days
I
GL
J

Fig 2. Effects of perinatal intermittent hypoxia on cerebellar organization in mice.
A-D. Illustration of the cerebellar cortex of control (NI; **(A, B)**) or hypoxic (HI; **(C, D)**) mice aged of 12 days (P12) showing Purkinje cell and Bergmann glia, respectively labelled by antibodies against calbindin (red) and GFAP (green).
E-G. The thickness of the cerebellar cortex **(E)** and each cerebellar layer **(F)** were measured at the end of the protocol in control (NI) or hypoxic (HI) mice aged of 12 days (P12). **(G)** The relative proportion of each layer in respect with the general size of the cerebellum were measured at the end of the protocol in control (NI) or hypoxic (HI) mice aged of 12 days (P12).
H-J. The thickness of the cerebellar cortex **(H)** and each cerebellar layer **(I)** were nine days after the protocol in control (NI) or hypoxic (HI) mice aged of 12 days (P12). **(J)** The relative proportion of each layer in respect with the general size of the cerebellum were measured nine days after the protocol in control (NI) or hypoxic (HI) mice aged of 12 days (P12).
The total number of animals in each experimental group is indicated in the histogram bars. Scale bar (A, C) = 75 µm; Scale bar (B, D) = 20 µm; * $P < 0.05$. EGL: external granular layer; IGL: internal granular layer; ML: molecular layer; PL: Purkinje cell layer.

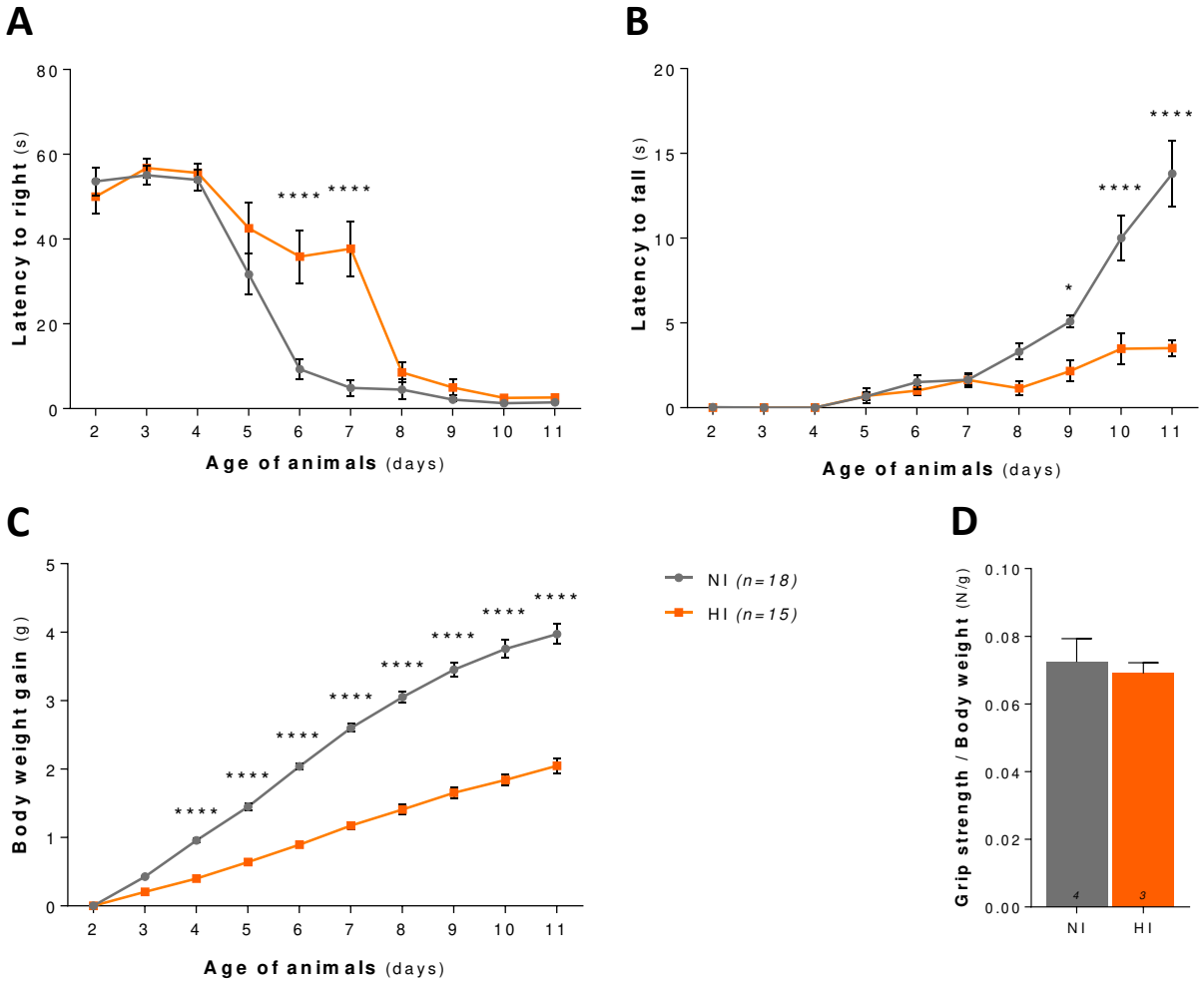
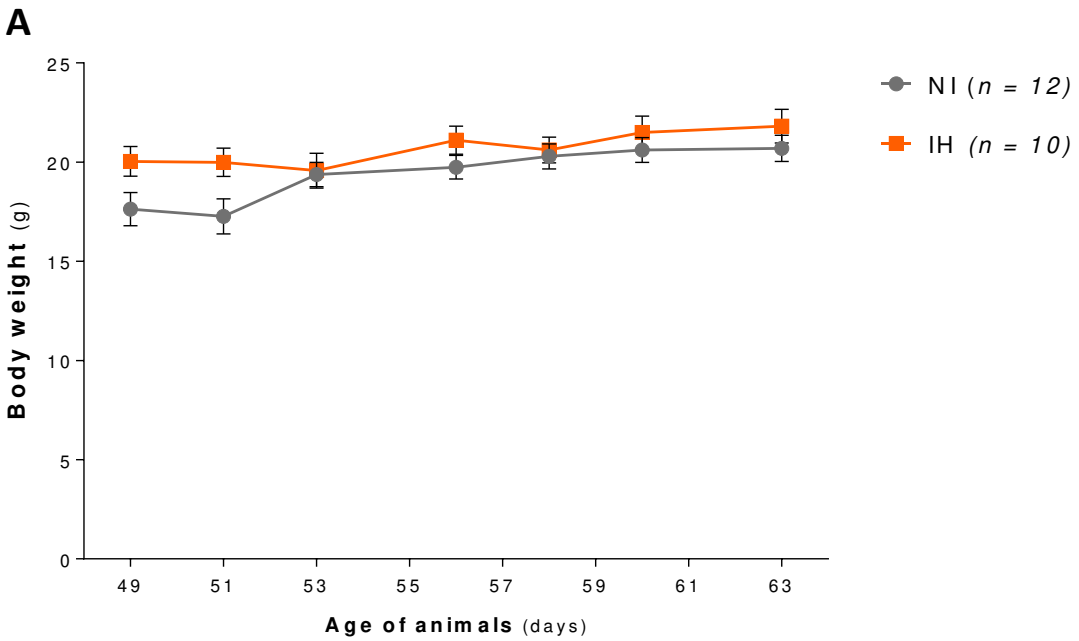
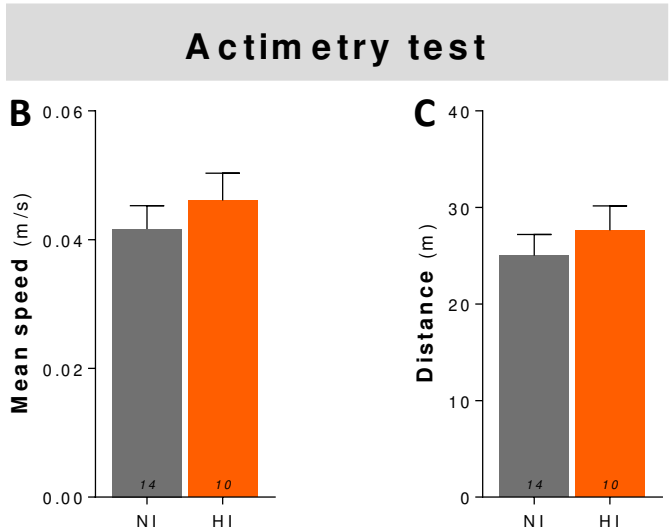


Fig 3. Effects of perinatal intermittent hypoxia on weight and behavioral development in mice.
A-C. Measurement of the righting **(A)** and grasping **(B)** reflexes, and of the weight gain **(C)** in control (NI; grey line) and hypoxic (HI; orange line) mice during the first two postnatal weeks. **D.** Measurement of the muscular strength relative to body weight of control (NI) and hypoxic (HI) mice aged of 21 days (P21). The number of animals used in each experimental group is indicated in the legend (A-C) or in the histogram bars (D). * $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$.


A
Body weight (g)
25
20
15
10
5
0
49
51
53
55
57
59
61
63
Age of animals (days)
NI (n = 12)
IH (n = 10)


Actimetry test
B
Mean speed (m/s)
0.06
0.04
0.02
0.00
14
10
NI
HI
C
Distance (m)
40
30
20
10
0
14
10
NI
HI

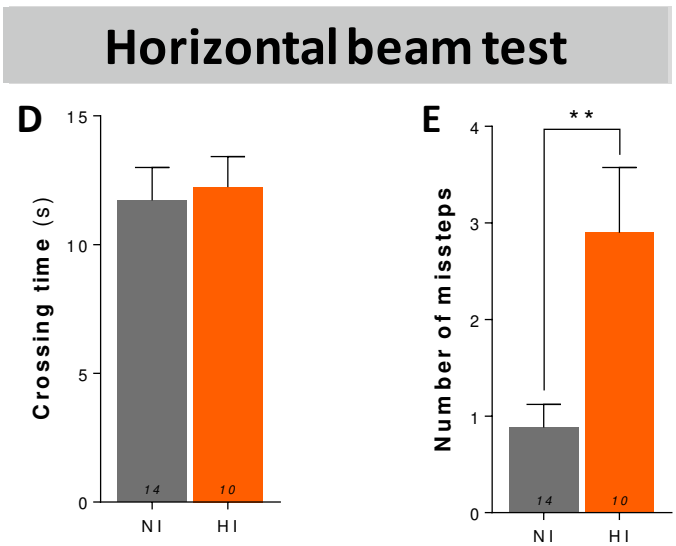

Horizontal beam test
D
Crossing time (s)
15
10
5
0
14
10
NI
HI
E
Number of missteps
4
3
2
1
0
**
14
10
NI
HI

Fig 4. Long-term effects of perinatal intermittent hypoxia on motor activity and coordination in adult mice. A. Measurement of the body weight in control (NI; grey line) and in hypoxic (HI; orange line) mice between P49 and P51. **B-C.** Measurement of the mean speed **(B)** and the distance travelled **(C)** in P63 control (NI) and hypoxic (HI) mice in the actimetry test. **D-E.** Measurement of the crossing time **(D)** and the number of missteps **(E)** in P53 control (NI) and hypoxic (HI) mice in the horizontal beam test. The number of animals used in each experimental group is indicated in the legend (A) or in the histogram bars (B-C). ** $P < 0.01$.

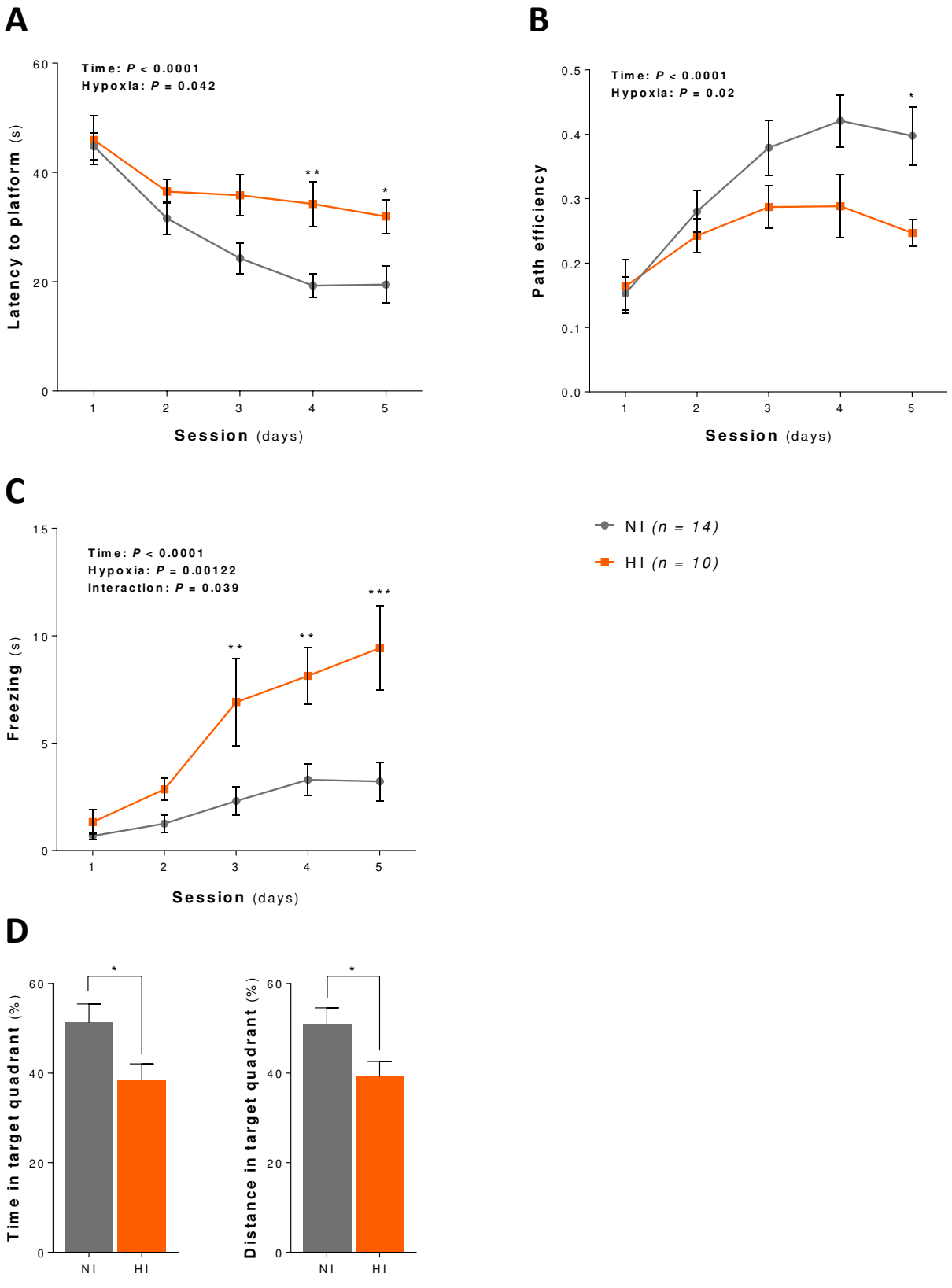

A
Time: P < 0.0001
Hypoxia: P = 0.042
Latency to platform (s)
Session (days)
B
Time: P < 0.0001
Hypoxia: P = 0.02
Path efficiency
Session (days)
C
Time: P < 0.0001
Hypoxia: P = 0.00122
Interaction: P = 0.039
Freezing (s)
Session (days)
NI (n = 14)
HI (n = 10)
D
Time in target quadrant (%)
Distance in target quadrant (%)
NI
HI

Fig 5. Long-term effects of perinatal intermittent hypoxia on spatial learning in mice.
A-C. Measurement of the latency to find the platform **(A)**, of the path efficiency **(B)** and of the freezing time **(C)** during the cue sessions of the Morris water-maze test performed in control (NI; grey line) and hypoxic (HI; orange line) mice between P56 and P60. **D.** Measurement of the time spent and distance travelled in the target quadrant during the probe session of the Morris water-maze test, performed in control (NI) and hypoxic (HI) mice aged of P60. The number of animals used in each experimental group is indicated in the legend (A-C) or in the histogram bars (D, E). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

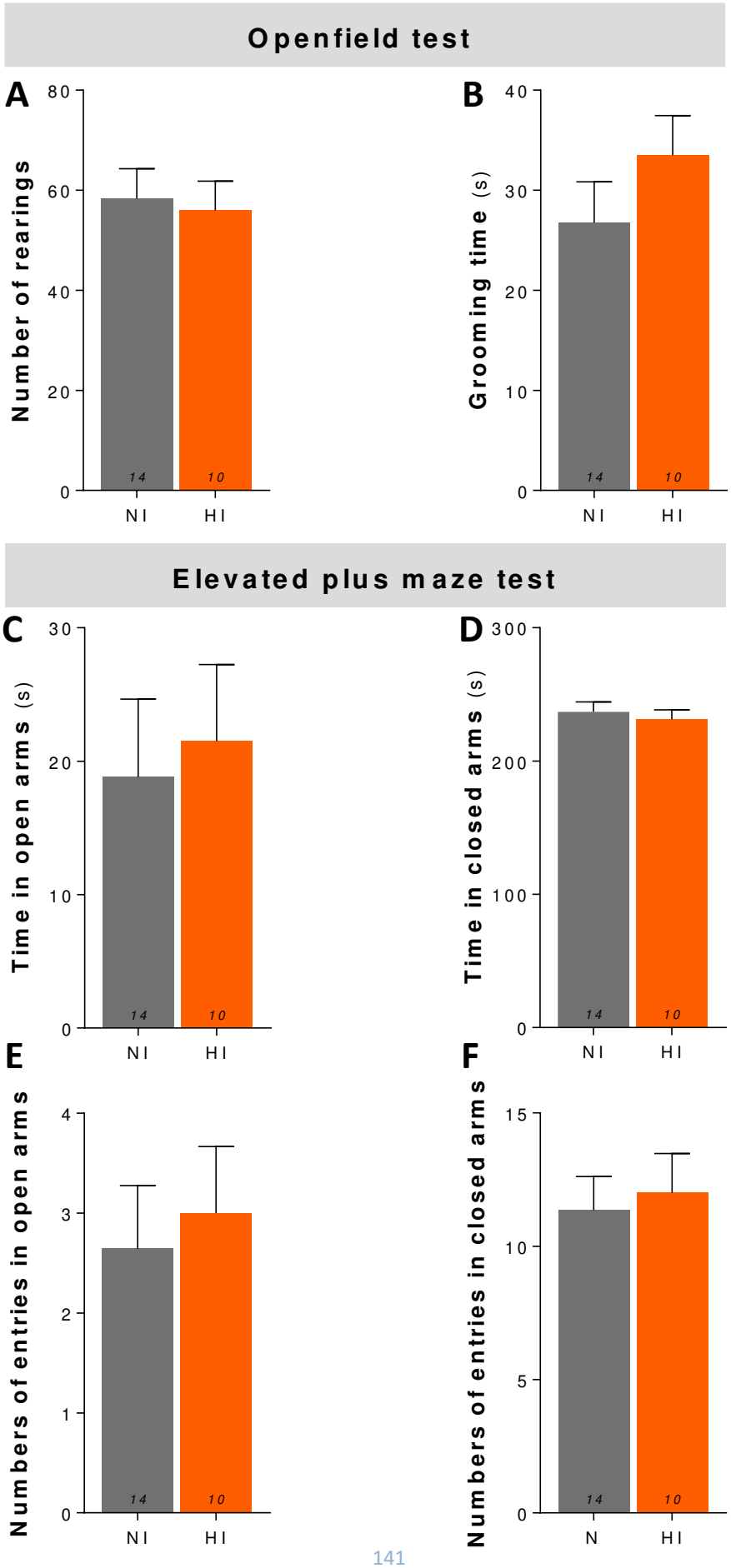

Openfield test
A
Number of rearings
80
60
40
20
0
14
10
NI
HI
B
Grooming time (s)
40
30
20
10
0
14
10
NI
HI
Elevated plus maze test
C
Time in open arms (s)
30
20
10
0
14
10
NI
HI
D
Time in closed arms (s)
300
200
100
0
14
10
NI
HI
E
Numbers of entries in open arms
4
3
2
1
0
14
10
NI
HI
F
Numbers of entries in closed arms
15
10
5
0
14
10
N
HI

Fig 6. Long-term effects of perinatal intermittent hypoxia on anxiety.

A-B. Measurement of the number of rearings **(A)** and of the time spent grooming **(B)** during the openfield test performed in control (NI) and hypoxic (HI) mice aged of P63. **C-D.** Measurement of the time in open **(C)** and closed **(D)** arms during the elevated plus-maze test performed in control (NI) and hypoxic (HI) mice aged of P64. **E-F.** Measurement of the number of in open **(E)** and closed **(F)** arms during the elevated plus-maze test performed in control (NI) and hypoxic (HI) mice aged of P64.The number of animals used in each experimental group is indicated in the histogram bars.

PARTIE III – CARACTERISATION DE SONDES FLUORESCENTES POUR L'ETUDE DE L'HYPOXIE *IN VIVO* EN TEMPS REEL

1. CARACTERISATION SPECTRALE DES DIFFERENTES SONDES

Afin de pouvoir étudier l'hypoxie en temps réel chez l'animal, différentes sondes dérivées de la SR101 ont été développées par l'équipe du Pr. Renard de l'UMR 6010 CNRS COBRA. Ces composés, normalement non fluorescents, sont clivés en condition hypoxique et émettent alors de la fluorescence. Les molécules clivées, et par conséquent visibles, nous ont été fournies en vue d'une utilisation en microscopie biphotonique (Figure 47). La caractérisation spectrale des différentes sondes a ainsi été réalisée conjointement à celle de la SR101 en tant que contrôle positif.

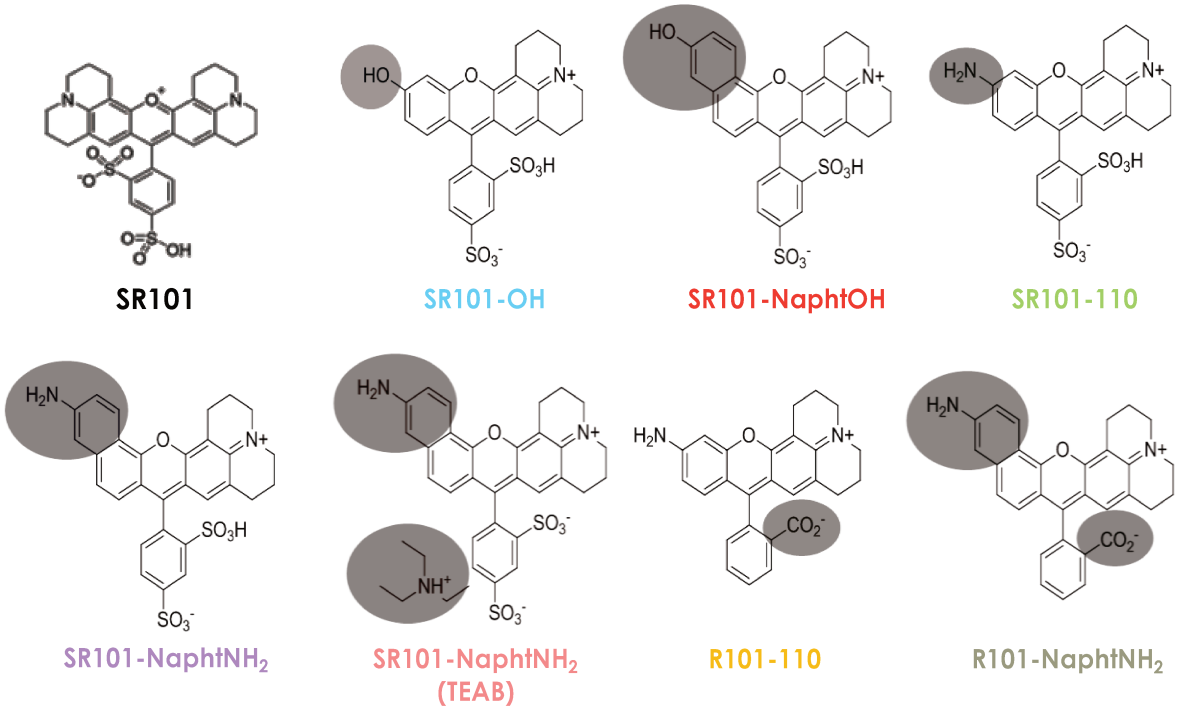


Figure 47 ◆ Structure de la sulforhodamine-101 et de ses dérivés clivés fluorescents. SR101 : sulforhodamine-101.

Nous avons tout d'abord déterminé les profils d'excitation des différentes molécules dans le domaine de l'infrarouge. Les trois différents pics d'excitation connus sont retrouvés pour la SR101 aux longueurs d'onde de 750, 815 et 930 nm (Figure 48). Concernant les sondes à caractériser, la R101-110 n'émet pas de fluorescence significative quelle que soit la longueur d'onde d'excitation alors que toutes les autres présentent au moins deux pics d'excitations aux mêmes longueurs d'onde que la SR101. De même, l'excitation est plus importante à 815 nm pour l'ensemble des sondes avec une intensité plus importante pour la SR101-OH et la SR101-110. La longueur d'onde retenue pour les prochaines expérimentations est donc 815 nm.

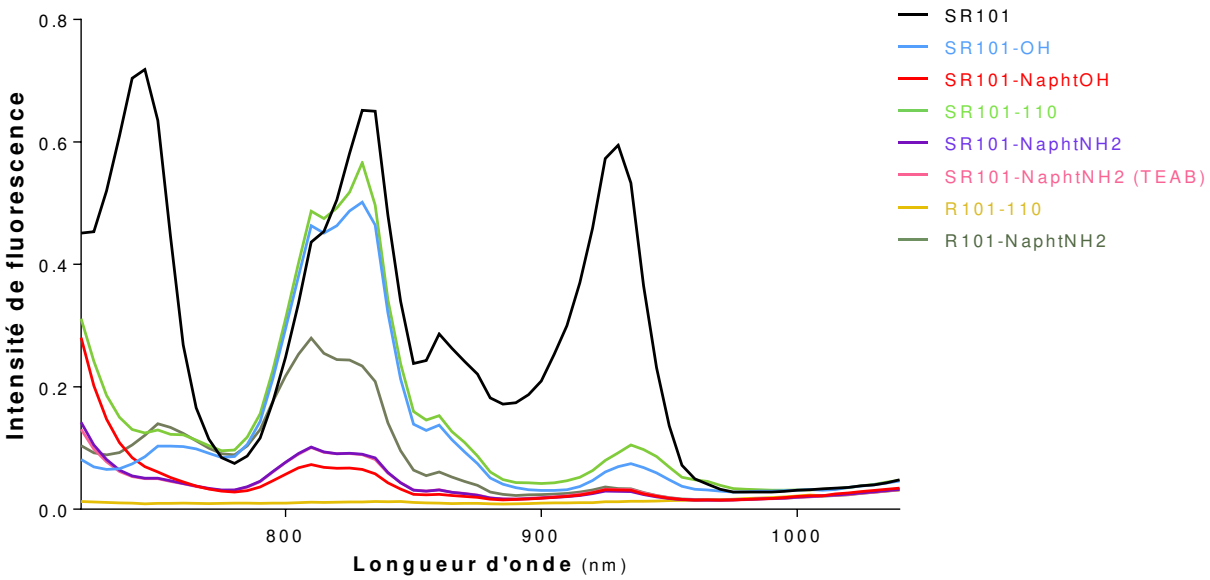


Figure 48 ◆ Profils d'excitation de la SR101 et de ses dérivés dans le domaine de l'infrarouge entre 720 et 1040 nm. SR101 : sulforhodamine-101.

Les profils d'émission des différentes molécules ont ensuite été réalisés au microscope biphotonique à 815 nm. La SR101 émet à la longueur d'onde de 600 nm (Figure 49). Concernant les sondes dérivées, nos résultats indiquent qu'elles sont divisées en deux groupes : la SR101-OH, la SR101-110 et la R101-110 présentent un déplacement hypsochrome avec un pic d'émission décalé à 570 nm (Figure 49) alors que la SR101-NaphtOH, la SR101-NaphtNH$_2$, la SR101-NaphtNH$_2$ (TEAB) et la R101-NaphtNH$_2$ émettent à la longueur d'onde de 620 nm et montrent de ce fait un déplacement bathochrome (Figure 49).

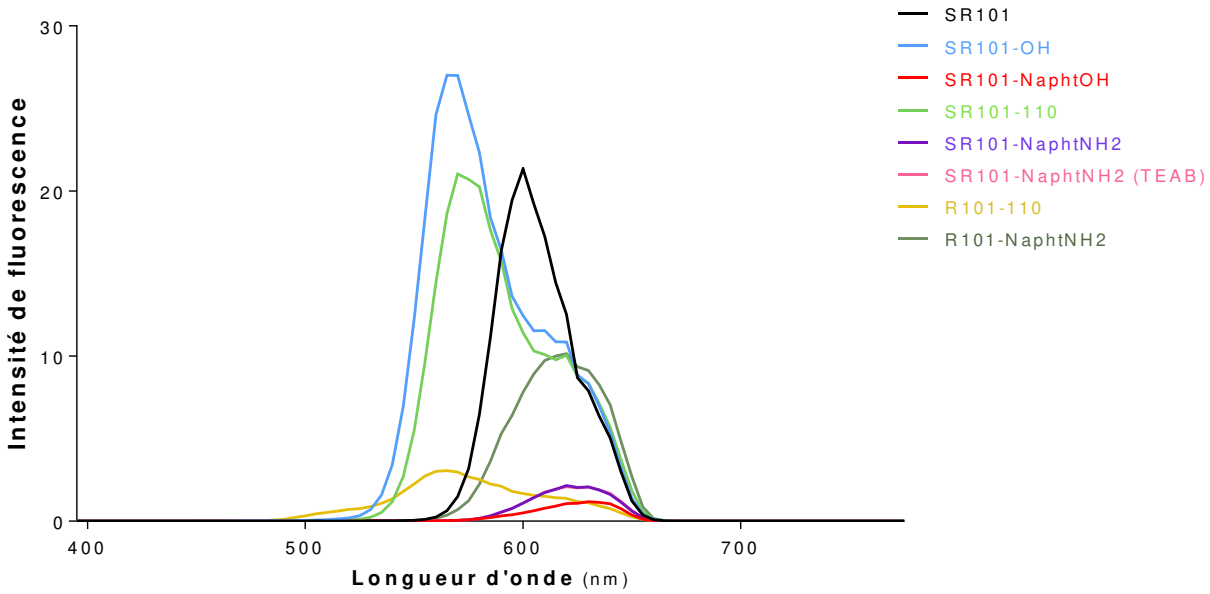


Figure 49 ◆ Profils d'émission de la SR101 et de ses dérivés dans le domaine du visible à une longueur d'excitation de 815 nm. SR101 : sulforhodamine-101.

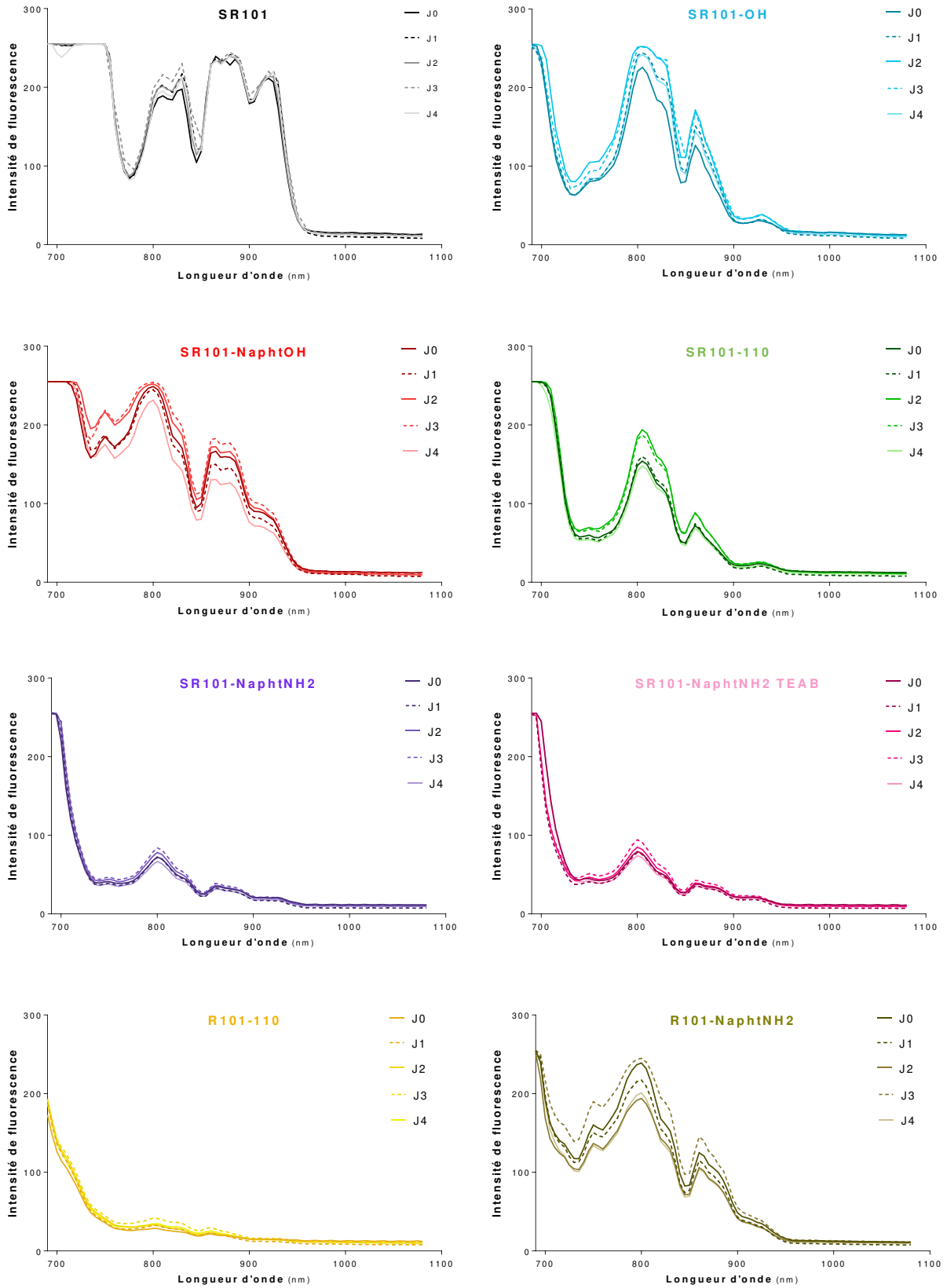


Figure 50 ◆ Etude de dégradation de la SR101 et de ses dérivés au cours du temps.
SR101 : sulforhodamine-101.

Enfin nous avons évalué la dégradation des sondes au cours du temps. En effet, leur utilisation *in vivo* implique qu'elles restent stables au cours du temps pour pouvoir corréler l'intensité de la fluorescence avec la sévérité de l'hypoxie. Ainsi, les spectres d'excitation des sondes ont été réalisés sur 5 jours consécutifs (Figure 50). Pour l'ensemble des différents composés, nos résultats démontrent de faibles variations d'intensité de fluorescence mais qui ne sont pas dépendantes du temps (Figure 50).

2. IMAGERIE INTRAVITALE DU CORTEX CEREBELLEUX EN DEVELOPPEMENT

L'imagerie biphotonique *in vivo* du cervelet chez le souriceau nécessite une mise au point du protocole d'anesthésie. Plusieurs agents anesthésiques ont ainsi été utilisés afin de tester leur performance dans notre protocole. Cependant, l'uréthane, la kétamine, la xylazine et l'isoflurane employés seuls ou mixés se sont révélés inefficaces (réveil des souris, réflexe de la patte toujours présent) ou létaux. L'anesthésie de souriceaux âgés de 10 jours a donc été induite grâce à une injection intrapéritonéale de valium (1 µL/mg de poids corporel, 10 mg/2 mL) associé à de l'isoflurane gazeux (5%). Durant la chirurgie, l'anesthésie a été maintenue grâce à de l'isoflurane gazeux (entre 1,5 et 3%).

A la suite de l'optimisation de cette méthode d'anesthésie, une fenêtre crânienne a été réalisée au niveau du cervelet de souris, permettant ainsi son observation en microscopie biphotonique et un test avec la SR101 a permis de valider le protocole. La difficulté de la mise au point de la fenêtre crânienne est de deux ordres : la taille de la tête des souriceaux est très contraignante, et le ciment dentaire ou la colle adhère mal à l'os du crâne encore mou et difficile à sécher. Sur des souriceaux âgés de 21 jours, puis 10 jours, nous avons pu observer *in vivo* le cortex cérébelleux (Figure 51). Ces images ont été prises au sein d'un lobule cérébelleux à une profondeur d'environ 150 µm. La SR101 est visible dans les cellules astrocytaires incluant les cellules gliales de Bergmann. Par contraste, les cellules de Purkinje et les neurones de la CM et la CGI sont identifiables. Il est ainsi possible de délimiter les différentes couches corticales.

En conclusion, cette étude nous a permis d'étudier différents composés issus de sondes sensibles à l'hypoxie et de les caractériser en microscopie biphotonique. Leurs profils d'excitation et d'émission, de même que les données relatives à leur stabilité nous permettront de sélectionner les meilleurs candidats en vue d'une utilisation *in vivo*. Dans cette optique, une optimisation du protocole de chirurgie et d'imagerie cérébelleuse du souriceau a été réalisée et nous permettra d'utiliser ces sondes dans un modèle d'hypoxie périnatale afin d'en approfondir l'étude.

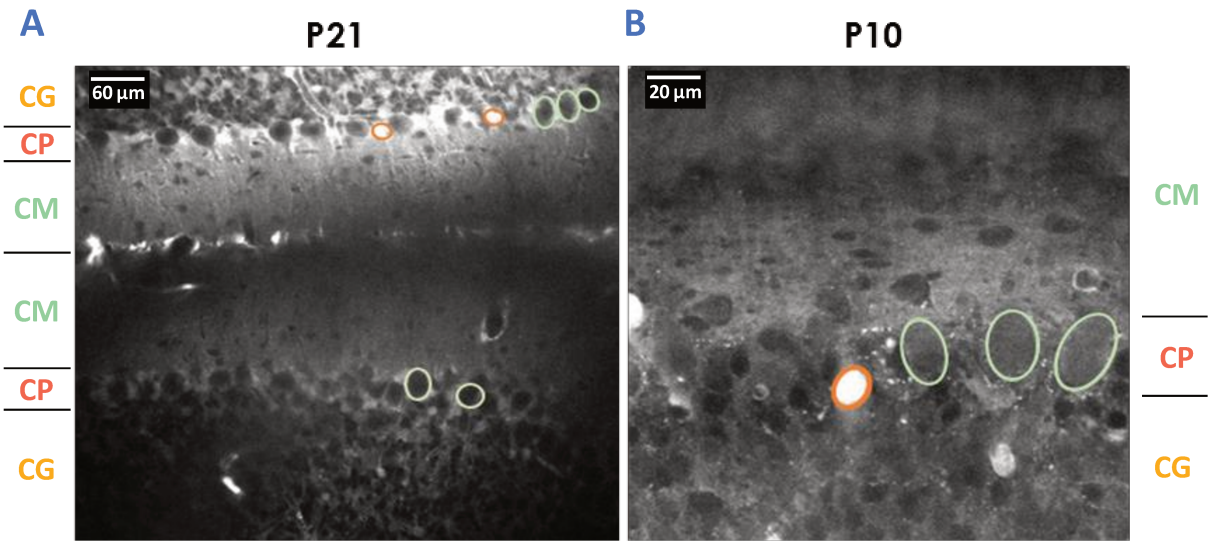


Figure 51 ◆ Représentation du cortex cérébelleux de souris observé en temps réel en microscopie biphotonique. Le cervelet de souris âgées de 21 (P21 ; **(A)**) et 10 (P12 ; **(B)**) jours est observé grâce à l'utilisation de la SR101, permettant de marquer les neurones qui apparaissent en noir tels que les cellules de Purkinje (rond vert) et les astrocytes qui apparaissent en blanc (rond orange).CG : couche granulaire ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje ; SR101 : sulforhodamine-101.

DISCUSSION

PARTIE I – EFFETS DIFFERENTIELS DE DIFFERENTES HYPOXIES PERINATALES SUR LE DEVELOPPEMENT DU CERVELET

L'hypoxie périnatale est définie comme une carence en dioxygène survenant entre les semaines précédant la naissance et les premiers jours de vie postnatale. Au niveau cellulaire, cette pathologie est à l'origine de différents phénomènes, tels qu'un stress oxydatif, une mort neuronale ou des modifications transcriptionnelles qui peuvent altérer la région touchée. Plusieurs études se sont ainsi intéressées à l'impact de l'HP, qu'elle soit continue ou intermittente, sur des organes tels que le cerveau mais d'autres structures ont été ignorées. C'est le cas du cervelet qui, du fait de sa localisation à l'arrière du cerveau, est très difficile à observer avec les techniques d'imagerie médicale actuelles. Cette structure apparaît pourtant comme une cible privilégiée de l'HP car son développement est incomplet à la naissance, le rendant très vulnérable aux incidents périnataux. Une atrophie cérébelleuse est aussi souvent observée chez les enfants prématurés (Allin et al., 2001a) ou dans le cas d'encéphalopathies hypoxiques-ischémiques chez le nourrisson (Strange et al., 2004; Connolly et al., 2007). Par ailleurs, une majorité des troubles observés chez les enfants ayant subi une HP, dont des déficits moteurs ou d'apprentissage, corrèle avec des fonctions cérébelleuses (Janvier et al., 2004; Pillekamp et al., 2007). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une HP peut altérer les étapes cruciales de la maturation du cervelet et être à l'origine de plusieurs déficits observés chez l'Homme. Pour ce faire, nous avons développé une chambre d'hypoxie permettant de réaliser différents types d'HP correspondant à des pathologies différentes. Ainsi, notre protocole d'HC correspond à un retard de respiration à la naissance ou un enroulement du cordon ombilical, et notre modèle d'HI permet de mimer des ADP.

1. DEVELOPPEMENT DE LA CHAMBRE D'HYPOXIE

Dans cette étude, nous avons donc cherché à étudier les effets d'une HC longue (40 minutes ; 5 % d'O_2) et d'une HI basée sur des cycles de 2 minutes, permettant de mimer l'ADP (Cai et al., 2011). Or, aucune chambre d'hypoxie commerciale ne permet d'effectuer ces 2 protocoles dans les mêmes conditions. En effet, les volumes des enceintes disponibles sur le marché ne sont pas compatibles avec des phases de transition entre l'hypoxie et la normoxie d'environ 30 secondes. De ce fait, une chambre d'hypoxie a été conçue au sein de l'Université de Rouen, en suivant un cahier des charges strict afin de respecter les protocoles d'HP. Les premières expérimentations réalisées avec ce dispositif nous ont permis d'ajuster les débits et les pressions des différents gaz, afin d'effectuer les différents cycles tout en conservant une température et une pression atmosphérique stables. Seul le paramètre d'hygrométrie varie au cours des cycles d'HI du fait de la diffusion régulière d'azote sec au

sein de la chambre. Afin de limiter cette variation, la longueur des tuyaux de PVC raccordés aux débitmètres a été rallongée, permettant au gaz de s'humidifier progressivement au contact de l'air ambiant. Ce circuit associé aux silencieux aide également à atténuer le bruit de l'injection gazeuse dans l'enceinte, à l'exception des sons émis par les électrovannes. Cependant, même si ce bruit sec reste élevé, il n'impacte le protocole que dans une moindre mesure car le système auditif des souriceaux n'est complètement mature qu'à P10 (Cai et al., 2011). L'absence de réactions des animaux au déclenchement des électrovannes confirme par ailleurs la faible influence de ce paramètre.

Une fois la validation technique effectuée, l'impact des protocoles d'hypoxie a été étudié sur le comportement social des animaux. Les premières observations ont révélé que les conditions environnementales n'entrainent pas de stress visible chez les animaux. A titre d'exemple, nous avons pu constater que les bruits émis par les électrovannes n'entrainaient pas de modification comportementale chez les animaux. Par ailleurs, les effets immédiats de l'hypoxie semblent être différents selon sa forme : en HC, les animaux ont tendance à s'endormir rapidement (en environ une minute) contrairement à l'HI. Cette dernière n'influe pas non plus sur le comportement de la mère, qui reste avec les petits pendant toute la durée des cycles. De même, l'HC comme l'HI n'induisent qu'un très faible taux de mortalité au cours du développement. En revanche, les animaux à P21 sont plus sensibles aux HC et montrent un nombre de décès plus important. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Scremin et al. (1980), qui montre que la survie en condition hypoxique est dépendante de l'âge, avec des souriceaux P1 survivant plus longtemps à une hypoxie de 5% d'oxygène que des souris P50.

Par ailleurs, si l'HI induit un retard de croissance pendant le développement, l'incidence de l'hypoxie sur la masse corporelle des animaux semble dépendre du protocole. En effet, les travaux de Cai et al. (2011) ne révèlent pas de modification significative du poids des animaux à P10 après 8 jours d'HI à 5.7 ou 8% d'O_2, alors que des hypoxies continues ou intermittentes à 11% d'O_2 induisent une diminution de celui-ci à P9 (Farahani et al., 2008). Cette disparité pourrait s'expliquer par la sensibilité de la mère face au stress de l'hypoxie qui délaisserait alors ses petits. Cependant, Farahani et al. (2008) ont démontré que la présence ou non de la mère pendant le protocole d'HI, ainsi que la taille de la portée n'avait aucune incidence sur la prise de poids des petits. Dans notre cas, aucun comportement de rejet n'a été observé par la mère lors des expériences, la mère n'a pas perdu ou pris de poids pendant la durée du protocole (données non présentées) et nous nous sommes attachés à répartir de façon équivalente les souriceaux entre les groupes NI et HI. Malgré cela, la différence de masse corporelle apparaît dès P4 en faveur d'un impact direct de l'HI sur la croissance

générale des souriceaux. A l'inverse, la masse corporelle des animaux HC n'est pas altérée sur le long-terme, suggérant qu'une hypoxie aiguë n'est pas suffisante pour entraîner des modifications corporelles profondes. Cependant, nous avons tout de même vérifié si elle n'affecte pas la composante cellulaire du cervelet.

2. EFFETS D'UNE HYPOXIE PERINATALE AIGUË SUR LE DEVELOPPEMENT

L'un des indices démontrant la sensibilité d'un organe à l'hypoxie est le stress oxydatif, représenté entre autres par une augmentation de la quantité de ROS. L'analyse de ce taux indique que seuls les animaux P6 et P12 présentent une concentration de radicaux oxygénés augmentée à T0. Ce résultat peut s'avérer surprenant, car les neurones matures nécessitent des apports en O_2 conséquents et semblent de ce fait plus sensibles à l'hypoxie. Cependant, il peut s'expliquer par une différence dans les taux physiologiques basaux de ROS au cours du développement. En effet, Coyoy et al. (2013) ont démontré un pic d'expression de ROS dans le cervelet à P4, diminuant par la suite progressivement jusqu'à P16. Cette période correspond à la seconde phase de prolifération et de migration des cellules en grain, suggérant une implication physiologique des ROS dans ces mécanismes cellulaires. L'expression de ROS serait ainsi augmentée afin de permettre une prolifération maximale des précurseurs des cellules en grain (Yoneyama et al., 2010). De plus, un autre pic d'expression des ROS est observé dans le cortex cérébelleux à P25, âge auquel les cellules en grain sont matures et représentent la plus importante population neuronale du cervelet. Or, il a été prouvé que l'expression des ROS est augmentée au sein des neurones différenciés (Tsatmali et al., 2006), mais cette potentialisation est cependant associée à la mise en place d'un système oxydant mature (Bhanja and Chainy, 2010). Ces variations dans les taux physiologiques de ROS pourraient expliquer les différences de sensibilité en fonction du stade de développement : chez les animaux plus âgés, les effets de l'HC pourraient être atténués par une production de ROS déjà élevée et les enzymes antioxydantes en place ; alors que chez les souriceaux, où la concentration basale de ROS diminue rapidement après P4 et le système antioxydant est non mature, l'impact de l'HC devient significatif.

Cependant, il semble que le stress oxydatif ne soit pas le seul acteur délétère de l'HC. En effet, nous avons observé un taux de mortalité accru à P21 en l'absence d'augmentation de ROS. De plus, nos résultats indiquent que l'activité et le nombre de cellules en apoptose augmentent 24 heures après l'hypoxie à P6, P12, mais aussi à P21. Le délai d'induction de l'apoptose est en accord avec la littérature (Whiteside et al., 1998; Sun et al., 2016). De même, plusieurs études démontrent qu'une faible augmentation de ROS est suffisante pour provoquer l'apoptose (Scherz-

Shouval and Elazar, 2007; Coyoy et al., 2013). En revanche, l'augmentation de l'activité des caspases-3/7 observée à P21 indique que l'HC peut entraîner la mort apoptotique par un mécanisme différent du stress oxydatif.

De plus, l'analyse de la localisation des cellules apoptotiques au sein des différentes régions du cervelet à P12 révèle que les couches cérébelleuses les plus affectées par l'HC sont la CM, la CP et la CGI. Ces résultats confirment l'hypothèse que les neurones matures seraient particulièrement sensibles au manque d'oxygène, alors que la CGE dans laquelle se concentrent les précurseurs des cellules en grain serait plus épargnée. Par ailleurs, la substance blanche ne présente pas non plus d'augmentation significative de la densité des cellules apoptotiques, alors que des études montrent l'altération de la myélinisation après hypoxie (Biran et al., 2011). Ceci peut être lié au stade choisi pour l'analyse immunohistochimique. En effet, il est admis que le 12ème jour postnatal chez la Souris correspond aux premiers jours après la naissance chez l'Homme. Or, plusieurs observations cliniques indiquent que les incidents périnataux touchent préférentiellement la substance blanche chez les prématurés alors qu'ils affectent majoritairement la substance grise chez les nouveau-nés à terme.

Par ailleurs, l'apoptose induite par l'HC ne semble pas perturber significativement la mise en place du cortex cérébelleux. En effet, 6 et 15 jours après une hypoxie réalisée à P6, aucun changement de l'organisation du cortex cérébelleux, dans l''épaisseur des couches ou dans l'agencement des cellules de Purkinje, n'a été constaté. Ces résultats sont en contradiction avec certaines données de la littérature telles que l'étude Biran et al. (2011). Cependant, le protocole d'hypoxie utilisé par cette équipe était particulièrement sévère (2,5 heures ; 5,5% d'O_2) et a ainsi induit une réduction globale du volume cérébelleux et de l'épaisseur des couches corticale, associée à une diminution drastique du nombre de cellules de Purkinje. Cette disparité témoigne de la corrélation entre la sévérité de l'hypoxie et les conséquences histopathologiques. Ainsi, une HC modérée, comme celle que nous avons réalisée, entraîne une modification de mécanismes cellulaires tels que la production de ROS ou l'apoptose, mais n'est pas suffisante pour altérer la structure générale du cervelet, suggérant l'implication de mécanismes compensatoires.

3. EFFETS DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE SUR LE CERVELET : MODELE MURIN D'ADP

Une autre pathologie liée à l'hypoxie dont l'impact sur le cervelet a été très peu étudié est l'ADP. Pour y remédier, nous avons utilisé la chambre d'hypoxie pour développer un modèle murin d'ADP basé sur le protocole de Cai et al. (2011). En effet, ces chercheurs ont démontré que l'induction d'épisodes d'hypoxie de 20 secondes toutes les 2 minutes pendant 6 heures par jour

entre P2 et P10 chez la Souris, provoque des altérations histologiques cérébrales proches de celles observés en imagerie médicale chez les nourrissons souffrant d'ADP. Dans cette étude, nous avons donc cherché à déterminer les conséquences de cette hypoxie intermittente plus spécifiquement sur le cervelet. Comme pour l'HC, nous avons tout d'abord mesuré la production de ROS témoignant d'un stress oxydatif. A l'appui de nos résultats obtenus en HC, nos données indiquent que l'ADP entraine une surproduction de radicaux oxygénés dans le cervelet à P12. En revanche, celle-ci ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'apoptose caspase-dépendante comme lors d'une HP aiguë. Au contraire, l'HI induit une diminution de l'activité enzymatique des caspases-3/7, suggérant que, soit *(i)* l'ADP mimée dans notre protocole peut être considérée comme modérée et présente un effet neuroprotecteur au cours du développement cérébelleux (Cai et al., 2012; Bouslama et al., 2015), soit *(ii)* un mécanisme de défense se met en place pendant la première semaine postnatale pour compenser la mort cellulaire provoquée par le stress oxydatif au fil des cycles d'hypoxie. Un dosage de l'activité caspase-3/7 à P6 pourrait nous permettre d'orienter notre choix en déterminant si l'apoptose est bien stimulée en milieu de protocole. Il ne faut également pas exclure la possibilité que l'HI puisse induire une mort apoptotique caspase-3/7 indépendante (Chiu et al., 2012) ou une mort cellulaire par nécrose ou autophagie (Song et al., 2017).

Par ailleurs, la suite de nos résultats est en faveur de l'hypothèse de la mise en place d'un mécanisme de compensation à la suite d'une mort neuronale accrue. En effet, nos analyses immunohistologiques indiquent que l'ADP entraine une altération sévère de l'organisation corticale du cervelet chez les souris, et disparaît 9 jours après l'arrêt du protocole d'HI. Ainsi, l'épaisseur de l'ensemble du cortex cérébelleux est diminuée à P12 avec un effet prédominant sur la CM et la CGI. De ce fait, la part occupée par la CGE au sein du cortex hypoxique devient plus importante et les proportions de chaque couche cérébelleuse rappellent la structure du cervelet à P6. L'ADP provoquerait donc un retard significatif du développement cérébelleux avec une sensibilité plus importante des neurones en grain différenciés. La réduction de l'épaisseur de la CM suggère que l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et/ou la mise en place des cellules gliales de Bergmann sont également affectées. Cette hypothèse est appuyée par les images immunohistochimiques, démontrant une diminution notable des marquages de la calbindine et GFAP.

Les cellules de Purkinje représentant le centre d'analyse et d'intégration des informations arrivant au sein du cervelet, l'altération de leurs dendrites ou de leurs afférences, telles que les fibres parallèles des cellules en grain différenciées, pose la question des conséquences comportementales de l'ADP. De fait, nous avons démontré que les déficits histologiques induits par l'HI sont

accompagnés de troubles comportementaux chez le souriceau, particulièrement au niveau de l'acquisition des réflexes moteurs. Ainsi les animaux ayant subi le protocole d'ADP accusent un retard de plusieurs jours dans l'acquisition du réflexe de retournement et échouent au test d'agrippement. Ce défaut pourrait s'expliquer par une diminution de la force musculaire liée au retard de croissance. Cependant, nos données indiquent que la différence morphologique observée entre P4 et P21 chez les souris après HI n'est pas associée à une réponse moins importante dans le test de force de préhension. Cela nous permet donc d'attester que les altérations comportementales observées chez le souriceau sont bien liées à un délai fonctionnel dans la maturation du réseau neuronal cérébelleux. De plus, ce retard de croissance n'est plus perceptible chez l'adulte, témoignant de la mise en place d'un système de compensation au cours du temps.

Ce processus compensatoire se retrouve également au niveau cérébelleux puisqu'aucune modification structurale liée à l'hypoxie intermittente n'est visible dans le cervelet à partir de P21. La diminution de l'activité apoptotique caspase-3-dépendante observée à P12 peut constituer l'une des composantes majeures de ce mécanisme compensatoire. Mais la persistance d'une CGE importante à P12 après hypoxie indique que la prolifération, voire la migration des précurseurs des neurones en grain, participeraient également à ce processus.

Par ailleurs, le retard dans l'établissement du réseau intracortical du cervelet au cours du développement semble avoir provoqué des altérations comportementales à long terme chez l'adulte. En effet, les souris HI présentent un nombre de trébuchements plus élevé dans le test de la poutre horizontale avec un temps de traversée similaire aux animaux contrôles, indiquant un déficit de coordination motrice sans atteinte de la motivation. Par ailleurs, les données obtenues dans le test de la piscine de Morris révèlent que les différentes phases de l'apprentissage spatial sont altérées chez les souris hypoxiques. En effet, pendant l'étape d'acquisition, les animaux HI mettent plus de temps à atteindre la plate-forme et leur trajet pour y accéder est moins direct. Le temps de *freezing* plus élevé pourrait suggérer que ces mauvais résultats puissent être liés à un état de stress ou d'un trouble locomoteur mais les tests d'actimétrie et du labyrinthe en croix surélevé infirment cette hypothèse. De plus, lors de la phase de rétention, les souris soumises à l'hypoxie passent moins de temps et parcourent moins de distance dans le quadrant cible où se trouvait la plate-forme, indiquant que la mémoire à court terme est également affectée chez ces animaux. Sachant que plusieurs études ont montré l'importance du cervelet dans les performances de ce test comportemental (Lalonde and Strazielle, 2003; Woodruff-Pak et al., 2006), nos résultats démontrent que l'HI induit des troubles fonctionnels de l'apprentissage et de la mémorisation chez l'adulte liés à une altération du développement cérébelleux. Ces conséquences à long terme pourraient s'expliquer

par la mise en place d'un réseau intracortical erroné ou non optimal du fait du retard de maturation des cellules de Purkinje et/ou des neurones en grain. En effet, Goussakov et al. (2019) ont montré qu'une HI périnatale peut induire une diminution de la LTP, qui pourrait, au moins en partie, être responsable du déficit d'apprentissage. Par ailleurs, une participation de la substance blanche n'est pas à exclure car la plupart des protocoles d'hypoxie périnatale intermittente révèle un défaut de myélinisation dans l'ensemble du SNC, incluant le cervelet (Darnall, 2010; Cai et al., 2012; Juliano et al., 2015; Goussakov et al., 2019).

Enfin, la gravité des troubles comportementaux observés chez l'adulte semble inhérente à la sévérité de la carence en O_2. En effet, une HI intermittente modérée (10 minutes par jour à 5% d'O_2 pendant 5 jours) n'entraîne pas de déficits dans le test de la piscine de Morris (Goussakov et al., 2019). En revanche, des protocoles proches d'un modèle d'ADP tels que celui utilisé dans notre étude ou celui de Juliano et al. (2015) provoquent des défauts sensorimoteurs et/ou de cognition à long terme.

PARTIE II – SELECTION DE SONDES FLUORESCENTES POUR L'ETUDE DE L'HYPOXIE *IN VIVO* EN TEMPS REEL

Nos résultats sur les effets des hypoxies périnatales sur l'histogenèse du cervelet nous ont conduits à essayer de développer de nouveaux outils, permettant d'étudier en temps réel les processus cellulaires déclenchés par une carence en O_2. Pour ce faire, la technique d'imagerie biphotonique reste la plus à même de visualiser les cibles privilégiées de l'hypoxie mais elle soulève deux problèmes majeurs. En effet, l'acquisition en temps réel par microscopie biphotonique implique *(i)* une chirurgie relativement invasive et une anesthésie longue qui ne sont pas facilement optimisables chez le souriceau et *(ii)* l'utilisation de sondes compatibles avec des conditions *in vivo* et excitables en infrarouge.

L'imagerie biphotonique *in vivo* du cervelet de souriceaux de quelques jours est un défi technique qui n'a fait l'objet que d'un nombre très restreint d'articles (Good et al., 2017). Dans un premier temps, nous avons donc mis au point la technique d'anesthésie chez des souris à P10. En effet, les souriceaux réagissent différemment des adultes lorsqu'ils sont soumis à des agents anesthésiques. Les protocoles classiques entraînent alors soit un réveil prématuré (avec l'isoflurane) soit une mortalité accrue avant la fin de l'acquisition (avec la kétamine et/ou la xylazine). Nous avons donc testé des combinaisons d'anesthésiants avant de déterminer que

l'association de valium et d'isoflurane était la plus efficace pour induire une anesthésie et la maintenir au cours de la chirurgie de l'animal. Ensuite, la procédure de chirurgie a été adaptée afin de pouvoir réaliser une fenêtre crânienne au niveau du cervelet et positionner correctement l'animal sous le microscope. La difficulté réside dans le fait que le cervelet est très en arrière du cerveau et doit être orienté dans un plan perpendiculaire à l'objectif sans entraver la respiration de l'animal. Ces phases d'optimisation ont ensuite été expérimentées lors d'une acquisition après application de SR101 dans la fenêtre crânienne pendant 20 minutes. Les images obtenues révèlent qu'il est possible de distinguer différents types cellulaires au sein du cortex cérébelleux, à savoir les neurones, dont les cellules en grain et les cellules de Purkinje, mais aussi des astrocytes incluant les cellules gliales de Bergmann. Ces différentes étapes préparatoires démontrent ainsi l'efficacité de notre protocole, et permettront d'envisager à terme d'imager le cervelet en conditions hypoxiques grâce à des sondes spécifiques.

Dans cette optique, nous avons développé une collaboration avec l'équipe du Pr. Renard du laboratoire COBRA afin de tester différentes sondes sensibles aux concentrations d'O_2 et dérivées de la SR101 (Chevalier et al., 2015). Ces chercheurs nous ont fourni 7 molécules avec des propriétés biochimiques différentes. Leur sensibilité à l'O_2 est liée à des groupements qui agissent comme des quenchers, permettant d'éteindre la fluorescence du composé en condition normoxique. L'hypoxie entraine ensuite l'activation de réductases intracellulaires à l'origine du clivage du quencher. Une fluorescence, proportionnelle à la sévérité de l'hypoxie, apparaît alors dans les cellules affectées. Pour être au plus proche de nos futures conditions expérimentales, la caractérisation spectrale des sondes a été réalisée sur les molécules clivées (donc fluorescentes) diluées à 100 µM dans du tampon physiologique HEPES. En effet, le comportement des sondes pouvant être différent selon le pH et le milieu, il est indispensable de réaliser les spectres d'excitation et d'émission dans les mêmes conditions que celles utilisées *in vivo*. Nos résultats montrent que certaines sondes, comme la SR101-NaphtOH et la R101-110, ne présentent pas ou peu de pic d'excitation et ne pourront donc pas être utilisées en imagerie biphotonique. En revanche, les autres sondes présentent un profil d'excitation proche de celui de la SR101, avec plusieurs pics dans le domaine de l'infrarouge, dont un majoritaire à la longueur d'onde de 815 nm. Cette longueur d'onde a donc été choisie pour réaliser le spectre d'émission. En prenant le pic d'émission principal de la SR101 à 600 nm, il est possible de diviser les autres molécules en deux groupes. En effet, celles qui possèdent un groupement naphtalène présentent un déplacement bathochrome, à savoir un décalage de la longueur d'onde d'émission maximale à

620 nm (Maeda et al., 2012), tandis que les autres montrent un déplacement hypsochrome avec une émission optimale à 570 nm. Ces données sont intéressantes car elles permettent de concevoir plusieurs possibilités de double marquage avec des traceurs qui émettraient soit à 620 nm (en utilisant les sondes hypsochromes) soit à 570 nm (en utilisant les molécules avec un groupement naphtalène).

Par ailleurs, nos résultats sur l'effet de l'hypoxie au cours du développement cérébelleux indiquent que les processus délétères liés au manque d'O_2, telles que l'apoptose, peuvent mettre plusieurs heures voire plusieurs jours à se mettre en place. Il est donc important que la sonde utilisée ne se dégrade pas dans le temps afin de ne pas avoir une diminution progressive du signal fluorescent. Nous avons donc de nouveau réalisé les profils d'excitation des composés, mais sur 5 jours consécutifs afin de vérifier la stabilité des sondes. Nos résultats démontrent de faibles variations dans l'intensité du signal émis au cours du temps, mais qui ne sont pas dépendantes de l'ancienneté de la préparation. Elles ne témoignent donc pas d'une dégradation des molécules mais pourraient s'expliquer par une légère instabilité des conditions expérimentales telles que la température ou la puissance du laser, qui peuvent être légèrement différentes entre chaque jour.

La caractérisation des sondes *in vitro* et l'optimisation du protocole d'anesthésie nous ont amenés à envisager de tester les molécules *in vivo* afin d'observer leur comportement au sein des tissus cérébelleux. Cependant, des problèmes techniques liés à un retard dans le déménagement du service de chirurgie animale à proximité du microscope biphotonique ont exclu toute poursuite d'expérimentation en imagerie *in vivo* jusqu'en février 2020. Toutefois, en se basant sur l'ensemble des résultats obtenus à la fois sur la caractérisation spectrale mais aussi sur la stabilité, nous nous proposons de continuer les expérimentations avec 4 sondes, à savoir la SR101-OH, la SR101-110, la SR101-NaphtNH_2 et la R101-NaphtNH_2 (en conservant la SR101 en tant que contrôle positif).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre cette thèse contribue à la compréhension de l'impact de l'hypoxie périnatale sur le développement du cervelet. Pour ce faire, nous avons conçu une enceinte permettant de réaliser différents types d'hypoxie dans les mêmes conditions environnementales et de faciliter la comparaison des résultats. Les cycles d'hypoxie/normoxie sont effectués par injection d'l'azote, d'oxygène et ou d'air, tout en maintenant constants les paramètres environnementaux. Nous avons alors développé deux protocoles, l'HC et l'HI, visant respectivement à mimer chez le souriceau soit un accident ponctuel à la naissance (enroulement du cordon ombilical, retard de respiration aérienne, …) soit une hypoxie chronique appelée apnée du prématuré (ADP). Chez ces modèles animaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'impact de ces deux hypoxies sur le développement du cervelet, pour lequel il n'existe que peu de données malgré une importante susceptibilité aux incidents périnataux.

Globalement, nos résultats confirment que cette structure est en effet sensible à un manque d'oxygène néonatal et y répond par une augmentation significative de la production de ROS. Une analyse plus approfondie du processus de stress oxydatif est en cours grâce au dosage de l'activité de certaines enzymes antioxydantes telles que la catalase ou la superoxyde dismutase. Cependant, cette étude indique que les conséquences histologiques sur le cervelet sont beaucoup plus modérées chez le souriceau après un épisode hypoxique ponctuel que lors d'une pathologie chronique comme l'ADP. En effet, l'HC entraîne une augmentation de l'apoptose dont l'impact semble modeste car elle n'est pas accompagnée d'une modification de l'architecture du cortex cérébelleux.

A l'inverse, le protocole d'HI induit un retard significatif de l'histogenèse du cervelet associé à un défaut d'acquisition des réflexes de retournement et d'agrippement chez le souriceau. L'altération du cortex cérébelleux n'est plus visible chez l'adulte, suggérant que celui-ci met en place un système de compensation au cours du temps pour pallier les effets délétères de l'hypoxie. Ce processus inclut une diminution de l'apoptose pendant la première semaine postnatale mais des analyses de marquage BrdU nous permettront de déterminer si cette réaction anti-apoptotique s'accompagne d'une intensification de la prolifération et/ou de la migration des cellules en grain. Cependant, malgré cette réponse compensatoire, nos travaux montrent que des déficits d'apprentissage et de coordination motrice subsistent chez l'adulte, suggérant que des anomalies cérébelleuses sont toujours présentes. Il serait donc intéressant d'approfondir des analyses comportementales grâce à d'autres tests comme le Catwalk ou le Rotarod afin de mieux appréhender l'ampleur des lésions cérébelleuses.

De plus, un déficit comportemental étant toujours lié à une erreur de communication au sein du réseau neuronal, il est maintenant indispensable de déterminer précisément l'influence d'une HI sur l'expression de différents marqueurs impliqués dans la mise en place des afférences du cortex cérébelleux. Nous envisageons ainsi d'analyser le *vesicular glutamate transporter 2* ou le récepteur ionotropique du glutamate delta 2, qui permettent de marquer les synapses établies respectivement entre les cellules de Purkinje et les fibres grimpantes ou les fibres parallèles. De même, des études électrophysiologiques sur des tranches organotypiques de cervelet de souris sont envisagées pour connaître l'activité électrique des cellules de Purkinje après une HI. Les résultats nous permettront de déterminer si l'HI peut induire une altération de la voie cérébelleuse afférente qui pourrait expliquer *(i)* les déficits comportementaux chez le souriceau et *(ii)* leur persistance chez l'adulte malgré l'absence de modifications histologiques significatives.

Enfin, les données bibliographiques révèlent qu'une hypoxie périnatale est souvent associée à une altération de la substance blanche et de la myélinisation. Un marquage immunohistochimique à l'aide des marqueurs *oligodendrocyte transcription factor 2* et *myelin basic protein* sera donc réalisé afin de déterminer l'impact d'une HI sur le nombre et la fonctionnalité des oligodendrocytes

Par ailleurs, au cours de cette thèse, nous avons cherché à développer d'autres techniques d'études de l'hypoxie *in vivo* chez l'animal. Grâce à une collaboration avec le Pr. PY Renard, nous avons ainsi caractérisé sept sondes dérivées de la SR101, qui, en condition hypoxique, sont clivées et émettent une fluorescence proportionnelle au manque d'O_2. Quatre de ces molécules ont été sélectionnées sur la base de leur caractérisation spectrale en vue d'une utilisation en microscopie biphotonique. De plus, la mise au point d'un système d'anesthésie adapté au souriceau permet maintenant d'imager le cervelet chez une souris de moins de 10 jours.

Malheureusement, du fait de conditions techniques inappropriées liées au déménagement du service de chirurgie, aucune de ces sondes n'a jamais pu être testée chez l'animal. Dans l'attente (jusque février 2020), nous nous proposons de réaliser une étude afin de déterminer la perméabilité et la toxicité des sondes sur des cultures cellulaires. Ces tests seront réalisés sur des cultures de neurones en grain du cervelet seuls, différenciés ou non. Des co-cultures en présence d'astrocytes sont également envisagées pour savoir si le marquage astrocytaire spécifique avec la SR101 est également observé avec ses dérivés. Les résultats pourraient aider à déterminer l'état de souffrance des différents types cellulaires lors d'une hypoxie. En effet, si les astrocytes perdent leur marquage SR101, cela signifie que le transporteur *organic-anion-transporting polypeptide 1C1,* n'est plus fonctionnel lors d'une carence en oxygène. De même, le marquage des neurones lors d'une hypoxie

indique que le processus de rejet de la SR-101 faisant intervenir des stéroïdes sulfatés et l'alloprégnanolone est défaillant en hypoxie. Bien que réalisées *in vitro*, ces données permettront d'anticiper le comportement des sondes *in vivo* chez l'animal pour une utilisation optimale lors de l'étude des mécanismes cellulaires impactés par l'hypoxie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott BD, Buckalew AR. 2000. Placental defects in ARNT-knockout conceptus correlate with localized decreases in VEGF-R2, Ang-1, and Tie-2. *Dev Dyn* **219**(4): 526–538. doi: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1080>3.0.CO;2-N

Abu-Shaweesh JM, Dreshaj IA, Haxhiu MA, Martin RJ. 2001. Central GABAergic mechanisms are involved in apnea induced by SLN stimulation in piglets. *Journal of Applied Physiology* **90**(4): 1570–1576. doi: 10.1152/jappl.2001.90.4.1570

Abu-Shaweesh JM, Martin RJ. 2008. Neonatal apnea: what's new? *Pediatr Pulmonol* **43**(10): 937–944. doi: 10.1002/ppul.20832

Ackermann H, Mathiak K, Riecker A. 2007. The contribution of the cerebellum to speech production and speech perception: Clinical and functional imaging data. *MCER* **6**(3): 202–213. doi: 10.1080/14734220701266742

Adamaszek M, D'Agata F, Ferrucci R, Habas C, Keulen S, Kirkby KC, Leggio M, Mariën P, Molinari M, Moulton E, et al. 2017. Consensus paper: cerebellum and emotion. *Cerebellum* **16**(2): 552–576. doi: 10.1007/s12311-016-0815-8

Adamaszek M, D'Agata F, Kirkby KC, Trenner MU, Sehm B, Steele CJ, Berneiser J, Strecker K. 2014. Impairment of emotional facial expression and prosody discrimination due to ischemic cerebellar lesions. *Cerebellum* **13**(3): 338–345. doi: 10.1007/s12311-013-0537-0

Albus JS. 1971. A theory of cerebellar function. *Mathematical Biosciences* **10**(1–2): 25–61. doi: 10.1016/0025-5564(71)90051-4

Allais A, Burel D, Roy V, Arthaud S, Galas L, Isaac ER, Desfeux A, Parent B, Fournier A, Chapillon P, et al. 2010. Balanced effect of PACAP and FasL on granule cell death during cerebellar development: a morphological, functional and behavioural characterization. *J Neurochem* **113**(2): 329–340. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06555.x

Allen G, Müller R-A, Courchesne E. 2004. Cerebellar function in autism: Functional magnetic resonance image activation during a simple motor task. *Biological Psychiatry* **56**(4): 269–278. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.06.005

Allin M, Matsumoto H, Santhouse AM, Nosarti C, AlAsady MHS, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. 2001a. Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. *Brain* **124**(1): 60–66. doi: 10.1093/brain/124.1.60

Allin M, Matsumoto H, Santhouse AM, Nosarti C, AlAsady MHS, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. 2001b. Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. *Brain* **124**(1): 60–66. doi: 10.1093/brain/124.1.60

Alvaro R, Alvarez J, Kwiatkowski K, Cates D, Rigatto H. 1992. Small preterm infants (≤1500 g) have only a sustained decrease in ventilation in response to hypoxia. *Pediatr Res* **32**(4): 403–406. doi: 10.1203/00006450-199210000-00007

An H, Lin W. 2000. Quantitative measurements of cerebral blood oxygen saturation using magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(8): 1225–1236. doi: 10.1097/00004647-200008000-00008

An H, Liu Q, Chen Y, Lin W. 2009. Evaluation of MR-derived cerebral oxygen metabolic index in experimental hyperoxic hypercapnia, hypoxia, and ischemia. *Stroke* **40**(6): 2165–2172. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.540864

Andreyev A, Tamrakar P, Rosenthal RE, Fiskum G. 2018. Calcium uptake and cytochrome c release from normal and ischemic brain mitochondria. *Neurochemistry International* **117**: 15–22. doi: 10.1016/j.neuint.2017.10.003

Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ. 2004. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* **119**(2): 257–272. doi: 10.1016/j.cell.2004.10.004

Archer SL, Weir EK, Reeve HL, Michelakis E. 2000. Molecular identification of O2 sensors and O2-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol* **475**: 219–240. doi: 10.1007/0-306-46825-5_21

Asanuma C, Thach WT, Jones EG. 1983. Distribution of cerebellar terminations and their relation to other afferent terminations in the ventral lateral thalamic region of the monkey. *Brain Research Reviews* **5**(3): 237–265. doi: 10.1016/0165-0173(83)90015-2

Ashrafi G, Wu Z, Farrell RJ, Ryan TA. 2017. Glut4 mobilization supports energetic demands of active synapses. *Neuron* **93**(3): 606-615.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.020

Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Gibson SB. 2008. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* **4**(2): 195–204. doi: 10.4161/auto.5278

Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM. 2002. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia–ischemia. *J Neurosci* **22**(2): 455–463. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-02-00455.2002

Bagnall MW, Zingg B, Sakatos A, Moghadam SH, Zeilhofer HU, Lac S d. 2009. Glycinergic projection neurons of the cerebellum. *Journal of Neuroscience* **29**(32): 10104–10110. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2087-09.2009

Bailey A. 1998. A clinicopathological study of autism. *Brain* **121**(5): 889–905. doi: 10.1093/brain/121.5.889

Bamford OS, Sterni LM, Wasicko MJ, Montrose MH, Carroll JL. 1999. Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **276**(5): L875–L884. doi: 10.1152/ajplung.1999.276.5.L875

Barili P, Bronzetti E, Ricci A, Zaccheo D, Amenta F. 2000. Microanatomical localization of dopamine receptor protein immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Brain Research* **854**(1): 130–138. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02306-9

Barmack NH, Baughman RW, Eckenstein FP. 1992. Cholinergic innervation of the cerebellum of the rat by secondary vestibular afferents. *Ann NY Acad Sci* **656**(1 Sensing and C): 566–579. doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb25236.x

Baudelet C, Gallez B. 2002. How does blood oxygen level-dependent (BOLD) contrast correlate with oxygen partial pressure (pO2) inside tumors? *Magn Reson Med* **48**(6): 980–986. doi: 10.1002/mrm.10318

Baumann O, Mattingley JB. 2012. Functional topography of primary emotion processing in the human cerebellum. *NeuroImage* **61**(4): 805–811. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.03.044

Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DD, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY. 1997. Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* **390**: 169–172. doi: 10.1038/36579

Bhanja S, Chainy GBN. 2010. PTU-induced hypothyroidism modulates antioxidant defence status in the developing cerebellum. *International Journal of Developmental Neuroscience* **28**(3): 251–262. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.01.005

Biran V, Heine VM, Verney C, Sheldon RA, Spadafora R, Vexler ZS, Rowitch DH, Ferriero DM. 2011. Cerebellar abnormalities following hypoxia alone compared to hypoxic–ischemic forebrain injury in the developing rat brain. *Neurobiology of Disease* **41**(1): 138–146. doi: 10.1016/j.nbd.2010.09.001

Biran V, Verney C, Ferriero DM. 2012. Perinatal Cerebellar Injury in Human and Animal Models. *Neurology Research International* **2012**: 1–9. doi: 10.1155/2012/858929

Bischofberger N, Jacobson KA, Lubitz DKJE. 1997. Adenosine A_1 receptor agonists as clinically viable agents for treatment of ischemic brain disorders. *Ann NY Acad Sci* **825**(1 Neuroprotecti): 23–29. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48411.x

Bishop GA, Ho RH. 1985. The distribution and origin of serotonin immunoreactivity in the rat cerebellum. *Brain Research* **331**(2): 195–207. doi: 10.1016/0006-8993(85)91545-8

Blaess S, Graus-Porta D, Belvindrah R, Radakovits R, Pons S, Littlewood-Evans A, Senften M, Guo H, Li Y, Miner JH, et al. 2004. β1-integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci* **24**(13): 3402–3412. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5241-03.2004

Blood AB, Hunter CJ, Power GG. 2003. Adenosine mediates decreased cerebral metabolic rate and increased cerebral blood flow during acute moderate hypoxia in the near-term fetal sheep. *The Journal of Physiology* **553**(3): 935–945. doi: 10.1113/jphysiol.2003.047928

Bona E, Ådén U, Gilland E, Fredholm BB, Hagberg H. 1997. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia: The effect of adenosine receptor antagonists. *Neuropharmacology* **36**(9): 1327–1338. doi: 10.1016/S0028-3908(97)00139-1

Booth JR, Wood L, Lu D, Houk JC, Bitan T. 2007. The role of the basal ganglia and cerebellum in language processing. *Brain Research* **1133**: 136–144. doi: 10.1016/j.brainres.2006.11.074

Borghesani PR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Corfas G, Segal RA. 2002. BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* **129**(6): 1435–1442.

Borst JW, Visser NV, Kouptsova O, Visser AJWG. 2000. Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity changes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1487**(1): 61–73. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00084-6

Bosman LWJ, Takechi H, Hartmann J, Eilers J, Konnerth A. 2008. Homosynaptic long-term synaptic potentiation of the "winner" climbing fiber synapse in developing Purkinje cells. *J Neurosci* **28**(4): 798–807. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4074-07.2008

Bouslama M, Adle-Biassette H, Ramanantsoa N, Bourgeois T, Bollen B, Brissaud O, Matrot B, Gressens P, Gallego J. 2015. Protective effects of intermittent hypoxia on brain and memory in a mouse model of apnea of prematurity. *Front Physiol* **6**. doi: 10.3389/fphys.2015.00313

Boyden ES, Raymond JL. 2003. Active Reversal of Motor Memories Reveals Rules Governing Memory Encoding. *Neuron* **39**(6): 1031–1042. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00562-2

Briatore F, Patrizi A, Viltono L, Sassoè-Pognetto M, Wulff P. 2010. Quantitative organization of GABAergic synapses in the molecular layer of the mouse cerebellar cortex. Tell F, editor. *PLoS ONE* **5**(8): e12119. doi: 10.1371/journal.pone.0012119

Bureau I, Dieudonne S, Coussen F, Mulle C. 2000. Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(12): 6838–6843. doi: 10.1073/pnas.97.12.6838

Cai J, Tuong CM, Gozal D. 2011. A neonatal mouse model of intermittent hypoxia associated with features of apnea in premature infants. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **178**(2): 210–217. doi: 10.1016/j.resp.2011.06.003

Cai J, Tuong CM, Zhang Y, Shields CB, Guo G, Fu H, Gozal D. 2012. Mouse intermittent hypoxia mimicking apnoea of prematurity: effects on myelinogenesis and axonal maturation. *J Pathol* **226**(3): 495–508. doi: 10.1002/path.2980

Cao S, Shrestha S, Li J, Yu X, Chen J, Yan F, Ying G, Gu C, Wang L, Chen G. 2017. Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep* **7**(1): 2417. doi: 10.1038/s41598-017-02679-z

Cervetto C, Frattaroli D, Venturini A, Passalacqua M, Nobile M, Alloisio S, Tacchetti C, Maura G, Agnati LF, Marcoli M. 2015. Calcium-permeable AMPA receptors trigger vesicular glutamate release from Bergmann gliosomes. *Neuropharmacology* **99**: 396–407. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.011

Chan-Palay V. 1971. The recurrent collaterals of Purkinje cell axons: A correlated study of the rat's cerebellar cortex with electron microscopy and the Golgi method. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* **134**(2): 200–234. doi: 10.1007/BF00519300

Chan-Palay V, Palay SL. 1972a. The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rat: High voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. *Z Anat Entwickl Gesch* **138**(1): 1–19. doi: 10.1007/BF00519921

Chan-Palay V, Palay SL. 1972b. High voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. Neurons and their processes in the cerebellar cortex of monkey and rat. *Z Anat Entwickl Gesch* **137**(2): 125–152. doi: 10.1007/BF00538787

Chaudhry FA, Lehre KP, Lookeren Campagne M van, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* **15**(3): 711–720. doi: 10.1016/0896-6273(95)90158-2

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**(38): 36027–36031. doi: 10.1074/jbc.M304854200

Chevalier A, Piao W, Hanaoka K, Nagano T, Renard P-Y, Romieu A. 2015. Azobenzene-caged sulforhodamine dyes: a novel class of 'turn-on' reactive probes for hypoxic tumor cell imaging. *Methods Appl Fluoresc* **3**(4): 044004. doi: 10.1088/2050-6120/3/4/044004

Chi CL, Martinez S, Wurst W, Martin GR. 2003. The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* **130**(12): 2633–2644. doi: 10.1242/dev.00487

Chiu S-C, Huang S-Y, Tsai Y-C, Chen S-P, Pang C-Y, Lien C-F, Lin Y-J, Yang K-T. 2012. Poly (ADP-ribose) polymerase plays an important role in intermittent hypoxia-induced cell death in rat cerebellar granule cells. *J Biomed Sci* **19**(1): 29. doi: 10.1186/1423-0127-19-29

Cioni J-M, Telley L, Saywell V, Cadilhac C, Jourdan C, Huber AB, Huang JZ, Jahannault-Talignani C, Ango F. 2013. SEMA3A signaling controls layer-specific interneuron branching in the cerebellum. *Curr Biol* **23**(10): 850–861. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.007

Clark LC, Misrahy G, Fox RP. 1958. *Chronically Implanted Polarographic Electrodes*. *Journal of Applied Physiology* **13**(1): 85–91. doi: 10.1152/jappl.1958.13.1.85

Cohen G, Malcolm G, Henderson-Smart D. 1997. Ventilatory response of the newborn infant to mild hypoxia. *Pediatric Pulmonology* **24**(3): 163–172. doi: 10.1002/(SICI)1099-0496(199709)24:3<163::AID-PPUL1>3.0.CO;2-O

Connolly DJA, Widjaja E, Griffiths PD. 2007. Involvement of the Anterior Lobe of the Cerebellar Vermis in Perinatal Profound Hypoxia. *American Journal of Neuroradiology* **28**(1): 16–19.

Cooper JM, Gadian DG, Jentschke S, Goldman A, Munoz M, Pitts G, Banks T, Chong WK, Hoskote A, Deanfield J, et al. 2015. Neonatal hypoxia, hippocampal atrophy, and memory impairment: evidence of a causal sequence. *Cereb Cortex* **25**(6): 1469–1476. doi: 10.1093/cercor/bht332

Coyoy A, Olguín-Albuerne M, Martínez-Briseño P, Morán J. 2013. Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum. *Neurochemistry International* **62**(7): 998–1011. doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.009

Crawford JH. 2006. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood* **107**(2): 566–574. doi: 10.1182/blood-2005-07-2668

Crossley PH, Martinez S, Martin GR. 1996. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**(6569): 66–68. doi: 10.1038/380066a0

Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S. 2010. Mechanism of hypoxia-induced NF-KB. *Molecular and Cellular Biology* **30**(20): 4901–4921. doi: 10.1128/MCB.00409-10

Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, Miller A, Boyle JP, Pearson HA, Peers C. 2007. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *Journal of Neuroscience* **27**(15): 3946–3955. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5030-06.2007

D'Angelo E, Casali S. 2013. Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Front Neural Circuits* **6**. doi: 10.3389/fncir.2012.00116

Darnall RA. 2010. The role of CO2 and central chemoreception in the control of breathing in the fetus and the neonate. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **173**(3): 201–212. doi: 10.1016/j.resp.2010.04.009

Dart C, Standen NB. 1995. Activation of ATP-dependent K+ channels by hypoxia in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *The Journal of Physiology* **483**(1): 29–39. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020565

De Luca A, Parmigiani E, Tosatto G, Martire S, Hoshino M, Buffo A, Leto K, Rossi F. 2015. Exogenous Sonic hedgehog modulates the pool of GABAergic interneurons during cerebellar development. *Cerebellum* **14**(2): 72–85. doi: 10.1007/s12311-014-0596-x

Dean I, Robertson SJ, Edwards FA. 2003. Serotonin drives a novel GABAergic synaptic current recorded in rat cerebellar Purkinje cells: A Lugaro cell to Purkinje cell synapse. *The Journal of Neuroscience* **23**(11): 4457–4469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-11-04457.2003

Desclin JC. 1974. Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Research* **77**(3): 365–384. doi: 10.1016/0006-8993(74)90628-3

Di Fiore JM. 2005. Apnea is not prolonged by acid gastroesophageal reflux in preterm infants. *PEDIATRICS* **116**(5): 1059–1063. doi: 10.1542/peds.2004-2757

Di Fiore JM, Martin RJ, Gauda EB. 2013. Apnea of prematurity – Perfect storm. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **189**(2): 213–222. doi: 10.1016/j.resp.2013.05.026

Diedrichsen J, King M, Hernandez-Castillo C, Sereno M, Ivry RB. 2019. Universal transform or multiple functionality? Understanding the contribution of the human cerebellum across task domains. *Neuron* **102**(5): 918–928. doi: 10.1016/j.neuron.2019.04.021

Dieudonné S, Dumoulin A. 2000. Serotonin-driven long-range inhibitory connections in the cerebellar cortex. *The Journal of Neuroscience* **20**(5): 1837–1848. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-05-01837.2000

DiGregorio DA, Nusser Z, Silver RA. 2002. Spillover of glutamate onto synaptic AMPA receptors enhances fast transmission at a cerebellar synapse. *Neuron* **35**(3): 521–533. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00787-0

Dinenno FA. 2016. Skeletal muscle vasodilation during systemic hypoxia in humans. *Journal of Applied Physiology* **120**(2): 216–225. doi: 10.1152/japplphysiol.00256.2015

Diño MR, Schuerger RJ, Liu Y-B, Slater NT, Mugnaini E. 2000. Unipolar brush cell: a potential feedforward excitatory interneuron of the cerebellum. *Neuroscience* **98**(4): 625–636. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00123-8

Donkelaar HJ ten, Lammens M, Hori A. 2014. *Clinical Neuroembryology: Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System*. Springer.

Dugué GP, Brunel N, Hakim V, Schwartz E, Chat M, Lévesque M, Courtemanche R, Léna C, Dieudonné S. 2009. Electrical coupling mediates tunable low-frequency oscillations and resonance in the cerebellar Golgi cell network. *Neuron* **61**(1): 126–139. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.028

Dugué GP, Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S. 2005. Target-dependent use of coreleased inhibitory transmitters at central synapses. *J Neurosci* **25**(28): 6490–6498. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1500-05.2005

Dum RP, Strick PL. 2003. An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology* **89**(1): 634–639. doi: 10.1152/jn.00626.2002

Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S. 2001. IPSC kinetics at identified GABAergic and mixed GABAergic and glycinergic synapses onto cerebellar Golgi cells. *The Journal of Neuroscience* **21**(16): 6045–6057. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-16-06045.2001

Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, Thakrar A, Parlow LRG, Mewburn JD, Parlow JL, Archer SL. 2017. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* **151**(1): 181–192. doi: 10.1016/j.chest.2016.09.001

Dunwiddie TV, Masino SA. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**(1): 31–55. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.31

Dwinell MR, Janssen PL, Bisgard GE. 1997. Lack of long term facilitation of ventilation after exposure to hypoxia in goats. *Respiration Physiology* **108**(1): 1–9. doi: 10.1016/S0034-5687(96)02522-4

Eichenwald EC, Committee on Fetus and Newborn. 2016a. Apnea of prematurity. *Pediatrics* **137**(1): e20153757. doi: 10.1542/peds.2015-3757

Eichenwald EC, Committee on Fetus and Newborn. 2016b. Apnea of prematurity. *Pediatrics* **137**(1): e20153757. doi: 10.1542/peds.2015-3757

Ekerot CF, Garwicz M, Schouenborg J. 1991. The postsynaptic dorsal column pathway mediates cutaneous nociceptive information to cerebellar climbing fibres in the cat. *J Physiol* **441**: 275–284.

Fang C, Gu L, Smerin D, Mao S, Xiong X. 2017. The interrelation between reactive oxygen species and autophagy in neurological disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**: 1–16. doi: 10.1155/2017/8495160

Farahani R, Kanaan A, Gavrialov O, Brunnert S, Douglas RM, Morcillo P, Haddad GG. 2008. Differential effects of chronic intermittent and chronic constant hypoxia on postnatal growth and development. *Pediatr Pulmonol* **43**(1): 20–28. doi: 10.1002/ppul.20729

Fendt M, Lex A, Falkai P, Henn F, Schmitt A. 2008. Behavioural alterations in rats following neonatal hypoxia and effects of clozapine: implications for schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* **41**(04): 138–145. doi: 10.1055/s-2008-1058107

Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, Unger T. 1992. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* **19**(6_pt_1): 555–561. doi: 10.1161/01.HYP.19.6.555

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4604–4613. doi: 10.1128/MCB.16.9.4604

Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinauer MC, Cutz E. 2000. NADPH oxidase is an O2 sensor in airway chemoreceptors: Evidence from K+ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(8): 4374–4379. doi: 10.1073/pnas.97.8.4374

Gaschler MM, Stockwell BR. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **482**(3): 419–425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086

Gauda EB, McLemore GL, Tolosa J, Marston-Nelson J, Kwak D. 2004. Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea. *Seminars in Neonatology* **9**(3): 181–194. doi: 10.1016/j.siny.2003.11.002

Gauda EB, Northington FJ, Linden J, Rosin DL. 2000. Differential expression of A2a, A1-adenosine and D2-dopamine receptor genes in rat peripheral arterial chemoreceptors during postnatal development. *Brain Research* **872**(1–2): 1–10. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02314-3

Gaultier C, Simonneau M, Dauger S, Gallego J. 2003. Génétique et contrôle respiratoire. *Rev Mal Respir*: 18.

Glasgow JN, Qiu J, Rassin D, Grafe M, Wood T, Perez-Pol JR. 2001. Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain. *Neurochem Res* **26**(6): 647–659. doi: 10.1023/a:1010987220034

Good J-M, Mahoney M, Miyazaki T, Tanaka KF, Sakimura K, Watanabe M, Kitamura K, Kano M. 2017. Maturation of cerebellar Purkinje cell population activity during postnatal refinement of climbing fiber network. *Cell Reports* **21**(8): 2066–2073. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.101

Gordon I, Eilbott JA, Feldman R, Pelphrey KA, Vander Wyk BC. 2013. Social, reward, and attention brain networks are involved when online bids for joint attention are met with

congruent versus incongruent responses. *Social Neuroscience* **8**(6): 544–554. doi: 10.1080/17470919.2013.832374

Gottwald B. 2004. Evidence for distinct cognitive deficits after focal cerebellar lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **75**(11): 1524–1531. doi: 10.1136/jnnp.2003.018093

Goussakov I, Synowiec S, Yarnykh V, Drobyshevsky A. 2019. Immediate and delayed decrease of long term potentiation and memory deficits after neonatal intermittent hypoxia. *International Journal of Developmental Neuroscience* **74**: 27–37. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.03.001

Gozal D, Gozal E, Simakajornboon N. 2000. Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respiration Physiology* **121**(2–3): 209–221. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00129-8

Gozal E, Gozal D, Pierce WM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Sachleben LR, Brittian KR, Guo S-Z, Cai J, Klein JB. 2002. Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. *J Neurochem* **83**(2): 331–345. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01134.x

Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. 1999. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *Journal of Applied Physiology* **86**(1): 298–305. doi: 10.1152/jappl.1999.86.1.298

Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. 2002. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* **68**(2): 138–149. doi: 10.1002/jnr.10197

Grow WA. 2018. Development of the Nervous System. In: *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*. Elsevier. p. 72-90.e1. doi: 10.1016/B978-0-323-39632-5.00005-0

Guell X, Hoche F, Schmahmann JD. 2015. Metalinguistic deficits in patients with cerebellar dysfunction: empirical support for the dysmetria of thought theory. *Cerebellum* **14**(1): 50–58. doi: 10.1007/s12311-014-0630-z

Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. 1993. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of Neuroimmunology* **47**(2): 169–176. doi: 10.1016/0165-5728(93)90027-V

Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, et al. 1996. Disruption of the nuclear hormone receptor RORα in staggerer mice. *Nature* **379**(6567): 736–739. doi: 10.1038/379736a0

Hanke S, Reichenbach A. 1987. Quantitative-morphometric aspects of bergmann glial (Golgi epithelial) cell development in rats. *Anatomy and Embryology* **177**(2): 183–188. doi: 10.1007/bf00572543

Hansson MJ, Månsson R, Morota S, Uchino H, Kallur T, Sumi T, Ishii N, Shimazu M, Keep MF, Jegorov A, et al. 2008. Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine* **45**(3): 284–294. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.021

Hardie DG. 2000. Metabolic control: A new solution to an old problem. *Current Biology* **10**(20): R757–R759. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00744-2

Harrington DL, Lee RR, Boyd LA, Rapcsak SZ, Knight RT. 2003. Does the representation of time depend on the cerebellum? Effect of cerebellar stroke. *Brain : a journal of neurology* **127**(Pt): 561–574. doi: 10.1093/brain/awh065

Henderson-Smart DJ. 1981. The effect of gestational age on the incidence and duration of recurrent apnoea in newborn babies. *J Paediatr Child Health* **17**(4): 273–276. doi: 10.1111/j.1440-1754.1981.tb01957.x

Henderson-Smart DJ, Steer PA. 2010 Jan 20. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. Cochrane Neonatal Group, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, in press. doi: 10.1002/14651858.CD000273.pub2

Herlenius E, Ådén U, Tang LQ, Lagercrantz H. 2002. Perinatal respiratory control and its modulation by adenosine and caffeine in the rat. *Pediatr Res* **51**(1): 4–12. doi: 10.1203/00006450-200201000-00004

Herndon RM. 1963. The fine structure of the Purkinje cell. *J Cell Biol* **18**(1): 167–180.

Hertzberg T, Lagercrantz H. 1987. Postnatal sensitivity of the peripheral chemoreceptors in newborn infants. *Archives of Disease in Childhood* **62**(12): 1238–1241. doi: 10.1136/adc.62.12.1238

Hirst J, King MS, Pryde KR. 2008. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochm Soc Trans* **36**(5): 976–980. doi: 10.1042/BST0360976

Höckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baußnann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P. 1993. Intratumoral pO2 predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiotherapy and Oncology* **26**(1): 45–50. doi: 10.1016/0167-8140(93)90025-4

Hodgkiss RJ, Begg AC, Middleton RW, Parrick J, Stratford MRL, Wardman P, Wilson GD. 1991. Fluorescent markers for hypoxic cells. *Biochemical Pharmacology* **41**(4): 533–541. doi: 10.1016/0006-2952(91)90625-F

Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, et al. 2005. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* **47**(2): 201–213. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.007

Huang J, Zhang L, Kang B, Zhu T, Li Y, Zhao F, Qu Y, Mu D. 2017. Association between perinatal hypoxic-ischemia and periventricular leukomalacia in preterm infants: A systematic review and meta-analysis. Luo Z-C, editor. *PLoS ONE* **12**(9): e0184993. doi: 10.1371/journal.pone.0184993

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* **271**(50): 32253–32259. doi: 10.1074/jbc.271.50.32253

Idiong N, Lemke RP, Lin Y-J, Kwiatkowski K, Cates DB, Rigatto H. 1998. Airway closure during mixed apneas in preterm infants: Is respiratory effort necessary? *The Journal of Pediatrics* **133**(4): 509–512. doi: 10.1016/S0022-3476(98)70058-7

Ikai Y, Takada M, Shinonaga Y, Mizuno N. 1992. Dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat project, respectively, to the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* **51**(3): 719–728. doi: 10.1016/0306-4522(92)90310-x

Irving C, Mason I. 2000. Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* **127**(1): 177–186.

Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, Tohyama C. 2009. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacology* **77**(4): 660–669. doi: 10.1016/j.bcp.2008.10.030

Ito M, Sakurai M, Tongroach P. 1982. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* **324**: 113–134.

Ito M, Yoshida M, Obata K. 1964. Monosynaptic inhibition of the intracerebellar nuclei induced from the cerebellar cortex. *Experientia* **20**(10): 575–576. doi: 10.1007/BF02150304

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O2 sensing. *Science* **292**(5516): 464–468. doi: 10.1126/science.1059817

Jaarsma D, Ruigrok TJH, Caffé R, Cozzari C, Levey AI, Mugnaini E, Voogd Jan. 1997. Chapter 5 Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. In: De Zeeuw CI, Strata P, Voogd J., editors. *Progress in Brain Research*. Elsevier. p. 67–96. doi: 10.1016/S0079-6123(08)63359-2

Jackson WF. 2000. Hypoxia does not activate ATP-sensitive K+ channels in arteriolar muscle cells. *Microcirculation* **7**(2): 137–145.

Jaeger D, De Schutter E, Bower JM. 1997. The role of synaptic and voltage-gated currents in the control of Purkinje cell cpiking: A modeling study. *The Journal of Neuroscience* **17**(1): 91–106. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-01-00091.1997

James JEA, Daly M de B. 1969. Cardiovascular responses in apnoeic asphyxia: role of arterial chemoreceptors and the modification of their effects by a pulmonary vagal inflation reflex. *The Journal of Physiology* **201**(1): 87–104. doi:10.1113/jphysiol.1969.sp008744

Janvier A, Khairy M, Kokkotis A, Cormier C, Messmer D, Barrington KJ. 2004. Apnea is associated with neurodevelopmental impairment in very low birth weight infants. *J Perinatol* **24**(12): 763–768. doi: 10.1038/sj.jp.7211182

Jie W, Pei-Xi C. 1992. Discharge response of cerebellar Purkinje cells to stimulation of C-fiber in cat saphenous nerve. *Brain Research* **581**(2): 269–272. doi: 10.1016/0006-8993(92)90717-N

Juliano C, Sosunov S, Niatsetskaya Z, Isler JA, Utkina-Sosunova I, Jang I, Ratner V, Ten V. 2015. Mild intermittent hypoxemia in neonatal mice causes permanent neurofunctional deficit and white matter hypomyelination. *Experimental Neurology* **264**: 33–42. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.11.010

Kakita H, Hussein MH, Yamada Y, Henmi H, Kato S, Kobayashi S, Ito T, Kato I, Fukuda S, Suzuki S, et al. 2009. High postnatal oxidative stress in neonatal cystic periventricular leukomalacia. *Brain and Development* **31**(9): 641–648. doi: 10.1016/j.braindev.2008.10.008

Kalteren WS, Horst HJ ter, Heijer AE den, Vetten L de, Kooi EMW, Bos AF. 2018. Perinatal anemia is associated with neonatal and nNeurodevelopmental outcomes in infants with moderate to severe perinatal asphyxia. *Neonatology* **114**(4): 315. doi: 10.1159/000490369

Kerr CWH, Bishop GA. 1991. Topographical organization in the origin of serotoninergic projections to different regions of the cat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* **304**(3): 502–515. doi: 10.1002/cne.903040313

Khan A, Qurashi M, Kwiatkowski K, Cates D, Rigatto H. 2005. Measurement of the CO_2 apneic threshold in newborn infants: possible relevance for periodic breathing and apnea. *Journal of Applied Physiology* **98**(4): 1171–1176. doi: 10.1152/japplphysiol.00574.2003

Kim N-G, Lee H, Son E, Kwon O-Y, Park J-Y, Park J-H, Jae Cho G, Sung Choi W, Suk K. 2003. Hypoxic induction of caspase-11/caspase-1/interleukin-1β in brain microglia. *Molecular Brain Research* **114**(2): 107–114. doi: 10.1016/S0169-328X(03)00135-9

Kimura H, Okamoto K, Sakai Y. 1985. Pharmacological evidence for L-aspartate as the neurotransmitter of cerebellar climbing fibres in the guinea-pig. *J Physiol* **365**: 103–119.

Knickerbocker DL, Lutz PL. 2001. Slow ATP loss and the defense of ion homeostasis in the anoxic frog brain. *The Journal of experimental biology* **204**(Pt): 3547–3551.

Komuro H, Yacubova Ellada, Yacubova Elina, Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* **21**(2): 527–540. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00527.2001

Koos BJ, Mason BA, Punla O, Adinolfi AM. 1994. Hypoxic inhibition of breathing in fetal sheep: relationship to brain adenosine concentrations. *Journal of Applied Physiology* **77**(6): 2734–2739. doi: 10.1152/jappl.1994.77.6.2734

Lackey EP, Heck DH, Sillitoe RV. 2018. Recent advances in understanding the mechanisms of cerebellar granule cell development and function and their contribution to behavior. *F1000Res* **7**. doi: 10.12688/f1000research.15021.1

Lagarde J, Hantkie O, Hajjioui A, Yelnik A. 2009. Neuropsychological disorders induced by cerebellar damage. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* **52**(4): 360–370. doi: 10.1016/j.rehab.2009.02.002

Lahiri S, Ehleben W, Acker H. 1999. Chemoreceptor discharges and cytochrome redox changes of the rat carotid body: Role of heme ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(16): 9427–9432. doi: 10.1073/pnas.96.16.9427

Lainé J, Axelrad H. 1994. The candelabrum cell: A new interneuron in the cerebellar cortex: Cerebellar cortex candelabrum interneuron. *J Comp Neurol* **339**(2): 159–173. doi: 10.1002/cne.903390202

Lainé J, Axelrad H. 1998. Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex: *NeuroReport* **9**(10): 2399–2403. doi: 10.1097/00001756-199807130-00045

Lalonde R, Strazielle C. 2003. The effects of cerebellar damage on maze learning in animals. *Cerebellum* **2**(4): 300–309. doi: 10.1080/14734220310017456

Lang KJD, Kappel A, Goodall GJ. 2002. Hypoxia-inducible factor-1α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. Wickens MP, editor. *MBoC* **13**(5): 1792–1801. doi: 10.1091/mbc.02-02-0017

Larsell O. 1937. The cerebellum: a review and interpretation. *Arch NeurPsych* **38**(3): 580. doi: 10.1001/archneurpsyc.1937.02260210146011

Larsell O. 1952. The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* **97**(2): 281–356. doi: 10.1002/cne.900970204

Lavond DG. 2002. Role of the nuclei in eyeblink conditioning. *Annals NY Acad Sci* **978**(1 THE CEREBELLU): 93–105. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb07558.x

Lecoq J, Parpaleix A, Roussakis E, Ducros M, Houssen YG, Vinogradov SA, Charpak S. 2011. Simultaneous two-photon imaging of oxygen and blood flow in deep cerebral vessels. *Nat Med* **17**(7): 893–898. doi: 10.1038/nm.2394

Lee DS, Badr MS, Mateika JH. 2009. Progressive augmentation and ventilatory long-term facilitation are enhanced in sleep apnoea patients and are mitigated by antioxidant administration. *J Physiol* **587**(Pt 22): 5451–5467. doi: 10.1113/jphysiol.2009.178053

Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, Nitsch R, Weber JR. 2008. A vicious cycle involving rRelease of heat shock protein 60 from injured cells and activation of Toll-Like Receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *Journal of Neuroscience* **28**(10): 2320–2331. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4760-07.2008

Lemkey-Johnston N, Larramendi LMH. 1968. Morphological characteristics of mouse stellate and basket cells and their neuroglial envelope: An electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology* **134**(1): 39–71. doi: 10.1002/cne.901340105

Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldipur P, Hatten ME, et al. 2016. Consensus paper: Cerebellar development. *Cerebellum* **15**(6): 789–828. doi: 10.1007/s12311-015-0724-2

Li RC, Row BW, Kheirandish L, Brittian KR, Gozal E, Guo SZ, Sachleben LR, Gozal D. 2004. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiol Dis* **17**(1): 44–53. doi: 10.1016/j.nbd.2004.05.006

Lim DC, Pack AI. 2014. Obstructive sleep apnea and cognitive impairment: Addressing the blood–brain barrier. *Sleep Medicine Reviews* **18**(1): 35–48. doi: 10.1016/j.smrv.2012.12.003

Liu F, Zhang Z, Lin X, Teng G, Meng H, Yu T, Fang F, Zang F, Li Z, Liu S. 2011. Development of the human fetal cerebellum in the second trimester: a post mortem magnetic resonance imaging evaluation. *J Anat* **219**(5): 582–588. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01418.x

Liu J, Bu W, Shi J. 2017. Chemical design and synthesis of functionalized probes for imaging and treating tumor hypoxia. *Chem Rev* **117**(9): 6160–6224. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00525

Logan GD. 1985. Executive control of thought and action. *Acta Psychologica* **60**(2–3): 193–210. doi: 10.1016/0001-6918(85)90055-1

Lupo M, Troisi E, Chiricozzi FR, Clausi S, Molinari M, Leggio M. 2015. Inability to process negative emotions in cerebellar damage: a functional transcranial doppler sonographic study. *Cerebellum* **14**(6): 663–669. doi: 10.1007/s12311-015-0662-z

Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. 1997. G protein-coupled inwardly rectifying K+ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* **19**(3): 687–695. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80381-5

Maeda H, Maeda T, Mizuno K. 2012. Absorption and fluorescence spectroscopic properties of 1- and 1,4-silyl-substituted naphthalene derivatives. *Molecules* **17**(5): 5108–5125. doi: 10.3390/molecules17055108

Mak M, Tyburski E, Madany Ł, Sokołowski A, Samochowiec A. 2016. Executive function deficits in patients after cerebellar neurosurgery. *J Int Neuropsychol Soc* **22**(1): 47–57. doi: 10.1017/S1355617715001174

Mann-Metzerand P, Yarom Y. 2000. Electrotonic coupling synchronizes interneuron activity in the cerebellar cortex. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier. p. 115–122. doi: 10.1016/S0079-6123(00)24012-0

Mapelli L, Rossi P, Nieus T, D'Angelo E. 2009. Tonic activation of $GABA_B$ receptors reduces release probability at inhibitory connections in the cerebellar glomerulus. *Journal of Neurophysiology* **101**(6): 3089–3099. doi: 10.1152/jn.91190.2008

Marfurt CF, Rajchert DM. 1991. Trigeminal primary afferent projections to non-trigeminal areas of the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **303**(3): 489–511. doi: 10.1002/cne.903030313

Marien P, Engelborghs S, Pickut BA, De Deyn PP. 2000. Aphasia following cerebellar damage: fact or fallacy? *Journal of Neurolinguistics* **13**(2–3): 145–171. doi: 10.1016/S0911-6044(00)00009-9

Martin RJ, Okken A, Rubin D. 1979. Arterial oxygen tension during active and quiet sleep in the normal neonate. *The Journal of Pediatrics* **94**(2): 271–274. doi: 10.1016/S0022-3476(79)80842-2

Martinez S, Crossley PH, Cobos I, Rubenstein JL, Martin GR. 1999. FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* **126**(6): 1189–1200.

Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Rutherford MA, Cowan FM. 2010. Outcomes after central grey matter injury in term perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development* **86**(11): 675–682. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.08.013

Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M. 2015. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci* **8**. doi: 10.3389/fncel.2014.00450

Mayer CA, Haxhiu MA, Martin RJ, Wilson CG. 2006. Adenosine A_{2A} receptors mediate GABAergic inhibition of respiration in immature rats. *Journal of Applied Physiology* **100**(1): 91–97. doi: 10.1152/japplphysiol.00459.2005

McMahon AP, Joyner AL, Bradley A, McMahon JA. 1992. The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1−Wnt-1− mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**(4): 581–595. doi: 10.1016/0092-8674(92)90222-X

Mehrkanoon S, Boonstra TW, Breakspear M, Hinder M, Summers JJ. 2016. Upregulation of cortico-cerebellar functional connectivity after motor learning. *NeuroImage* **128**: 252–263. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.12.052

Melani A, Corti F, Cellai L, Giuliana Vannucchi M, Pedata F. 2014. Low doses of the selective adenosine A2A receptor agonist CGS21680 are protective in a rat model of transient cerebral ischemia. *Brain Research* **1551**: 59–72. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.014

Mertz K, Koscheck T, Schilling K. 2000. Brain-derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells: an in vitro study. *Neuroscience* **97**(2): 303–310. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00585-0

Michiels C. 2004. Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American Journal of Pathology* **164**(6): 1875–1882. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63747-9

Miller MJ, Haxhiu MA, Haxhiu-Poskurica B, Dreshaj IA, DiFiore JM, Martin RJ. 2000. Recurrent hypoxic exposure and reflex responses during development in the piglet. *Respiration Physiology* **123**(1–2): 51–61. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00149-3

Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K, Ogawa M. 1997. Regulation of Purkinje cell alignment by reelin as revealed with CR-50 antibody. *J Neurosci* **17**(10): 3599–3609. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-10-03599.1997

Molinari M, Leggio MG. 2007. Cerebellar information processing and visuospatial functions. *MCER* **6**(3): 214–220. doi: 10.1080/14734220701230870

Molinari M, Petrosini L, Misciagna S, Leggio M. 2004. Visuospatial abilities in cerebellar disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**(2): 235–240.

Moriette G, Lescure S, El Ayoubi M, Lopez E. 2010. Apnées du prématuré : données récentes. *Archives de Pédiatrie* **17**(2): 186–190. doi: 10.1016/j.arcped.2009.09.016

Moulton EA, Schmahmann JD, Becerra L, Borsook D. 2010. The cerebellum and pain: Passive integrator or active participator? *Brain Research Reviews* **65**(1): 14–27. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.005

Mugnaini E, Floris A. 1994. The unipolar brush cell: A neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* **339**(2): 174–180. doi: 10.1002/cne.903390203

Mugnaini E, Floris A, Wright-Goss M. 1994. Extraordinary synapses of the unipolar brush cell: An electron microscopic study in the rat cerebellum. *Synapse* **16**(4): 284–311. doi: 10.1002/syn.890160406

Mugnaini E, Sekerkova G, Martina M. 2011. The unipolar brush cell: A remarkable neuron finally receiving the deserved attention. *Brain Res Rev* **66**(1–2): 220–245. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.10.001

Murdoch S, Shah P, Jampana R. 2016. The Guillain-Mollaret triangle in action. *Pract Neurol* **16**(3): 243–246. doi: 10.1136/practneurol-2015-001142

Mürner-Lavanchy IM, Doyle LW, Schmidt B, Roberts RS, Asztalos EV, Costantini L, Davis PG, Dewey D, D'Ilario J, Grunau RE, et al. 2018. Neurobehavioral outcomes 11 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *Pediatrics* **141**(5). doi: 10.1542/peds.2017-4047

Naidich TP, Duvernoy HM, Delman BN, Sorensen AG, Kollias SS, Haacke EM. 2009. *Duvernoy's Atlas of the Human Brain Stem and Cerebellum: High-Field MRI, Surface Anatomy, Internal Structure, Vascularization and 3D Sectional Anatomy*. Wien: Springer-Verlag. Available at https://www.springer.com/gp/book/9783211739716. Accessed 2019 Sep 1.

Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E, Sato T. 2005. Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Research Reviews* **49**(2): 120–126. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.10.005

Nalivaeva NN, Turner AJ, Zhuravin IA. 2018. Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration. *Front Neurosci* **12**: 825. doi: 10.3389/fnins.2018.00825

Nanduri J, Prabhakar NR. 2015. Epigenetic regulation of carotid body oxygen sensing: Clinical implications. *Adv Exp Med Biol* **860**: 1–8. doi: 10.1007/978-3-319-18440-1_1

Napper RMA, Harvey RJ. 1988. Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **274**(2): 168–177. doi: 10.1002/cne.902740204

Nasiell J, Papadogiannakis N, Löf E, Elofsson F, Hallberg B. 2016. Hypoxic ischemic encephalopathy in newborns linked to placental and umbilical cord abnormalities. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* **29**(5): 721–726. doi: 10.3109/14767058.2015.1015984

Neau J-Ph, Anllo EA, Bonnaud V, Ingrand P, Gil R. 2000. Neuropsychological disturbances in cerebellar infarcts. *Acta Neurol Scand* **102**(6): 363–370. doi: 10.1034/j.1600-0404.2000.102006363.x

Nichelli P. 1996. Perceptual timing in cerebellar degeneration. *Neuropsychologia* **34**(9): 863–871. doi: 10.1016/0028-3932(96)00001-2

Nieuwenhuys R, Voogd J, Huijzen C van. 2008. *The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas*. 4th ed. Steinkopff-Verlag Heidelberg. Available at https://www.springer.com/gp/book/9783540346845. Accessed 2019 Sep 1.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JND, Helmchen F. 2004. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* **1**(1): 31–37. doi: 10.1038/nmeth706

Nunn A, Linder K, Strauss HW. 1995. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med* **22**(3): 265–280. doi: 10.1007/BF01081524

Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. 1998. Segregation of different $GABA_A$ receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* **18**(5): 1693–1703. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-05-01693.1998

Okafuji T, Funahashi J, Nakamura H. 1999. Roles of Pax-2 in initiation of the chick tectal development. *Developmental Brain Research* **116**(1): 41–49. doi: 10.1016/S0165-3806(99)00073-5

O'Kelly I, Lewis A, Peers C, Kemp PJ. 2000. O_2 sensing by airway chemoreceptor-derived cells: Protein kinase C activation reveals functional evidence for involvement of NADPH oxidase. *J Biol Chem* **275**(11): 7684–7692. doi: 10.1074/jbc.275.11.7684

Olsson T, Cronberg T, Rytter A, Asztely F, Fredholm BB, Smith M-L, Wieloch T. 2004. Deletion of the adenosine A1 receptor gene does not alter neuronal damage following ischaemia in vivo or in vitro. *Eur J Neurosci* **20**(5): 1197–1204. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03564.x

Oorschot DE, Voss L, Covey MV, Goddard L, Huang W, Birchall P, Bilkey DK, Kohe SE. 2013. Spectrum of short- and long-term brain pathology and long-term behavioral deficits in male repeated hypoxic rats closely resembling human extreme prematurity. *Journal of Neuroscience* **33**(29): 11863–11877. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0342-12.2013

Oscarsson O. 1965. Functional organization of the spino- and cuneocerebellar tracts. *Physiological Reviews* **45**(3): 495–522. doi: 10.1152/physrev.1965.45.3.495

Ottersen OP, Davanger S, Storm-Mathisen J. 1987. Glycine-like immunoreactivity in the cerebellum of rat and Senegalese baboon, Papio papio: a comparison with the distribution of GABA-like immunoreactivity and with [3H]glycine and [3H]GABA uptake. *Exp Brain Res* **66**(1). doi: 10.1007/BF00236216

Palay SL, Chan-Palay V. 1974. *Cerebellar Cortex: Cytology and Organization*. Springer.

Panula P, Takagi H, Inagaki N, Yamatodani A, Tohyama M, Wada H, Kotilainen E. 1993. Histamine-containing nerve fibers innervate human cerebellum. *Neuroscience Letters* **160**(1): 53–56. doi: 10.1016/0304-3940(93)90915-8

Papkovsky DB, Dmitriev RI. 2013. Biological detection by optical oxygen sensing. *Chem Soc Rev* **42**(22): 8700. doi: 10.1039/c3cs60131e

Park J-Y, Gu B-M, Kang D-H, Shin Y-W, Choi C-H, Lee J-M, Kwon JS. 2010. Integration of cross-modal emotional information in the human brain: An fMRI study. *Cortex* **46**(2): 161–169. doi: 10.1016/j.cortex.2008.06.008

Park SY, Lee H, Hur J, Kim SY, Kim H, Park J-H, Cha S, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, et al. 2002. Hypoxia induces nitric oxide production in mouse microglia via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular Brain Research* **107**(1): 9–16. doi: 10.1016/S0169-328X(02)00421-7

Park TS, Van Wylen DGL, Rubio R, Berne RM. 1987. Increased brain interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia in newborn Piglet. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**(2): 178–183. doi: 10.1038/jcbfm.1987.41

Parkinson FE, Sinclair CJD, Othman T, Haughey NJ, Geiger JD. 2002. Differences between rat primary cortical neurons and astrocytes in purine release evoked by ischemic conditions. *Neuropharmacology* **43**(5): 836–846. doi: 10.1016/S0028-3908(02)00083-7

Pascual M, Abasolo I, Mingorance-Le Meur A, Martinez A, Del Rio JA, Wright CVE, Real FX, Soriano E. 2007. Cerebellar GABAergic progenitors adopt an external granule cell-like phenotype in the absence of Ptf1a transcription factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(12): 5193–5198. doi: 10.1073/pnas.0605699104

Peers C, Kemp PJ. 2001. Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors. *Respir Res* **2**(3): 145–149. doi: 10.1186/rr51

Pellionisz A, Szenta´gothai J. 1973. Dynamic single unit simulation of a realistic cerebellar network model. *Brain Research* **49**(1): 83–99. doi: 10.1016/0006-8993(73)90403-4

Peña F, Ramirez J-M. 2005. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Molecular Neurobiology* **32**(3): 251–284. doi: 10.1385/MN:32:3:251

Peng Y, Kline DD, Dick TE, Prabhakar NR. 2001. Chronic intermittent hypdxia enhances carotid body chemoreceptor response to low oxygen. In: Poon C-S, Kazemi H, editors. *Frontiers in Modeling and Control of Breathing*. Boston, MA: Springer US. p. 33–38. doi: 10.1007/978-1-4615-1375-9_5

Peretz I, Zatorre RJ. 2005. Brain organization for music processing. *Annual review of psychology* **56**: 89–114. doi: 10.1146/annurev.psych.56.091103.070225

Peter CS, Sprodowski N, Bohnhorst B, Silny J, Poets CF. 2002. Gastroesophageal reflux and apnea of prematurity: No temporal relationship. *PEDIATRICS* **109**(1): 8–11. doi: 10.1542/peds.109.1.8

Petrosini L. 1998. The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? *Progress in Neurobiology* **56**(2): 191–210. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00036-7

Peyronnet J, Roux JC, Mamet J, Perrin D, Lachuer J, Pequignot JM, Dalmaz Y. 2007. Developmental plasticity of the carotid chemoafferent pathway in rats that are hypoxic during the prenatal period: Chemoafferent pathway plasticity and prenatal hypoxia. *European Journal of Neuroscience* **26**(10): 2865–2872. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05884.x

Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, et al. 2013. Development of Azo-Based Fluorescent Probes to Detect Different Levels of Hypoxia. *Angew Chem Int Ed* **52**(49): 13028–13032. doi: 10.1002/anie.201305784

Pichitpornchai C, Rawson JA, Rees S. 1994. Morphology of parallel fibres in the cerebellar cortex of the rat: An experimental light and electron microscopic study with biocytin. *J Comp Neurol* **342**(2): 206–220. doi: 10.1002/cne.903420205

Pichon S, Kell CA. 2013. Affective and sensorimotor components of emotional prosody generation. *Journal of Neuroscience* **33**(4): 1640–1650. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3530-12.2013

Pillekamp F, Hermann C, Keller T, von Gontard A, Kribs A, Roth B. 2007. Factors influencing apnea and bradycardia of prematurity – implications for neurodevelopment. *Neonatology* **91**(3): 155–161. doi: 10.1159/000097446

Pineau I, Lacroix S. 2009. Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia* **57**(4): 351–361. doi: 10.1002/glia.20763

Ploghaus A. 1999. Dissociating pain from its anticipation in the human brain. *Science* **284**(5422): 1979–1981. doi: 10.1126/science.284.5422.1979

Poets CF. 2010. Apnea of prematurity: What can observational studies tell us about pathophysiology? *Sleep Medicine* **11**(7): 701–707. doi: 10.1016/j.sleep.2009.11.016

Poets CF, Stebbens VA, Samuels MP, Southall DP. 1993. The relationship between bradycardia, apnea, and hypoxemia in preterm infants. *Pediatr Res* **34**(2): 144–147. doi: 10.1203/00006450-199308000-00007

Prabhakar NR. 1999. NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. *Respiration Physiology* **115**(2): 161–168. doi: 10.1016/S0034-5687(99)00019-5

Praud J-P. 2010. Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatric Respiratory Reviews* **11**(4): 208–212. doi: 10.1016/j.prrv.2010.07.001

Rahimi-Balaei M, Afsharinezhad P, Bailey K, Buchok M, Yeganeh B, Marzban H. 2015. Embryonic stages in cerebellar afferent development. *cerebellum ataxias* **2**(1): 7. doi: 10.1186/s40673-015-0026-y

Rahimi-Balaei M, Bergen H, Kong J, Marzban H. 2018. Neuronal migration during development of the cerebellum. *Front Cell Neurosci* **12**. doi: 10.3389/fncel.2018.00484

Ramnani N. 2006. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* **7**(7): 511–522. doi: 10.1038/nrn1953

Ramón y Cajal S. 1909. *Histologie Du Système Nerveux de l'homme et Des Vertébrés.* Ed. française rev. & mise à jour par l'auteur, tr. de l'espagnol par L. Azoulay. Paris : Maloine,. Available at https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/48637.

Ravizza SM, McCormick CA, Schlerf JE, Justus T, Ivry RB, Fiez JA. 2006. Cerebellar damage produces selective deficits in verbal working memory. *Brain* **129**(2): 306–320. doi: 10.1093/brain/awh685

Restuccia D, Marca GD, Valeriani M, Leggio MG, Molinari M. 2006. Cerebellar damage impairs detection of somatosensory input changes. A somatosensory mismatch-negativity study. *Brain* **130**(1): 276–287. doi: 10.1093/brain/awl236

Rhoton AL. 2000. The posterior fossa veins. *Neurosurgery* **47**(suppl_3): S69–S92. doi: 10.1097/00006123-200009001-00012

Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. 2008. NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature* **453**(7196): 807–811. doi: 10.1038/nature06905

Rolfe DF, Brown GC. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* **77**(3): 731–758. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.731

Rossi DJ, Hamann M. 1998. Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity α6 subunit GABAA receptors and glomerular geometry. *Neuron* **20**(4): 783–795. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81016-8

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**(6767): 316–321. doi: 10.1038/35002090

Royer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J-C, Peyronnet J, Mamet J, Pequignot J-M, Dalmaz Y. 2000. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Research* **856**(1–2): 119–128. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02365-3

Rudolph R, Jahn HM, Courjaret R, Messemer N, Kirchhoff F, Deitmer JW. 2016. The inhibitory input to mouse cerebellar Purkinje cells is reciprocally modulated by Bergmann glial P2Y1 and AMPA receptor signaling: Modulation of inhibitory input to Purkinje cells. *Glia* **64**(7): 1265–1280. doi: 10.1002/glia.22999

Rudolphi KA, Keil M, Hinze H-J. 1987. Effect of theophylline on ischemically induced hippocampal damage in Mongolian Gerbils: a behavioral and histopathological study. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**(1): 74–81. doi: 10.1038/jcbfm.1987.11

Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, Caroni P. 2011. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature* **473**(7348): 514–518. doi: 10.1038/nature09946

Ruigrok TJH, Sillitoe RV, Voogd J. 2015. Chapter 9 - Cerebellum and cerebellar connections. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press. p. 133–205. doi: 10.1016/B978-0-12-374245-2.00009-7

Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. 2005. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* **112**(17): 2660–2667. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556746

Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C. 2002. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(12): 8406–8411. doi: 10.1073/pnas.112660399

Sacchetti B, Sacco T, Strata P. 2007. Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories: Brain structures and long-term fear memory. *European Journal of Neuroscience* **25**(9): 2875–2884. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05508.x

Sacchetti B, Scelfo B, Tempia F, Strata P. 2004. Long-term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning. *Neuron* **42**(6): 973–982. doi: 10.1016/j.neuron.2004.05.012

Sadakata T, Kakegawa W, Mizoguchi A, Washida M, Katoh-Semba R, Shutoh F, Okamoto T, Nakashima H, Kimura K, Tanaka M, et al. 2007. Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci* **27**(10): 2472–2482. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2279-06.2007

Sathyanesan A, Kundu S, Abbah J, Gallo V. 2018. Neonatal brain injury causes cerebellar learning deficits and Purkinje cell dysfunction. *Nat Commun* **9**(1): 3235. doi: 10.1038/s41467-018-05656-w

Savoiardo M, Bracchi M, Passerini A, Visciani A. 1987. The vascular territories in the cerebellum and brainstem: CT and MR study. *AJNR Am J Neuroradiol* **8**(2): 199–209.

Scelfo B, Sacchetti B, Strata P. 2008. Learning-related long-term potentiation of inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(2): 769–774. doi: 10.1073/pnas.0706342105

Schell MJ, Brady RO, Molliver ME, Snyder SH. 1997. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* **17**(5): 1604–1615.

Scherz-Shouval R, Elazar Z. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology* **17**(9): 422–427. doi: 10.1016/j.tcb.2007.07.009

Schilling K, Oberdick J, Rossi F, Baader SL. 2008. Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol* **130**(4): 601–615. doi: 10.1007/s00418-008-0483-y

Schmahmann JD. 2004. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive aAffective syndrome. *JNP* **16**(3): 367–378. doi: 10.1176/jnp.16.3.367

Schmahmann JD. 2019. The cerebellum and cognition. *Neuroscience Letters* **688**: 62–75. doi: 10.1016/j.neulet.2018.07.005

Schmahmann JD, Sherman JC. 1998. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* **121 (Pt 4)**: 561–579. doi: 10.1093/brain/121.4.561

Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W. 2006. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* **354**(20): 2112–2121. doi: 10.1056/NEJMoa054065

Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W. 2007. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* **357**(19): 1893–1902. doi: 10.1056/NEJMoa073679

Schroder K, Tschopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell* **140**(6): 821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040

Scremin AM, Scremin OU, Brechner T. 1980. Survival under hypoxia. Age dependence and effect of cholinergic drugs. *Stroke* **11**(5): 548–552. doi: 10.1161/01.STR.11.5.548

Seidlmayer LK, Juettner VV, Kettlewell S, Pavlov EV, Blatter LA, Dedkova EN. 2015. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia–reperfusion: contributions of Ca2+, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc Res* **106**(2): 237–248. doi: 10.1093/cvr/cvv097

Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **269**(38): 23757–23763.

Shepherd GM, editor. 2004. *The Synaptic Organization of the Brain*. Fifth Edition. Oxford, New York: Oxford University Press.

Sillitoe RV, Fu Y, Watson C. 2012. Cerebellum. In: *The Mouse Nervous System*. Elsevier. p. 360–397. doi: 10.1016/B978-0-12-369497-3.10011-1

Silver RA, Traynelis SF, Cull-Candy SG. 1992. Rapid-time-course miniature and evoked excitatory currents at cerebellar synapses in situ. *Nature* **355**(6356): 163–166. doi: 10.1038/355163a0

Silveri M. 1998. Verbal short-term store-rehearsal system and the cerebellum. Evidence from a patient with a right cerebellar lesion. *Brain* **121**(11): 2175–2187. doi: 10.1093/brain/121.11.2175

Silveri MC, Leggio MG, Molinari M. 1994. The cerebellum contributes to linguistic production: a case of agrammatic speech following a right cerebellar lesion. *Neurology* **44**(11): 2047–2050. doi: 10.1212/wnl.44.11.2047

Singh DK, Ling E-A, Kaur C. 2018. Hypoxia and myelination deficits in the developing brain. *Int J Dev Neurosci* **70**: 3–11. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.06.012

Smith SMC, Friedle SA, Watters JJ. 2013. Chronic intermittent hypoxia exerts CNS region-specific effects on rat microglial inflammatory and TLR4 gene expression. *PLoS ONE* **8**(12): e81584. doi: 10.1371/journal.pone.0081584

Sokolovsky N, Cook A, Hunt H, Giunti P, Cipolotti L. 2010. A preliminary characterisation of cognition and social cognition in spinocerebellar ataxia types 2, 1, and 7. *Behavioural Neurology* **23**(1–2): 17–29. doi: 10.1155/2010/395045

Song S, Tan J, Miao Y, Zhang Q. 2017. Effect of different levels of intermittent hypoxia on autophagy of hippocampal neurons. *Sleep Breath* **21**(3): 791–798. doi: 10.1007/s11325-017-1512-7

Sottile V, Li M, Scotting PJ. 2006. Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Research* **1099**(1): 8–17. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.127

Spandou E, Zanelli S, Taylor ML, Legido A, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M, Katsetos CD. 1999. Effect of hypoxia on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the brain of term fetal Guinea Pig. Nature Publishing Group. doi: 10.1203/00006450-199904020-00420

Spemann H, Mangold H. 2003. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol* **45**(1): 13–38. doi: 10.1387/ijdb.11291841

Srinivasan L, Allsop J, Counsell SJ, Boardman JP, Edwards AD, Rutherford M. 2006. Smaller Cerebellar Volumes in Very Preterm Infants at Term-Equivalent Age are Associated with the Presence of Supratentorial Lesions. *American Journal of Neuroradiology* **27**(3): 573–579.

Steggerda SJ, Leijser LM, Wiggers-de Bruïne FT, van der Grond J, Walther FJ, van Wezel-Meijler G. 2009. Cerebellar Injury in Preterm Infants: Incidence and Findings on US and MR Images. *Radiology* **252**(1): 190–199. doi: 10.1148/radiol.2521081525

Stock C, Teyssier G, Pichot V, Goffaux P, Barthelemy J-C, Patural H. 2010. Autonomic dysfunction with early respiratory syncytial virus-related infection. *Autonomic Neuroscience* **156**(1–2): 90–95. doi: 10.1016/j.autneu.2010.03.012

Stoodley CJ, Schmahmann JD. 2010. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex* **46**(7): 831–844. doi: 10.1016/j.cortex.2009.11.008

Strahlendorf JC, Hubbard GD. 1983. Serotonergic interactions with rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Research Bulletin* **11**(2): 265–269. doi: 10.1016/0361-9230(83)90202-2

Strange EL, Saeed N, Cowan FM, Edwards AD, Rutherford MA. 2004. MR imaging quantification of cerebellar growth following hypoxic-ischemic injury to the neonatal brain. *American Journal of Neuroradiology* **25**(3): 463–468.

Sudarov A, Turnbull RK, Kim EJ, Lebel-Potter M, Guillemot F, Joyner AL. 2011. Ascl1 genetics reveals insights into cerebellum local circuit assembly. *J Neurosci* **31**(30): 11055–11069. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0479-11.2011

Sultan F, Bower JM. 1998. Quantitative Golgi study of the rat cerebellar molecular layer interneurons using principal component analysis. *Journal of Comparative Neurology* **393**(3): 353–373. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980413)393:3<353::AID-CNE7>3.0.CO;2-0

Summers BA, Overholt JL, Prabhakar NR. 1999. Nitric oxide inhibits L-Type Ca^{2+} current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism. *Journal of Neurophysiology* **81**(4): 1449–1457. doi: 10.1152/jn.1999.81.4.1449

Sun G-Z, Gao F-F, Zhao Z-M, Sun H, Xu W, Wu L-W, He Y-C. 2016. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the penumbra aggravates secondary damage in rats with traumatic brain injury. *Neural Regen Res* **11**(8): 1260–1266. doi: 10.4103/1673-5374.189190

Takayasu Y. 2005. Differential roles of glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *Journal of Neuroscience* **25**(38): 8788–8793. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1020-05.2005

Thach BT. 2008. Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *Journal of Applied Physiology* **104**(6): 1828–1834. doi: 10.1152/japplphysiol.01288.2007

Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. 2009. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Report* **14**(3): 102–108. doi: 10.1179/135100009X392566

Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, Kitahama Y, Ueki M, Maekawa N, Sakamoto H, Gassmann M, Kageyama R, Ueda N, et al. 2003. Defective brain development in mice lacking the Hif-1 gene in neural cells. *Molecular and Cellular Biology* **23**(19): 6739–6749. doi: 10.1128/MCB.23.19.6739-6749.2003

Torriero S, Oliveri M, Koch G, Gerfo EL, Salerno S, Petrosini L, Caltagirone C. 2007. Cortical networks of procedural learning: Evidence from cerebellar damage. *Neuropsychologia* **45**(6): 1208–1214. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2006.10.007

Tsan M-F, Gao B. 2004. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* **1**(4): 274–279.

Tsatmali M, Walcott EC, Makarenkova H, Crossin KL. 2006. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience* **33**(4): 345–357. doi: 10.1016/j.mcn.2006.08.005

Turner CP, Seli M, Ment L, Stewart W, Yan H, Johansson B, Fredholm BB, Blackburn M, Rivkees SA. 2003. A1 adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(20): 11718–11722. doi: 10.1073/pnas.1931975100

Turner CP, Yan H, Schwartz M, Othman T, Rivkees SA. 2002. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss: *Neuroreport* **13**(9): 1199–1204. doi: 10.1097/00001756-200207020-00026

Utz A, Thürling M, Ernst TM, Hermann A, Stark R, Wolf OT, Timmann D, Merz CJ. 2015. Cerebellar vermis contributes to the extinction of conditioned fear. *Neuroscience Letters* **604**: 173–177. doi: 10.1016/j.neulet.2015.07.026

Uusisaari M, Knöpfel T. 2010. GlyT2+ neurons in the lateral cerebellar nucleus. *Cerebellum* **9**(1): 42–55. doi: 10.1007/s12311-009-0137-1

Uusisaari M, Obata K, Knöpfel T. 2007. Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* **97**(1): 901–911. doi: 10.1152/jn.00974.2006

Uusisaari MY, Knöpfel T. 2013. Neurons of the deep cerebellar nuclei. In: Manto M, Schmahmann JD, Rossi F, Gruol DL, Koibuchi N, editors. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 1101–1110. doi: 10.1007/978-94-007-1333-8_46

Van Lommel A, Lauweryns JM, Berthoud HR. 1998. Pulmonary neuroepithelial bodies are innervated by vagal afferent nerves: an investigation with in vivo anterograde DiI tracing and confocal microscopy. *Anatomy and Embryology* **197**(4): 325–330. doi: 10.1007/s004290050142

Van Overwalle F, Baetens K, Mariën P, Vandekerckhove M. 2014. Social cognition and the cerebellum: A meta-analysis of over 350 fMRI studies. *NeuroImage* **86**: 554–572. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.09.033

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. 1991. Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O2 tension measurements. *Cancer Res* **51**(12): 3316–3322.

Vervaeke K, Lőrincz A, Gleeson P, Farinella M, Nusser Z, Silver RA. 2010. Rapid desynchronization of an electrically coupled interneuron network with sparse excitatory synaptic input. *Neuron* **67**(3–2): 435–451. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.028

Verzeletti A, Leide A, De Ferrari F. 2016. Perinatal asphyxia and medical professional liability: A case series. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* **6**(4): 347–350. doi: 10.1016/j.ejfs.2016.03.004

Vingerhoets G, de Lange FP, Vandemaele P, Deblaere K, Achten E. 2002. Motor imagery in mental rotation: An fMRI study. *NeuroImage* **17**(3): 1623–1633. doi: 10.1006/nimg.2002.1290

Vlasic V, Simakajornboon N, Gozal E, Gozal D. 2001. PDGF-β receptor expression in the dorsocaudal brainstem parallels hypoxic ventilatory depression in the developing rat. *Pediatr Res* **50**(2): 236–241. doi: 10.1203/00006450-200108000-00012

Volpe JJ. 2009. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J Child Neurol* **24**(9): 1085–1104. doi: 10.1177/0883073809338067

Voogd J, Shinoda Y, Ruigrok TJH, Sugihara I. 2013. Cerebellar nuclei and the inferior olivary nuclei: organization and connections. In: Manto M, Schmahmann JD, Rossi F, Gruol DL, Koibuchi N, editors. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 377–436. doi: 10.1007/978-94-007-1333-8_19

Vuillier F, Medeiros de Bustos É, Tatu L. 2011. Organisation fonctionnelle du cervelet : approche neuro-anatomique. *Revue Neurologique* **167**(5): 361–369. doi: 10.1016/j.neurol.2010.07.045

Wall M, Dale N. 2008. Activity-dependent release of adenosine: a critical re-evaluation of mechanism. *Curr Neuropharmacol* **6**(4): 329–337. doi: 10.2174/157015908787386087

Wallace VA. 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Current Biology* **9**(8): 445–448. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80195-X

Wang J-Y, Wang J. 2007. Hypoxia/Reoxygenation induces nitric oxide and TNF-alpha release from cultured microglia but not astrocytes of the rat. *The Chinese journal of physiology* **50**(3): 127–134.

Watanabe D, Nakanishi S. 2003. mGluR2 postsynaptically senses granule cell inputs at Golgi cell synapses. *Neuron* **39**(5): 821–829. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00530-0

Watanabe M, Kano M. 2011. Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells: Climbing fiber synapse elimination. *European Journal of Neuroscience* **34**(10): 1697–1710. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07894.x

Webb SJ, Sparks B-F, Friedman SD, Shaw DWW, Giedd J, Dawson G, Dager SR. 2009. Cerebellar vermal volumes and behavioral correlates in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging* **172**(1): 61–67. doi: 10.1016/j.pscychresns.2008.06.001

Weisbrod CJ, Minson CT, Joyner MJ, Halliwill JR. 2001. Effects of regional phentolamine on hypoxic vasodilatation in healthy humans. *The Journal of Physiology* **537**(2): 613–621. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.00613.x

Wellmann S, Bührer C, Schmitz T. 2015. Focal necrosis and disturbed myelination in the white matter of newborn infants: A tale of too much or too little oxygen. *Front Pediatr* **2**. doi: 10.3389/fped.2014.00143

Whiteside G, Doyle CA, Hunt SP, Munglani R. 1998. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy: Apoptosis in dorsal root ganglia. *European Journal of Neuroscience* **10**(11): 3400–3408. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00346.x

Wilson CG, Martin RJ, Jaber M, Abu-Shaweesh J, Jafri A, Haxhiu MA, Zaidi S. 2004. Adenosine A2A receptors interact with GABAergic pathways to modulate respiration in neonatal piglets. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **141**(2): 201–211. doi: 10.1016/j.resp.2004.04.012

Wilson CJ, Finch CE, Cohen HJ. 2002. Cytokines and cognition - The case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* **50**(12): 2041–2056. doi: 10.1046/j.1532-5415.2002.50619.x

Woodruff-Pak DS, Green JT, Levin SI, Meisler MH. 2006. Inactivation of sodium channel Scn8A (Nav1.6) in purkinje neurons impairs learning in Morris Water Maze and delay but not trace eyeblink classical conditioning. *Behavioral Neuroscience* **120**(2): 229–240. doi: 10.1037/0735-7044.120.2.229

Wylie DR, Gutiérrez-Ibáñez C, Gaede AH, Altshuler DL, Iwaniuk AN. 2018. Visual-cerebellar pathways and their roles in the control of avian flight. *Front Neurosci* **12**. doi: 10.3389/fnins.2018.00223

Xu Z, Wang B-R, Wang X, Kuang F, Duan X-L, Jiao X-Y, Ju G. 2006. ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase mediate iNOS-induced spinal neuron degeneration after acute traumatic spinal cord injury. *Life Sciences* **79**(20): 1895–1905. doi: 10.1016/j.lfs.2006.06.023

Yacubova E, Komuro H. 2002. Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochemistry and Biophysics* **37**: 213–234. doi: 10.1385/CBB:37:3:213

Yang Z-J, Wang B, Kwansa H, Heitmiller KD, Hong G, Carter EL, Jamrogowicz JL, Larson AC, Martin LJ, Koehler RC. 2013. Adenosine A_{2A} receptor contributes to ischemic brain damage in newborn Piglet. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**(10): 1612–1620. doi: 10.1038/jcbfm.2013.117

Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, Shiba T, Ogita K. 2010. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochemistry International* **56**(6–7): 740–746. doi: 10.1016/j.neuint.2009.11.018

Young JK, Dreshaj IA, Wilson CG, Martin RJ, Zaidi SIA, Haxhiu MA. 2005. An astrocyte toxin influences the pattern of breathing and the ventilatory response to hypercapnia in neonatal rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **147**(1): 19–30. doi: 10.1016/j.resp.2005.01.009

Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. 1990. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **259**(2): H281–H289. doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.2.H281

Yuasa S, Kitoh J, Oda S, Kawamura K. 1993. Obstructed migration of Purkinje cells in the developing cerebellum of the reeler mutant mouse. *Anat Embryol* **188**(4): 317–329. doi: 10.1007/bf00185941

Zaidi SIA, Jafri A, Martin RJ, Haxhiu MA. 2006. Adenosine A2A receptors are expressed by GABAergic neurons of medulla oblongata in developing rat. *Brain Research* **1071**(1): 42–53. doi: 10.1016/j.brainres.2005.11.077

Zhang D, Xiong W, Albensi BC, Parkinson FE. 2011. Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons regulates adenosine levels in physiological and hypoxic-ischemic conditions: Regulation of adenosine levels in ischemia. *Journal of Neurochemistry* **118**(1): 4–11. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07242.x

Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **283**(16): 10892–10903. doi: 10.1074/jbc.M800102200

Zhang J, Malik A, Choi HB, Ko RWY, Dissing-Olesen L, MacVicar BA. 2014. Microglial CR3 activation triggers long-term synaptic depression in the hippocampus via NADPH oxidase. *Neuron* **82**(1): 195–207. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.043

Zhang L, Wilson CG, Liu S, Haxhiu MA, Martin RJ. 2003. Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **136**(1): 25–37. doi: 10.1016/S1569-9048(03)00041-7

Zhang M, Zhong H, Vollmer C, Nurse CA. 2000. Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *The Journal of Physiology* **525**(1): 143–158. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00143.x

Zhang X, Gao R, Li Juan, Qi Y, Song X, Zhao L, Wang H, Pu Y, Xu K, Li Jinhua. 2010. A pharmacological activator of AMP-activated protein kinase protects hypoxic neurons in a concentration-dependent manner. *Neurochem Res* **35**(8): 1281–1289. doi: 10.1007/s11064-010-0186-3

Zhang Xin, Li Lixi, Zhang Xiaojie, Xie W, Li Liang, Yang D, Heng X, Du Y, Doody RS, Le W. 2013. Prenatal hypoxia may aggravate the cognitive impairment and Alzheimer's disease neuropathology in APPSwe/PS1A246E transgenic mice. *Neurobiology of Aging* **34**(3): 663–678. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.012

Zhang X-Y, Wang J-J, Zhu J-N. 2016. Cerebellar fastigial nucleus: from anatomic construction to physiological functions. *cerebellum ataxias* **3**(1): 9. doi: 10.1186/s40673-016-0047-1

Zhao J, Gonzalez F, Mu D. 2011. Apnea of prematurity: from cause to treatment. *Eur J Pediatr* **170**(9): 1097–1105. doi: 10.1007/s00431-011-1409-6

Zhu X, Dahlmans V, Thali R, Preisinger C, Viollet B, Voncken JW, Neumann D. 2016. AMP-activated protein kinase up-regulates mitogen-activated protein (MAP) kinase-interacting serine/threonine kinase 1a-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Biol Chem* **291**(33): 17020–17027. doi: 10.1074/jbc.C116.740498

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews* **94**(3): 909–950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013