HAL
open science

# Effets des acides gras polyinsaturés n-3 dans un modèle murin environnemental de troubles du spectre autistique

Valentine Turpin

## To cite this version:

Valentine Turpin. Effets des acides gras polyinsaturés n-3 dans un modèle murin environnemental de troubles du spectre autistique. Médecine humaine et pathologie. Université de Poitiers, 2022. Français. NNT : 2022POIT2288 . tel-03959638

**HAL Id: tel-03959638**

**https://theses.hal.science/tel-03959638**

Submitted on 27 Jan 2023

**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.

# THÈSE

Pour l'obtention du Grade de

**DOCTEURE DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**

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

École Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Neurosciences

Présentée par :

**Valentine TURPIN**

**********

# Effets des acides gras polyinsaturés n-3 dans un modèle murin environnemental de troubles du spectre autistique

**********

Directeur de Thèse : Pr. Mohamed JABER

**********

Soutenue le 10 novembre 2022

devant la Commission d'Examen

**********

## JURY

| | | |
|---|---|---|
| Dr Muriel KOEHL | Université de Bordeaux, INSERM U1215 | Rapportrice |
| Pr Rachel SHERRARD | Université Paris VI, CNRS UMR 8256 | Rapportrice |
| Dr Sophie LAYE | Université de Bordeaux, INRAE UMR 1286 | Examinatrice |
| Pr Michel AUDIFFREN | Université de Poitiers, CNRS UMR 7295 | Examinateur |
| Pr Mohamed JABER | Université de Poitiers, INSERM U1084 | Directeur de thèse |

# RÉSUMÉ

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux, touchant 3,7 hommes pour 1 femme en France, qui se traduisent principalement par des déficits persistants dans les comportements sociaux ainsi que par des comportements, intérêts et activités restreints et répétés.

L'exposition à des facteurs environnementaux, notamment durant la période périnatale, serait majoritairement impliquée dans l'étiologie des TSA. On retrouve parmi ces facteurs, des composés pharmacologiques comme l'acide valproïque (VPA) (Dépakine®), dont l'exposition *in utero* augmente la probabilité de développer des TSA. Le cervelet, par ses fonctions cognitives et motrices, représente l'une des structures les plus impliquées dans la physiopathologie des TSA par des modifications anatomiques, cellulaires et moléculaires chez des patients et modèles animaux de TSA. Chez des enfants diagnostiqués avec des TSA, une supplémentation en acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 (AGPI-LC n-3) sur plusieurs mois permet de réduire certains symptômes.

L'objectif de cette thèse a donc été de déterminer si une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3 en période périnatale pouvait protéger des symptômes de TSA induits par une exposition *in utero* au VPA chez la souris. Nous avons réalisé une étude longitudinale portant sur l'évolution des symptômes sociaux et moteurs ainsi que sur les corrélats cellulaires et moléculaires cérébelleux chez des souris mâles et femelles. Ces travaux ont permis de mettre en évidence qu'une alimentation équilibrée en AGPI n-3 et n-6 permet de protéger contre l'apparition de symptômes comportementaux, la perte de neurones cérébelleux et la dysbiose du microbiote intestinal.

# SUMMARY

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder affecting 3.7 men for every woman in France, which mainly result in persistent deficits in social behaviors as well as restricted and repeated behaviors, interests, and activities.

Exposure to environmental factors, especially during the perinatal period, are mainly involved in the etiology of ASD. These factors include pharmacological compounds such as valproic acid (VPA) (Dépakine®), which *in utero* exposure increases the risk to develop ASD. The cerebellum, through its cognitive and motor functions, represents one of the structures most involved in the pathophysiology of ASD at the anatomical, cellular, and molecular levels in both patients and animal models. Long-chain polyunsaturated fatty acids n-3 (LCPUFA n-3) supplementation over several months has been shown to reduce several ASD symptoms in children.

This thesis aim was to determine whether a diet supplemented with n-3 LCPUFA throughout the perinatal period could protect against ASD symptoms induced by *in utero* exposure to VPA in mice. We performed a longitudinal study on the evolution of social and motor symptoms as well as cerebellar cellular and molecular correlates in male and female mice. This work has demonstrated that a balanced diet of n-3 and n-6 PUFA protects against the appearance of behavioral symptoms, loss of cerebellar neurons and intestinal microbiota dysbiosis.

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Mohamed Jaber de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire des Neurosciences Expérimentales et Cliniques à Poitiers mais également de m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse.

Je remercie également Sophie Layé et Corinne Joffre pour leur aiguillage et leur expertise dans ce projet.

Un grand merci à Maxime Pichon, un collaborateur en or, sans qui l'aspect microbiote de ce projet de thèse n'aurait jamais abouti. Merci à lui pour sa patience, sa disponibilité et son sens de l'humour !

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de l'intérêt que chacun y a porté.

Merci à tous les membres de l'équipe 2 – Neurobiologie et Neuropharmacologie des Désordres Psychiatriques pour m'avoir accueillie en troisième année de thèse. Merci également à tous les membres de l'équipe 3 – Neurodéveloppement, Neuroadaptation, Neurodégénérescence pour m'avoir accompagnée lors de mes deux premières années de thèse. Je remercie particulièrement Éric pour m'avoir formée et m'avoir aidée en comportement animal. Un grand merci à Maureen pour m'avoir formée aux aspects cellulaires de mon projet. Merci à elle, mais aussi à Émilie et Virginie pour leur aide si précieuse en manips et à leur gentillesse. Merci à Anaïs pour les commandes relatives à Prébios. Merci à Jean-Emmanuel de m'avoir réintroduite au code sans m'en avoir dégoûtée ! Merci à Pauline pour m'avoir répété les objectifs de cette thèse durant cette troisième année. Merci à Maud pour m'avoir aidée à terminer ce projet dans les temps et pour son investissement sans failles. Tu le sais déjà mais je n'aurais pas pu rêver mieux comme stagiaire de Master 1 et Master 2 et je te souhaite le meilleur pour la suite !

Merci à Catherine et Marie-Laure pour leur aide technique tout au long de cette thèse et leur gentillesse.

Merci à Laurie, Marianne et Laetitia pour m'avoir aguillée dans mon activité d'enseignement complémentaire.

Merci à tout le personnel de Prébios pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie également les doctorants, et plus spécialement ceux avec qui j'ai commencé et terminé cette thèse : Stevenson, Mathieu, Maëlig et Anaïs. Nous nous sommes soutenus et cela m'a permis de finir cette thèse. Merci également à Manon, Thomas et Eloïse pour les petites pauses « défouloir » !

Merci à Sarah et Inès, mes chacals préférés, mes amies de master strasbourgeois. Merci d'avoir été là contre vents et marées, même à distance.
Merci à tous mes amis à travers le monde. Merci d'avoir été compréhensifs sur mes réponses tardives (ou absentes). Merci d'avoir été là, merci de m'avoir rappelé le plus important !
Merci à toute ma famille même si je sais que je n'ai ni donné ni pris assez de nouvelles. Un très grand merci à mes parents, sans lesquels je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui. Merci de m'avoir élevée avec ces valeurs qui font de moi une personne forte. Merci à ma sœur et mon frère de me ramener en enfance au besoin et d'être qui ils sont (même si vous m'appelez Jabba). Je vous aime.
Un immense merci à Mathieu, sans qui j'aurais lâché en deuxième année quand rien n'allait. Merci d'être là au quotidien, de me comprendre et de ne pas m'avoir lâchée non plus ! Je pars de ce laboratoire avec un doctorat et une personne en or à mes côtés.
J'aimerais terminer en remerciant Mamie Pitou et Papy Jean, mes plus grands supporters. J'aurais tellement aimé que vous soyez là. Je ne vous oublie pas. Cette thèse vous est dédiée.

# AVANT-PROPOS

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux qui se caractérisent par des difficultés d'interaction sociale et de communication ainsi que par des comportements et intérêts répétitifs et restreints (American Psychiatric Association 2013). Ces symptômes apparaissent dès l'enfance et persistent à l'âge adulte, souvent accompagnés de comorbidités variables comme des désordres gastro-intestinaux (GI) ou des troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) (Morris-Rosendahl & Crocq 2020; Sokolova et al. 2017).

L'augmentation du nombre de cas de TSA depuis les années 2000 s'explique en partie par une meilleure prise en charge des patients et à un diagnostic différentiel selon le pays mais surtout en grande partie par l'exposition à des facteurs environnementaux (Bourgeron 2015; Huguet et al. 2013). En effet, la pollution, les pesticides et la modification de l'alimentation, qui sont des caractéristiques de notre époque moderne, sont devenus des facteurs de prédisposition à diverses pathologies (Deng et al. 2015). Au regard des recommandations nutritionnelles, la consommation en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et n-6 est déséquilibrée en faveur de ces derniers dans la majorité du monde (Simopoulos 2011). Ce déséquilibre semble être associé à des pathologies liées à l'inflammation et au cerveau, puisqu'un déséquilibre nutritionnel en AGPI donne lieu à un déséquilibre dans la composition lipidique cérébrale (Simopoulos 2011).

La grossesse et plus particulièrement le troisième trimestre sont des périodes critiques où le cerveau du fœtus entre dans une phase de maturation exponentielle qui va perdurer lors de la période postnatale. De ce fait, l'exposition à des facteurs environnementaux pendant cette période augmente fortement le risque de pathologies neurodéveloppementales comme les TSA chez la descendance (Janssen & Kiliaan 2014).

Ces facteurs environnementaux peuvent être d'origine pharmacologique comme l'acide valproïque (VPA), utilisé en traitement de pathologies cérébrales comme l'épilepsie et les

troubles bipolaires. Lorsqu'il est utilisé pendant la grossesse, il augmente la probabilité de diagnostic de TSA chez la descendance chez l'Homme et l'animal (Bossu & Roux 2019; Christensen et al. 2013; Coste et al. 2020; Mabunga et al. 2015; Nicolini & Fahnestock 2018). C'est aussi lors de cette période cruciale que l'accrétion en acides gras va être la plus prononcée (Clandinin et al. 1992; Lauritzen 2001). De plus, une déficience en AGPI n-3 est associée à l'apparition de symptômes de TSA chez l'animal et chez l'Homme (van Elst et al. 2014). Ces résultats ont amené la proposition d'une approche nutritionnelle préventive ou corrective avec une supplémentation en AGPI n-3. Plusieurs études dans des modèles animaux génétiques et d'activation immunitaire maternelle (MIA) ont permis de mettre en évidence les bénéfices des AGPI n-3 et notamment des AGPI à longue chaîne n-3 (AGPI-LC n-3) comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (Alfawaz et al. 2018; Fortunato et al. 2017; Li et al. 2015; Pietropaolo et al. 2014; Weiser et al. 2016).

A l'heure actuelle, des études longitudinales investiguant le potentiel des différents types d'AGPI n-3 sur le modèle murin VPA sont manquantes. De plus, la vaste majorité des études s'intéressant aux TSA et aux thérapies nutritionnelles tendent à privilégier le cortex préfrontal et l'hippocampe, deux régions hautement enrichies en lipides et sensibles aux aspects neurodéveloppementaux (Fedorova & Salem 2006; Lafourcade et al. 2011; Moranis et al. 2012; Xiao et al. 2005). Nous avons ici choisi d'étudier le cervelet, région également enrichie en lipides et fortement myélinisée, dont les fonctions motrices et cognitives, de langage et d'apprentissage par exemple, sont perturbées chez les patients atteints de TSA (D'Mello & Stoodley 2015).

Par le biais d'une approche nutritionnelle, nous avons voulu ici déterminer les effets des AGPI n-3, qu'ils soient précurseurs ou à longue chaîne (AGPI-LC n-3), face à une exposition *in utero* au VPA. Notre hypothèse est qu'une alimentation équilibrée en AGPI n-6 et n-3, même si elle ne contient que des précurseurs, peut être suffisante pour protéger contre la grande

majorité des symptômes comportementaux, cellulaires et métaboliques dans le modèle murin d'exposition *in utero* au VPA.

Ce projet de thèse s'est révélé très ambitieux par le nombre de groupes expérimentaux (2 traitements, 2 alimentations, 2 sexes étudiés), par son aspect longitudinal (mères et descendance), par les paramètres analysés (comportement, histologie, profils lipidique, inflammatoire et microbien), mais aussi par le nombre de collaborateurs et interlocuteurs.

L'aspect nutritionnel de ce projet a bénéficié de la collaboration avec l'équipe Nutrimind du Dr Sophie Layé, au sein du laboratoire NutriNeurO, UMR 1286 INRAe de l'Université de Bordeaux. La composition des aliments, *i.e.* supplémenté en AGPI-LC n-3 et l'aliment ne contenant que des précurseurs AGPI n-3, a été étudiée avec attention et a nécessité de nombreux contacts avec l'entreprise SAFE, spécialisée dans l'alimentation pour animaux.

L'analyse de la composition en acides gras n-6 et n-3 dans le cervelet et le foie a été réalisée en collaboration avec l'équipe Nutrition et Signalisation Cellulaire du Dr Niyazi Acar, Œil, au sein du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 1324 INRAe, 6265 CNRS de l'Université de Bourgogne-Franche Comté, AgroSup Dijon.

L'aspect microbiome de ce projet a été réalisé avec la collaboration du Dr Maxime Pichon et du Pr Christophe Burucoa du laboratoire Pharmacologie des Agents Anti-Infectieux, INSERM U1070, au sein de l'Université de Poitiers.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article actuellement soumis dans un journal international à comité de lecture et présenté dans ce manuscrit. J'ai aussi contribué à d'autre projets au sein de l'Unité INSERM dans laquelle j'ai effectué ma thèse et qui ont donné lieu à une publication actuellement soumise également que je co-signe en seconde position. J'ai également participé à la rédaction d'une revue de la littérature faisant le lien entre le striatum, le cervelet et les TSA dont je suis co-première auteure et qui figure dans l'introduction du manuscrit.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion de participer à des congrès scientifiques nationaux et internationaux pour valoriser ces travaux. J'ai notamment pu présenter une grande partie des résultats de ce manuscrit aux Journées du Cervelet à Bordeaux en mars 2022 et aux journées NeuroDev organisées par l'Université de Bordeaux en mai 2022 ainsi qu'à la FENS à Paris en juillet 2022. En parallèle cette thèse, j'ai effectué une activité d'enseignement au sein de l'Université de Poitiers, au cours de laquelle j'ai pu enseigner à des étudiants en orthophonie ainsi que de licence en psychologie et en neurosciences, sur des thématiques de neuroanatomie, neuropharmacologie et neurodéveloppement.

# TABLE DES MATIÈRES

**LISTE DES FIGURES** ..... **1**

**LISTE DES TABLEAUX** ..... **1**

**LISTE DES ABRÉVIATIONS** ..... **3**

**INTRODUCTION** ..... **7**

**CHAPITRE 1 : LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE** ..... **8**

I. DEFINITION ..... 8
*A. Critères de diagnostic* ..... *10*
*B. Comorbidités* ..... *13*
a. Troubles moteurs ..... 16
b. Épidémiologie ..... 20
c. Étiologie ..... 22
II. LES MODELES ANIMAUX DE TSA ..... 34
*A. Modèles génétiques* ..... *36*
a. Shank3 ..... 37
b. Cntnap2 ..... 38
*B. Modèles environnementaux prénataux* ..... *39*
a. Acide polyinosinique-polycytidylique ..... 40
b. Acide valproïque ..... 42

**CHAPITRE 2 : LE CERVELET** ..... **48**

I. ROLE ET ANATOMIE FONCTIONNELLE DU CERVELET ..... 48
*A. Fonctions du cervelet* ..... *48*
*B. Morphologie et anatomie fonctionnelle* ..... *49*
a. Le cortex cérébelleux ..... 49
b. Les noyaux cérébelleux profonds ..... 51
*C. Organisation cellulaire du cervelet* ..... *53*
a. La couche granulaire ..... 53
b. La couche des cellules de Purkinje ..... 55
c. La couche moléculaire ..... 58
*D. Organisation cellulaire des noyaux cérébelleux profonds* ..... *58*
II. RESEAUX CEREBELLEUX ..... 59
*A. Afférences cérébelleuses* ..... *59*
*B. Efférences cérébelleuses* ..... *61*
*C. Réseaux cérébelleux internes* ..... *62*
*D. Physiologie du cervelet* ..... *65*
*E. Neurodéveloppement du cortex cérébelleux chez la souris* ..... *65*
*F. Implications du cervelet dans les TSA* ..... *71*

**CHAPITRE 3 : LES ACIDES GRAS POLYINSATURES** ..... **106**

I. GENERALITES SUR LES AGPI ..... 106
*A. Définition* ..... *106*
*B. Sources alimentaires et métabolisme des AGPI* ..... *108*
*C. Apports nutritionnels conseillés et études épidémiologiques de consommation* ..... *109*
*D. Mécanismes de transport des AGPI vers le cerveau* ..... *111*
II. AGPI ET CERVEAU ..... 113
*A. Composition lipidique du cerveau* ..... *113*
*B. Distribution régionale et cellulaire des AGPI dans le cerveau* ..... *116*
*C. Temporalité de l'incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales* ..... *119*
*D. Rôles des AGPI dans la signalisation cérébrale* ..... *120*
*E. Les AGPI et les TSA* ..... *121*
*F. Les AGPI et le microbiote* ..... *125*

**OBJECTIFS** ..... **129**

**CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES** ..... **134**

I. COMPORTEMENT ANIMAL ..... 135
*A. Test de récupération des souriceaux (P9)* ..... *136*
*B. Réflexe de redressement (P9, P11 et P13) et ouverture des yeux (de P12 à P16)* ..... *136*
*C. Test des trois chambres (entre P45 et P60)* ..... *136*
*D. Test du cylindre (entre P45 et P60)* ..... *137*
*E. Analyse de la marche (entre P45 et P60)* ..... *137*
II. ANALYSES STEREOLOGIQUES ..... 137
III. ANALYSES DES PROFILS D'ACIDES GRAS ..... 138
IV. ANALYSES DES MARQUEURS D'INFLAMMATION ..... 138
V. ANALYSES DU MICROBIOTE INTESTINAL ..... 139

**RÉSULTATS** ..... **141**

**CHAPITRE 1 : A BALANCED OMEGA-6/OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID DIET SUFFICES TO PREVENT AUTISM SPECTRUM DISORDER SYMPTOMS IN AN ENVIRONMENTAL MOUSE MODEL** ..... **142**

I. RÉSUMÉ ..... 142
II. TIRE A PART ..... 148

**CHAPITRE 2 : AGE-RELATED BEHAVIORAL AND STRIATAL DYSFUNCTIONS IN SHANK3$^{\Delta C/\Delta C}$ MOUSE MODEL OF AUTISM SPECTRUM DISORDER** ..... **190**

I. RÉSUMÉ ..... 190
II. TIRE A PART ..... 192

**DISCUSSION GÉNÉRALE** ..... **216**

**CHAPITRE 1 : LIEN ENTRE AGPI ET TSA : ETUDES CLINIQUES ET PRECLINIQUES** **218**

**CHAPITRE 2 : INFLAMMATION, AGPI ET TSA** ..... **224**

**CHAPITRE 3 : MODELE VPA : MICROBIOTE INTESTINAL, AGPI ET TSA** ..... **228**

**CHAPITRE 4 : DIFFERENCES LIEES AU SEXE** ..... **232**

**CONCLUSIONS** ..... **237**

**ANNEXE** ..... **242**

**RÉFÉRENCES** ..... **256**

**RESUME** ..... **288**

**SUMMARY** ..... **288**

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Critères de diagnostic de TSA, symptômes et comorbidités associés ..... 15
Figure 2 : Distribution des gènes potentiellement liés aux troubles du spectre autistique..... 23
Figure 3 : Interactions entre microbiote intestinal et microglie dans le cadre de TSA ..... 29
Figure 4 : Différents types de molécules sont présentes à la synapse : des molécules d'adhésion, des protéines d'échafaudage, des protéines de cytosquelette, des molécules de signalisation..... 37
Figure 5 : Voies de signalisation induites par des composés bactériens et viraux..... 41
Figure 6 : Mécanismes d'action de l'acide valproïque en pré et post-synaptique ..... 45
Figure 7 : La validité du modèle murin à l'acide valproïque ..... 47
Figure 8 : Anatomie du cervelet montrant les fissures principales, les lobes et les lobules .... 49
Figure 9 : Les afférences et efférences des noyaux cérébelleux profonds ..... 52
Figure 10 : Organisation cellulaire du cervelet ..... 53
Figure 11 : Processus de neurogenèse de la glie de Bergmann (BG) dans le cervelet pendant le développement embryonnaire et localisation des BG dans le développement périnatal ..... 56
Figure 12 : Anatomie en coupe sagittale du cervelet ..... 59
Figure 13 : Afférences cérébelleuses..... 59
Figure 14 : Efférences cérébelleuses ..... 61
Figure 15 : Efférences et fonctions reliées au cérébro-cervelet, au spino-cervelet et au vestibulo-cervelet ..... 62
Figure 16 : Le cervelet est impliqué dans les déficiences motrices et sociales rapportées dans les TSA ..... 64
Figure 17 : Chronologie du développement cérébral chez la souris ..... 65
Figure 18 : Chronologie de neurogenèse des différents neurones cérébelleux de la souris ..... 66
Figure 19 : Structure, nomenclature et exemples des différentes catégories d'acides gras ... 107
Figure 20 : Structure des AGPI à longue chaîne : acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA) ..... 107
Figure 21 : Synthèse des AGPI n-3 et n-6..... 109
Figure 22 : Mécanismes de transport des AGPI de la circulation sanguine vers le cerveau.. 113
Figure 23 : Mécanismes liés au déséquilibre en AGPI n-6/n-3 sur la paroi intestinale et l'inflammation ..... 127

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Niveaux de sévérité assosciés aux symptômes de communication sociale et de comportements restreints et répétitifs ..... 13
Tableau II : Conséquences histologiques, anatomiques et comportementales au niveau du cervelet chez des patients atteints de TSA ..... 19
Tableau III : Classification des principaux AGPI n-6 et n-3..... 107
Tableau IV : Apports nutritionnels conseillés en acides gras définis en 2011..... 110
Tableau V : Composition en acides gras dans différentes régions cérébrales chez la souris C57BL6/J adulte..... 117
Tableau VI : Composition membranaire en AGPI de différents types cellulaires chez des souris âgées de 2 mois soumises à un régime enrichi en huile de soja ..... 118

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

## 0-9

5-LOX : Lipoxygénase de l'arachidonate 5

## A

A2BP1 : Protéine 1 de liaison à l'ataxine 2

AA : Acide arachidonique

AE : Apports énergétiques

AG : Acide gras

AGCC : Acide gras à chaîne courte

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGPI-LC : Acide gras polyinsaturé à chaîne longue

AGS : Acide gras saturé

ALA : Acide α-linolénique

AMPAR : Récepteur glutamatergique AMPA

ANC : Apports nutritionnels conseillés

ANCOM : Analyse de la composition microbienne

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ApoER2 : Récepteur à l'ApoE de type 2

ARG-1 : Arginase 1

ASD : Autism Spectrum Disorder

## B

Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*

BDH1 : 3-hydroxybutyrate déshydrogénase de type 1

BG : Glie de Bergmann/Cellules de Bergmann

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BTBR : *Black and Tan BRachyury*

## C

CHD8 : Protéine de liaison à l'ADN à chromodomaine hélicase 8

ChREBP : *Carbohydrate response element binding protein*

CIM-10/ CIM-11 : Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 10ème/11ème version

CNTNAP2 : Protéine associée aux contactines 2

CNV : Variation du nombre de copies d'un gène

COX2 : Cyclo-oxygénase 2

CTNNA2 : Caténine α 2

CYP17A1 : *Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*

CYP19A1 : *Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*

CYP2E1 : *Cytochrome P450 2E1*

CYPB11B1 : *Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 1*

## D

Dab1 : *Disabled-1*

DGLA : Acide dihomo-gamma-linolénique

DHA : Acide docosahexaénoïque

DI : Déficits intellectuels ou déficits de l'intellect

DMR : Régions différentiellement méthylées

DPA n-3 : Acide docosapentaénoïque n-3

DPA n-6 : Acide docosapentaénoïque n-6

DSM-4/ DSM-5 : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux 4/5

## E

E : Jour embryonnaire

EAAT1 : Transporteur des acides aminés excitateurs 1

EGL : Couche granulaire externe

ELOVL : Elongase des acides gras

EPA : Acide eicosapentaénoïque

ESR2 : Récepteur aux estrogènes

## F

FABP : Protéine de liaison aux acides gras

FADS : Désaturase des acides gras

FAT/CD36 : Transporteur des aides gras

FATP : Protéine de transport des acides gras

FG : Fibre grimpante

FM : Fibre moussue

FMR1 : *Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1*

FP : Fibre parallèle

## G

GABA : Acide gamma amino butyrique

GABA-A : Récepteur GABAergique de type A

GAD : Acide Glutamique Décarboxylase

GC : Cellules granulaires

GI : Gastro-intestinal

GLAST : Transporteur du glutamate / aspartate

GSH : Glutathion

GST : S-Transférase du glutathion

## H-I

HDAC : Histone déacétylase

HFN4 : Facteur nucléaire hépatocytaire 4

Hoxa1 : *homeobox A1*

HSD17B10 : Déshydrogénase 10 des hydroxystéroïdes 17 bêta

IFN-α/γ : Interféron-alpha/gamma

IGL : Couche granulaire interne

IL : Interleukine

IRS2 : Récepteur 2 à l'insuline

ITPR1 : Récepteur de type 1 à l'inositol 1,4,5 Triphosphate

## K-L

KO : Knock-Out

LA : Acide linoléique

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LDL : Lipoprotéine de faible densité

LDLR : Récepteurs aux lipoprotéines de faible densité

LPS : Lipopolysaccharide

LTD : Dépression à long terme

LXR : Récepteurs hépatiques X

## M

MECP2 : Protéine de liaison aux îlots CpG méthylés 2

mGluR1/5 : Récepteur métabotropique au glutamte de type 1/5

Mash1 : *Achaete-scute Family BHLH Transcription Factor 1*

Math1 : Atonal homologue murin 1

MFSD2A : *Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2A*

mGluR5/1 : Récepteur glutamatergique métabotropique 1/5

MIA : Activation immunitaire maternelle

miARN : Micro ARN

MLX : *Max-like factor X*

MS-275 : Inhibiteur des histones déacétylases

MSN : Neurone épineux de taille moyenne

## N

Nav1.2 : Canal sodique voltage dépendant 1.2

NF-κB : Facteur nucléaire Kappa-B

NGN : Neurogénine

NLGN : Neuroligine

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

N-myc : N-myc protéine proto-oncogène

NRXN : Neurexine

## O-P

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P : Jour postnatal

p27/Kip1 : Inhibiteur 1B des kinases dépendant des cyclines

PAI : Phosphatase alcaline intestinale

Pax6 : *Paired box 6*

PBS : Tampon Phosphate Alcalin

PC : Cellule de Purkinje

PCh : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PI : Phosphatidylinositol

PKC : Protéine Kinase C

PL : Phospholipide

PLA2 : Phospholipase A2

PLD6 : Phospholipase D6

Poly I:C : Acide polyinosinique - polycytidylique

PPAR : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

Ptc1 : *Patched 1*

PTEN : Phosphatase et Tensine Homologue

Ptf1 α : Facteur de transcription pancréatique 1

## Q-R

QI : Quotient intellectuel

RCPG : Récepteur couplé à une protéine G

ROR-α : *Retinoid orphan nuclear receptor alpha*

RXR : Récepteur X des rétinoïdes

## S

sCD14 : CD14 soluble

SHANK : *SH3 and multiple ankyrin repeat domains*

Shh : *Sonic Hedgehog*

SM : Sphingomyéline

SNC : Système nerveux central

SNC2A : Sous-unité α 2 canal sodique voltage dépendant

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SNV : Variation nucléotidique unique

SREBP-1 : *Sterol regulatory element-binding protein 1*

## T

TCC : Thérapie cognitive et comportementale

TDAH : Troubles des déficits de l'attention avec ou sans hyperactivité

TED : Troubles envahissants du développement

TGF-β : *Tumor growth factor-beta*

TLR3/4 : Récepteur Toll-like 3/4

TNF-α : *Tumor necrosis factor-alpha*

TNFR1 : *Tumor necrosis factor receptor 1*

TSA : Troubles du spectre autistique

TSC1/2 : *Tuberous sclerosis complex ½*

## U-V-W

UBC : Cellules unipolaires à brosse

Unc5h3 : Récepteur aux Nétrines

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

VLDLR : Récepteurs aux lipoprotéines de très faible densité

VPA : Acide valproïque / *Valproic acid*

VTA : Aire tegmentale ventrale

Wnt : *Wingless-related integration site*

# INTRODUCTION

# CHAPITRE 1 : Les troubles du spectre autistique

## I. Définition

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux, catégorisés comme tels pour la première fois dans le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 5ème édition (DSM-V), une classification internationale de l'Association Américaine de Psychiatrie (American Psychiatric Association 2013). Les TSA sont également décrits dans la Classification Internationale des Maladies – onzième version (CIM-11), proposée et recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), rentrée en application au 1er janvier 2022 (Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 11ème révision (CIM-11), Organisation mondiale de la santé (OMS) 2019/2021). Le DSM-V et la CIM-11 sont très similaires dans leur approche de diagnostic des TSA. Contrairement à la CIM-11, la précédente version datant de 1993 (CIm-10) utilisait la terminologie « troubles envahissants du développement (TED) » et se distinguait du DSM-V par ses limites quant à la différentiation clinique des différentes catégories. Dorénavant, la CIM-11 catégorise comme « Autisme » le syndrome d'Asperger ainsi que plusieurs autres TED, mais en exclut le syndrome de Rett par exemple. De plus, la CIM-11 et le DSM-V partagent les deux critères principaux de diagnostic, alors que la CIM-10 définissait les troubles du langage comme un troisième critère principal de diagnostic.

Néanmoins, le DSM-V et la CIM-11 divergent concernant des symptômes et pathologies présentes en addition des TSA. En effet, la CIM-11 les présente comme des « co-occuring features » liés aux TSA et différencie par exemple des formes de TSA avec déficit intellectuel (DI) et sans DI, tout en recommandant de les prendre en compte dans le diagnostic. Le DSM-V précise seulement que des troubles de langage et de DI peuvent être simultanés aux TSA. De

façon générale, la CIM-11 illustre davantage les symptômes et comorbidités liés aux troubles de façon qualitative tandis que le DSM-V les catégorise de façon quantitative.

Les patients sont diagnostiqués avec un TSA lorsqu'ils présentent ces deux symptômes principaux : (i) des déficits persistants dans les comportements sociaux, notamment dans la capacité d'initiation et de maintien des interactions sociales, et (ii) des comportements, intérêts et activités atypiques ou excessifs, par rapport à l'âge de l'individu ou le contexte socioculturel, et présents de façon répétée et stéréotypée. Ces deux symptômes représentent des critères essentiels de diagnostic, parmi lesquels on retrouve également une apparition précoce des symptômes, avant l'âge de trois ans, et une persistance de ce trouble tout au long de la vie (American Psychiatric Association 2013). Le diagnostic est néanmoins souvent posé tardivement, notamment dû à l'hétérogénéité des symptômes, résultant des multiples origines possibles du trouble, génétiques et environnementales (Christensen et al. 2013; Masini et al. 2020).

Le sexe et le genre représentent également des facteurs différentiels de diagnostic. En effet, d'après Santé Publique France, il existe un ratio de 3,7 hommes pour 1 femme diagnostiquée avec des TSA. Ce ratio peut notamment s'expliquer par une présentation de symptômes différents entre garçons et filles diagnostiqués avec des TSA. D'après la CIM-11, face à une situation éprouvante, les garçons ont généralement un comportement agressif basé sur de la frustration tandis que les filles s'expriment par le biais de changements émotionnels en s'excluant. De plus, la proportion de femmes diagnostiquées avec un TSA associé à un DI est plus importante que chez les hommes tandis qu'elles semblent présenter moins de comportements et intérêts restreints et répétés comparées aux hommes (Mandy et al. 2012)

Les symptômes des TSA persistent tout au long de la vie et présentent un impact délétère sur le fonctionnement psychosocial à l'âge adulte et l'âge avancé, même sans DI. En effet, la grande majorité des personnes diagnostiquées avec des TSA ne possèdent ni logement

autonome ni emploi rémunéré (Howlin et al. 2013). Les problèmes de communication et l'isolement social peuvent également avoir de grandes répercussions sur la santé chez les personnes âgées atteintes de TSA.

### A. Critères de diagnostic

Selon le DSM-V, un enfant doit avoir des déficits persistants dans les trois sous-symptômes des troubles de communication et d'interaction sociale ainsi qu'au moins deux des quatre types de comportements répétés et stéréotypés.

1. Déficits persistants de la communication et des interactions sociales observés dans des contextes variés. Ceux-ci peuvent se manifester par les éléments suivants, soit au cours de la période actuelle, soit dans les antécédents (les exemples sont illustratifs et non exhaustifs) :
    a. Déficits de la réciprocité sociale ou émotionnelle allant, par exemple, d'anomalies de l'approche sociale et d'une incapacité à la conversation bidirectionnelle normale, à des difficultés à partager les intérêts, les émotions et les affects, jusqu'à une incapacité d'initier des interactions sociales ou d'y répondre.
    b. Déficits des comportements de communication non verbaux utilisés au cours des interactions sociales, allant, par exemple, d'une intégration défectueuse entre la communication verbale et non verbale, à des anomalies du contact visuel et du langage du corps, à des déficits dans la compréhension et l'utilisation des gestes, jusqu'à une absence totale d'expressions faciales et de communication non verbale.
    c. Déficits du développement, du maintien et de la compréhension des relations, allant, par exemple, de difficultés à ajuster le comportement à des

contextes sociaux variés, à des difficultés à partager des jeux imaginatifs ou à se faire des amis, jusqu'à l'absence d'intérêt pour les pairs.

2. Caractère restreint et répétitif des comportements, des intérêts ou des activités, comme en témoignent au moins deux des éléments suivants soit au cours de la période actuelle soit dans les antécédents (les exemples sont illustratifs et non exhaustifs) :
    a. Caractère stéréotypé ou répétitif des mouvements, de l'utilisation des objets ou du langage (par exemple : stéréotypies motrices simples, activités d'alignement des jouets ou de rotation des objets, écholalie, phrases idiosyncrasiques).
    b. Intolérance au changement, adhésion inflexible à des routines ou à des modes comportementaux verbaux ou non verbaux ritualisés (par exemple : détresse extrême provoquée par des changements mineurs, difficulté à gérer les transitions, modes de pensée rigides, ritualisation des formules de salutation, nécessité de prendre le même chemin ou de manger les mêmes aliments tous les jours).
    c. Intérêts extrêmement restreints et fixes, anormaux soit dans leur intensité, soit dans leur but (par exemple : attachement à des objets insolites ou préoccupations à propos de ce type d'objets, intérêts excessivement circonscrits ou persévérants).
    *d.* Hyper ou hyporéactivité aux stimulations sensorielles ou intérêt inhabituel pour les aspects sensoriels de l'environnement (par exemple : indifférence apparente à la douleur ou à la température, réactions négatives à des sons ou à des textures spécifiques, actions de flairer ou de toucher excessivement les objets, fascination visuelle pour les lumières ou les mouvements).
3. Les symptômes doivent être présents dès les étapes précoces du développement (mais ils ne sont pas nécessairement pleinement manifestes avant que les demandes sociales

n’excèdent les capacités limitées de la personne, ou ils peuvent être masqués plus tard dans la vie par des stratégies apprises).

4. Les symptômes occasionnent un retentissement cliniquement significatif en termes de fonctionnement actuel social, scolaire/professionnel ou dans d’autres domaines importants.
5. Ces troubles ne sont pas mieux expliqués par un handicap intellectuel (trouble du développement intellectuel) ou un retard global du développement. La déficience intellectuelle et le trouble du spectre de l’autisme sont fréquemment associés. Pour permettre un diagnostic de comorbidité entre un trouble du spectre de l’autisme et un handicap intellectuel, l’altération de la communication sociale doit être supérieure à ce qui serait attendu pour le niveau de développement général.

Il existe de nombreux troubles et pathologies associés aux TSA. Ils peuvent être neurodéveloppementaux, mentaux ou comportementaux, avec par exemple les DI ou l’altération du langage, mais peuvent également être liés à des pathologies médicales ou génétiques connues, comme le syndrome de Rett, ou à des facteurs environnementaux, liés à l’exposition à des polluants, médicaments ou métaux lourds. En prenant en compte la sévérité des TSA mais également des troubles associés, une meilleure prise en charge du sujet est possible (Tableau I).

***Tableau I : Niveaux de sévérité assosciés aux symptômes de communication sociale et de comportements restreints et répétitifs***
*D'après le DSM-V*

| Niveau de sévérité | Communication sociale | Comportements restreints, répétitifs |
|---|---|---|
| **Niveau 1** | • Sans aide, déficits d'interaction sociale **observables**<br>• **Difficulté** dans l'initiation des relations et réponse **atypique ou inefficace** à l'initiative d'autrui ; peut sembler inintéressé<br><br>Ex : utilisation de phrases complètes, engagement dans la conversation sans réciprocité | • Manque de flexibilité dans **un ou plusieurs contextes**<br>• Difficulté à passer d'une activité à l'autre<br>• Problèmes d'organisation ou de plannification |
| **Niveau 2** | • Déficits **marqués** des compétences de communication verbale et non verbale malgré une aide<br>• **Limitation** dans l'initiation des relations et réponse **réduite** à l'initiative d'autrui<br><br>Ex : utilisation de phrases simples, interactions limitées à des sujets spécifiques et restreints, communication non verbale atypique | • Manque de flexibilité dans **une variété de contexte**<br>• Difficulté à **tolérer** le changement<br>• Comportements restreints et répétitifs **observables**<br>• Détresse importante/difficulté à faire varier l'objet de l'attention ou de l'action |
| **Niveau 3** | • Déficits **graves** des compétences de communication verbale et non verbale<br>• Limitation **très sévère** dans l'initiation des relations et réponse **minime** à l'initiative d'autrui<br><br>Ex : utilisation de seuls quelques mots intelligibles, initie rarement ou inhabituellement les interactions, ne répond qu'à des approches sociales très directes | • Comportement inflexible<br>• Difficulté **extrême** à faire face aux changements<br>• Comportements restreints et répétitifs **marqués**<br>• Détresse importante/difficulté à faire varier l'objet de l'attention ou de l'action |

## B. Comorbidités

Les deux symptômes principaux servant de critères essentiels de diagnostic, *i.e.* les troubles qualitatifs de communication sociale ainsi que les comportements répétés et restreints, sont fréquemment accompagnés de comorbidités, ce qui peut rendre la pose de diagnostic plus longue et difficile (Figure 1). En effet, 71% des patients diagnostiqués avec un TSA présentent au moins une comorbidité, 41% au moins deux et 24% au moins trois (Simonoff et al. 2008).

Les comorbidités peuvent d'être d'ordre psychiatriques, neurologiques ou somatiques. Parmi les pathologies psychiatriques associées aux TSA, on retrouve par exemple, les troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH). Dans certaines études, le DSM-IV est toujours utilisé pour diagnostiquer les maladies psychiatriques, notamment dans cette étude récente où les TDAH sont retrouvés chez 22% à 83% des enfants avec un TSA, et

respectivement, 30% à 65% les enfants diagnostiqués avec un TDAH présentent des symptômes des TSA (Sokolova et al. 2017). Les troubles de l'humeur font également partie de ces comorbidités, comme l'anxiété, présente chez 40% des patients avec un TSA (van Steensel et al. 2011). L'anxiété peut créer des problèmes somatiques, de l'impulsivité, de l'hyperactivité et des problèmes d'apprentissage chez des patients avec un TSA et des troubles cognitifs marqués, tandis qu'elle exercera davantage une influence négative sur les symptômes sociaux et dépressifs chez des patients avec un TSA avec des capacités cognitives moins impactées (Chang et al. 2012; Evans et al. 2005; Kerns et al. 2015). Des troubles dépressifs avaient été décrits par Kanner chez des enfants avec des TSA (Kanner 1968), tandis que chez l'adulte, 77% des patients avec un TSA ont déjà été diagnostiqués dépressifs par rapport à 46% des adultes sans TSA (Joshi et al. 2013). Cassidy et ses collaborateurs ont également montré, qu'associées à la dépression, des idées suicidaires et des tentatives de suicide sont également présentes, respectivement chez 66% et 35% des patients avec un TSA (Cassidy et al. 2014). Avec une prévalence moindre, on retrouve le trouble bipolaire (moins de 2%) et la schizophrénie (8%) (Joshi et al. 2013). L'épilepsie (jusqu'à 30%) ainsi que les troubles du sommeil (jusqu'à 80%) font partie des troubles neurologiques associés au diagnostic de TSA (Lai et al. 2014). Concernant les pathologies somatiques associées au diagnostic de TSA, on retrouve les problèmes GI, présents de façon plus importante chez les enfants avec des TSA. La constipation et la diarrhée sont les symptômes prédominants, avec un risque relatif multiplié par presque 4 (McElhanon et al. 2014). Des dysfonctionnements mitochondriaux représentent également une comorbidité des TSA, tout comme les allergies et dérégulations du système immunitaire (Ashwood et al. 2006; Rossignol & Frye 2012; Zerbo et al. 2015).

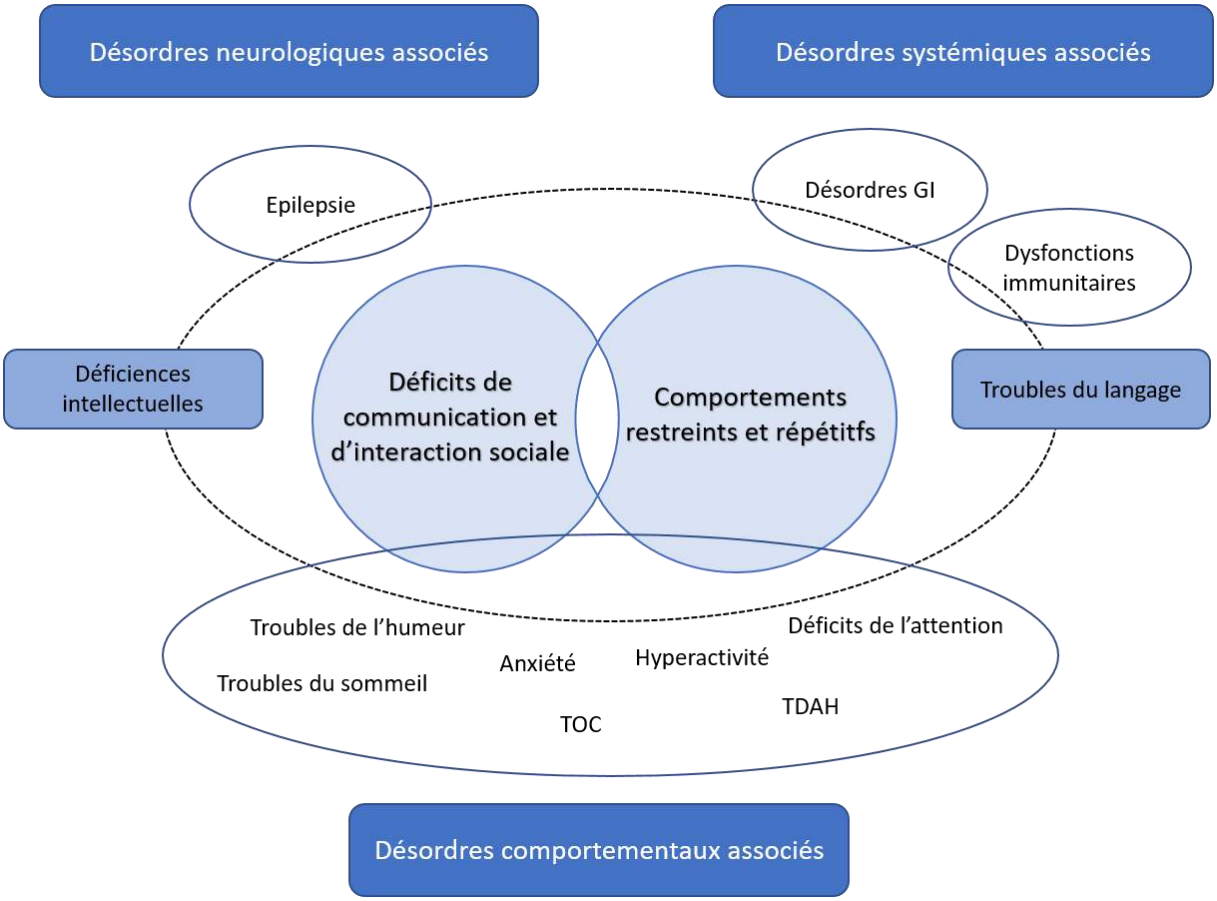



***Figure 1 : Critères de diagnostic de TSA, symptômes et comorbidités associés***
*Troubles GI : troubles gastro-intestinaux; TOC : troubles obsessionnels compulsifs; TDAH : Trouble déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité.*
*D'après le DSM-V et la CIM-11*

Il n'existe pas de traitement curatif des TSA, mais certaines comorbidités peuvent être traitées, par le biais de thérapies cognitives et comportementales (TCC) pour l'anxiété (Vasa et al. 2014) ou bien de traitements pharmacologiques ciblés pour d'autres comorbidités. En effet, les TCC sont largement appliquées et se sont montrées efficaces, mais se sont uniquement concentrées sur des enfants ayant des capacités de communication peu atteintes. En effet, il manque à l'heure actuelle des approches purement comportementales pour des patients diagnostiqués avec un TSA et des déficits marqués des capacités cognitives (dont le langage) (Rosen et al. 2018).

Les traitements pharmacologiques sont davantage prescrits en seconde intention, et ne se révèlent pas toujours efficaces selon les patients (King et al. 2009). Ils peuvent néanmoins être nécessaires et utiles dans des cas de comorbidités sévères. Les plus utilisés et autorisés aux Etats-Unis sont les antipsychotiques atypiques qui sont de seconde génération, comme la risperidone et l'aripiprazole contre l'agressivité, l'irritabilité, les stéréotypies et l'automutilation. Les psychostimulants tels que les méthylphenidates, (Ritaline® et le Biphentin®), sont quant à eux prescrits pour le TDAH (Vasa et al. 2016). Pour des troubles du sommeil, la mélatonine peut être recommandée et dans les cas de dépression et d'anxiété, des antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont prescrits.

### a. Troubles moteurs

Abordés dans le DSM-V, les troubles moteurs sont présents chez les patients avec des TSA dans une proportion pouvant atteindre 79% des patients diagnostiqués (Lai et al. 2014). Néanmoins, malgré l'identification de « maladresse motrice » par Kanner et Asperger en 1943 et 1944 respectivement, ces troubles moteurs ne sont pas définis comme des critères de diagnostic, en dehors des comportements répétitifs (Asperger 1944; Kanner 1943). Les déficits sensorimoteurs représenteraient pourtant un réel intérêt dans le diagnostic, notamment parce qu'ils peuvent être détectés dès l'enfance (Ben-Sasson & Gill 2014; Brian et al. 2008; LeBarton & Iverson 2013; Leonard et al. 2014; Ozonoff et al. 2014; Sacrey et al. 2015) et auraient une origine génétique et familiale (Mosconi et al. 2010). En effet, certains gènes et voies de signalisation liés à la motricité et notamment aux saccades, tels que *Engrailed 2* et la voie de la reeline, sont altérés dans le cervelet des patients diagnostiqués avec des TSA (Benayed et al. 2005; Fatemi 2001; Gharani et al. 2004).

En effet, chez le nourrisson, une asymétrie de l'allongement ventral est retrouvée et plus tard, des retards dans le bon développement moteur (Teitelbaum et al. 1998). Des modifications

de certains paramètres de marche sont également retrouvés chez des enfants diagnostiqués avec des TSA comme une phase d'appui plus longue et un écartement des pas diminué (Vilensky et al. 1981). Chez l'enfant et l'adolescent avec des TSA, on retrouve ces mêmes troubles moteurs avec la caractérisation d'une marche hétérogène, d'une maladresse, de troubles de la coordination et d'autres anomalies motrices comme la marche sur la pointe des pieds (Baird et al. 2011). Il semblerait que l'adolescence soit une période critique quant à la détérioration marquée des symptômes moteurs et l'apparition d'épisodes catatoniques, comme un mutisme ou des expressions faciales inadaptées (American Psychiatric Association 2013).

Les enfants diagnostiqués avec des TSA obtiennent des scores de motricité plus faibles pour attraper une balle mais également pour des comportements faisant appel à la dextérité et l'équilibre, par rapport à des enfants neurotypiques (Brito et al. 2009). De façon intéressante, ces troubles moteurs sont associés avec une détérioration de la microstructure de la substance blanche au niveau des voies motrices cérébelleuses efférentes. Néanmoins, cette étude sur des enfants de 5 à 14 ans ne disposait que d'une cohorte d'individus limitée, comportant 12 garçons et une seule fille (Brito et al. 2009). Les études plus récentes s'intéressent désormais aux différences liées au sexe et au genre dans les TSA. Lei et ses collaborateurs ont notamment montré que seuls les individus de sexe féminin diagnostiqués avec des TSA présentaient une réduction de l'intégrité de la substance blanche en comparaison avec des femmes neurotypiques (Lei et al. 2019). En effet, dans cette cohorte de 81 patients avec des TSA âgés de 4 à 21 ans, les patients de sexe masculin ne semblent pas présenter de différences avec les individus neurotypiques du même sexe sur cet aspect.

Des différences entre hommes et femmes chez les jeunes adultes ayant des TSA sont également retrouvées au niveau de la connectivité fonctionnelle du cervelet (Smith et al., 2019). En effet, les femmes présentent une hyperconnectivité fonctionnelle liée au circuit cortico-

cérébelleux plus proche des hommes neurotypiques que des femmes neurotypiques, tandis que les hommes avec des TSA font état d'une hypoconnectivité.

Ces différences dans les circuits sensorimoteurs dépendantes du sexe peuvent donner lieu à des troubles moteurs spécifiques au sexe. Dans une étude récente, des enfants filles et garçons entre 3 et 11 ans diagnostiqués avec des TSA ont passé une batterie de tests moteurs et seule une détérioration dans l'anticipation motrice chez les filles avec des TSA par rapport aux filles neurotypiques a été montrée (Crippa et al. 2021).

Néanmoins, peu d'études s'intéressent aux troubles moteurs chez l'adulte avec des TSA. Lum et collaborateurs ont réalisé une méta-analyse afin de résumer les recherches sur les paramètres spatio-temporels liés à la marche chez des individus diagnostiqués avec des TSA (Lum et al. 2021). Seuls deux paramètres présentent une détérioration avec l'âge : la cadence devient plus lente et le temps de cycle de marche plus long. Ce résultat va à l'encontre de l'hypothèse développementale des TSA, dans laquelle les différences entre individus neurotypiques et atypiques deviennent de moins en moins visibles avec l'âge (Manicolo et al. 2019). Des résultats d'imagerie soutiennent pourtant le fait que les problèmes moteurs persistent avec l'âge dans le réseau cortico-striatal par exemple (Duerden et al. 2012).

Les troubles moteurs associés aux TSA étaient initialement proposés comme résultant du sous-recrutement des régions impliquées dans le circuit sensorimoteur, *i.e.* cervelet, striatum, cortex, thalamus. Néanmoins, des études ont montré par imagerie que lors de tâches motrices simples (comme l'appui sur un bouton avec le pouce), les patients avec des TSA présentent une forte activation du cervelet antérieur ipsilatéral, supérieure à celle retrouvée chez les neurotypiques (Allen et al. 2004). Dans cette même étude, les régions controlatérales ainsi que le cervelet postérieur, non associées avec cette tache motrice simple, sont également recrutées chez les patients diagnostiqués avec des TSA. Il s'agirait donc selon cette étude davantage de

sur-recrutement des structures motrices, et notamment au niveau de structures cérébelleuses, que de sous-recrutement.

Afin de mieux contrôler leurs mouvements, les personnes avec des TSA nécessitent davantage d'entraînement, notamment pour la coordination temporelle, caractéristique d'une implication cérébelleuse (Mosconi et al. 2015a). De plus, il est proposé que leurs difficultés d'apprentissage, qu'elles soient d'ordre moteur ou dans le cadre scolaire, soient liées à leurs déficits sociaux, du moins en partie. En effet, leur capacité d'interaction et d'imitation étant limitée, leur apprentissage se base seulement sur leurs informations proprioceptives erronées, conduisant à un mouvement trop important (Mosconi et al. 2015a).

***Tableau II : Conséquences histologiques, anatomiques et comportementales au niveau du cervelet chez des patients atteints de TSA***
*D'après Mosconi et al. 2015b*

| | Circuits occulomoteurs | Circuits des membres supérieurs | Circuits liés à la posture/marche |
|---|---|---|---|
| **Histopathologie** | • Peu d'études montrent une baisse de la densité de cellules de Purkinje dans le vermis. Cette perte cellulaire est plus importante dans les hémisphères. | • Plusieurs études montrent une réduction de la densité des cellules de Purkinje dans les lobules IV-VI, jusqu'aux parties latérales comme Crus I-II | • Réduction de la densité des cellules de Purkinje dans le spinocervelet. Cette baisse est plus imporante dans les lobes antérieurs et latéraux |
| **Anatomie IRM & anatomie fonctionnelle** | • Hypoplasie du vermis dans les lobules VI-VII<br>• Activation BOLD réduite pendant les saccades et le maintien du regard par les mouvements des yeux | • Surdéveloppement des hémisphères<br>• Modification de l'activité BOLD dans les parties antérieures et latérales du cervelet pendant une tache séquentielle | • Le lobule inférieur IX a un volume réduit |
| **Comportement sensorimoteur** | • Augmentation de l'amplitude des saccades pendant la fixation du regard<br>• Baisse de la précision des saccades<br>• Augmentation de la variabilité des saccades<br>• Réduction du taux d'adaptation aux saccades<br>• Réduction du gain de poursuite en boucle fermée<br>• Gain réduit des mouvements oculaires vers la droite pendant la phase de poursuite en boucle ouverte (les premières 100 ms) | • Cinématique de préhension atypique : lente et non coordonnée<br>• Force excessive lors de la préhension initiale<br>• Augmentation de la variabilité de la force pendant la préhension prolongée<br>• Augmentation de la dépendance sur la rétroaction proprioceptive pendant des tâches motrices d'apprentissage<br>• Détérioriation du retour visuel pendnat la préhension et l'apprentissage moteur | • Augmentation du balancement postural, surtout dans les directions médiolatérales, dans une position de relâchement<br>• Réduction du balancement postural lors de l'initiation et du maintien d'une position dynamique<br>• Augmentation de la largeur de foulée, baisse de la longeur de la foulée, cinématique de marche atypique |

On retrouve des troubles moteurs chez les patients diagnostiqués avec des TSA en lien avec les circuits oculomoteurs, des membres supérieurs et des troubles de la marche et de la

posture (Tableau II) (Mosconi et al. 2015b)). En effet, ces fonctions sensorimotrices sont largement gérées par le cervelet, région cérébrale impactée aux niveaux anatomique et cellulaire chez les patients avec des TSA.

### b. Épidémiologie

Les TSA ont longtemps été considérés comme des pathologies rares, avec une prévalence faible d'un enfant pour 1000. Or, depuis 2019, l'OMS présente un ratio d'un enfant diagnostiqué avec des TSA sur 160. Les États-Unis sont notamment l'un des pays où la prévalence est la plus élevée, avec en moyenne 1 enfant sur 44 estimé avec des TSA à 8 ans (Maenner et al. 2021). Ce taux élevé ces dernières années peut être partiellement expliqué par l'élargissement des critères diagnostiques instaurés par le précédent DSM, le DSM-IV, ainsi qu'une description détaillée de ceux-ci. Le DSM-IV a permis d'inclure dans les TSA des cas syndromiques, mais également une meilleure reconnaissance du trouble et des comorbidités associées. Cette forte prévalence peut également rendre compte de l'augmentation de l'exposition à des facteurs environnementaux neurotoxiques, tels que la pollution, les pesticides mais également les perturbateurs endocriniens. Enfin, une meilleure prise de conscience de la pathologie, à la fois chez les parents ainsi qu'au sein du corps médical peut aussi avoir contribué à cette augmentation de diagnostic.

Les chiffres concernant la prévalence de l'autisme au regard du sexe sont encore débattus à l'heure actuelle. En effet, on retrouve un ratio de 3,7 garçons pour 1 fille diagnostiquée avec des TSA d'après Santé Publique France et de 3 pour 1 d'après Loomes et ses collaborateurs (Loomes et al. 2017). Ce ratio peut notamment être expliqué par des facteurs génétiques protecteurs chez les personnes de sexe féminin. Par exemple, la présence d'un seul chromosome X chez les hommes les rend davantage susceptibles aux mutations liées au chromosome X que les femmes, notamment pour le syndrome de l'X fragile. En effet, ce syndrome n'est retrouvé

que chez les hommes, puisque des mutations sur l'un des deux chromosomes X chez la femme peuvent être compensées par le deuxième chromosome X intact (Jamain et al. 2003; Laumonnier et al. 2004). Le nombre d'hommes diagnostiqué peut également être lié à des taux élevés de testostérone, à l'opposé des effets protecteurs des estrogènes chez les femmes (Baron-Cohen 2002). Néanmoins, les estrogènes ne seraient pas aussi efficaces contre les déficiences intellectuelles associées aux TSA. En effet, les femmes présentent plus fréquemment des DI associés (Mandy et al. 2012), ce qui expliquerait pourquoi les symptômes de TSA chez des femmes sans DI tendent à passer inaperçus et nécessiteraient une évaluation plus approfondie (Werling 2016).

Il est également proposé que le ratio 3 hommes pour 1 femme soit faussé par les critères de diagnostic basés sur les hommes, et non pas sur les symptômes des deux sexes. Les femmes présenteraient des difficultés sociales et de communication atténuées, ce qui pourrait expliquer leur sous-diagnostic (Rivet & Matson 2011). Il est d'ailleurs commun que les femmes soient diagnostiquées après l'âge de 20 ans tandis que les hommes sont souvent pris en charge pour cette pathologie dès leurs premières années de vie.

Plusieurs études suggèrent que les TSA sont en réalité sous-diagnostiqués et que la proportion homme/femme est sous-évaluée. En effet, deux études en 2011, l'une en Corée du Sud et l'autre en Finlande, se sont intéressées à la proportion d'enfants avec des TSA dans une population donnée (Kim et al. 2011; Mattila et al. 2011). La prévalence des TSA a été estimée à 2,64% et 0,84%, respectivement. Il a également été retrouvé un ratio homme/femme de 2,5 pour 1 dans l'étude réalisée en Corée du Sud et entre 1,7 pour 1 et 2,3 pour 1 en Finlande. Ces ratios indiquent une prévalence plus importante des TSA chez les femmes que présupposée. Des prévalences de 2,8% et 2,3% sont également retrouvées à Toyota au Japon et dans la *Stockholm Youth Cohort* en Suède, respectivement (Idring et al. 2014; Kawamura et al. 2008).

Ce sont des pays où la recherche de TSA chez les patients fait partie intégrante du système de santé, et où les diagnostics sont comptabilisés.

### c. Étiologie

L'étiologie des TSA est très complexe et implique des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux, prenant place lors du développement, *in utero* et pendant l'enfance. Les nouvelles avancées en génomique et épigénomique semblent ouvrir une nouvelle voie d'accès à la compréhension de l'étiologie et l'épidémiologie des TSA.

#### i. Facteurs génétiques

L'hérédité concernant les TSA est très importante puisqu'elle est estimée entre 50 et 90% (Hallmayer et al. 2011; Tick et al. 2016). La probabilité pour un enfant d'être diagnostiqué avec des TSA varie selon le pourcentage de patrimoine génétique qu'il partage avec son parent, son frère ou sa sœur atteint.e de TSA (Constantino et al. 2010; Risch et al. 2014; Sandin et al. 2014), avec un risque de récurrence entre frères et sœurs non-jumeaux de 18,7% (Ozonoff et al. 2011). Concernant les jumeaux monozygotes et dizygotes, la probabilité qu'ils présentent le même diagnostic de TSA est de 60% et de 10%, respectivement (Bailey et al. 1995). Néanmoins, un effet du sexe est possible sur cette prévalence. En effet, une étude quantitative reliée à des différences spécifiques au sexe, a montré que les symptômes autistiques étaient plus importants chez des jumelles que chez des jumeaux (Robinson et al. 2013).

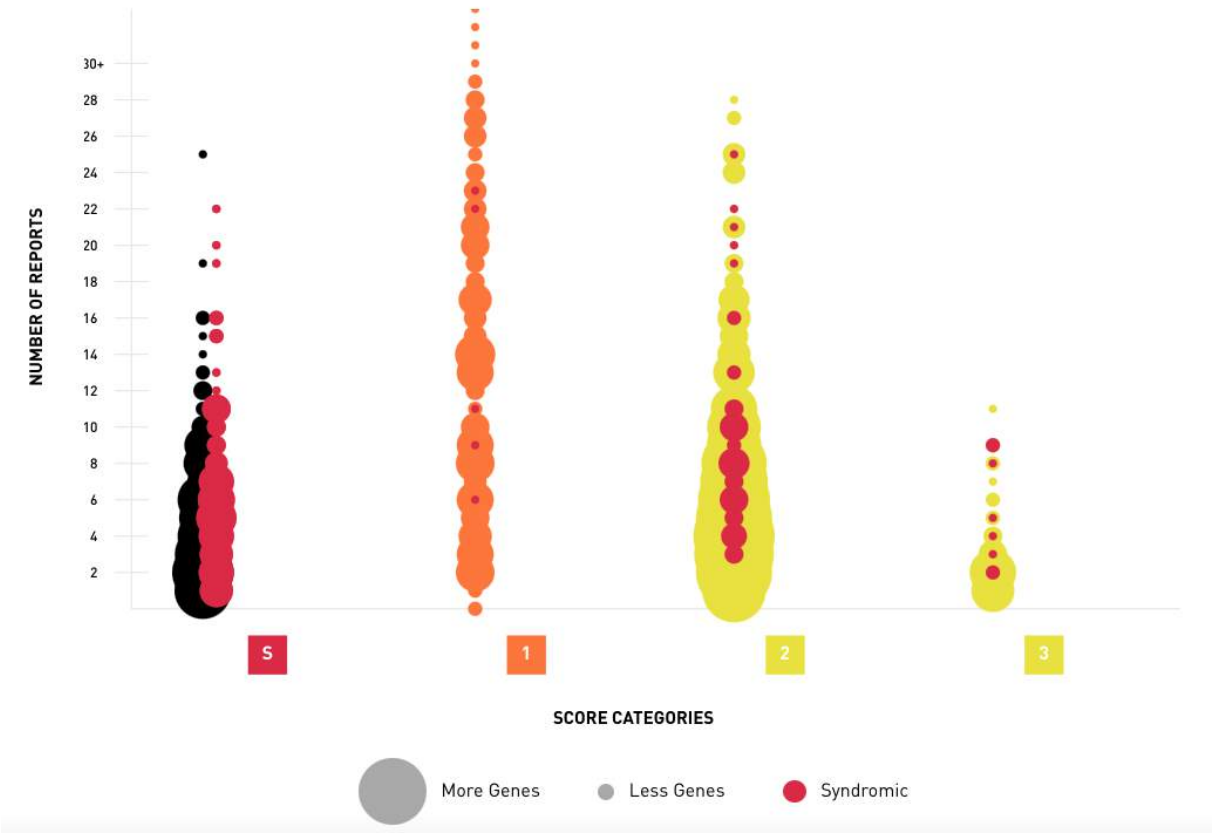



***Figure 2 : Distribution des gènes potentiellement liés aux troubles du spectre autistique***
*Il existe 4 catégories selon la Simons Fondation Autism Research Initiative : (S) les gènes syndromiques, (1) les gènes de haute confiance, (2) les gènes candidats et (3) les gènes supposés.*

Les récentes avancées technologiques permettent désormais de séquencer le génome humain entier et ont ainsi permis d'identifier plus de 1200 gènes de susceptibilité, classés selon leur implication dans les TSA dans la base de données de la Fondation Simons pour la recherche sur l'autisme (*Simons Foundation Autism Research Initiative*, SFARI) (Figure 2). Ces gènes sont principalement impliqués dans des processus de remodelage de la chromatine et de formation ou de fonctionnement de la synapse. En effet, on y retrouve des gènes codant pour les protéines synaptiques telles que les neuroligines (NLGN), shank (SHANK), les neurexines (NRXN) et les protéines associées aux contactines, dont la plus étudiée est la protéine associée aux contactines 2 (*contactin-associated protein 2*, CASPR2) (SFARI). Ces protéines agissent en consortium pour former un complexe trans-synaptique pour une synapse fonctionnelle et une transmission neuronale efficace. Des mutations sur ces gènes entraînent donc une

dérégulation synaptique, impactant les interactions neurone-neurone mais également neurone-glie, par le biais de mécanismes électrophysiologiques liés aux canaux potassiques et sodiques et aux courants calciques. Ceci agit ensuite sur les systèmes de transmission synaptique glutamatergiques et GABAergiques ainsi que sur la plasticité *in fine*. De façon intéressante, les mutations de ces gènes sont également présentes chez des patients diagnostiqués épileptiques, schizophréniques et avec la maladie d'Alzheimer (de Sena Cortabitarte et al. 2017; Keller et al. 2017; Krishnan et al. 2017; Nadeem et al. 2021). Ces pathologies neurologiques partagent plusieurs symptômes avec les TSA comme des déficits d'interaction sociale, des difficultés dans l'expression des émotions et des déficiences cognitives, ce qui met en cause les dysfonctions synaptiques dans ce phénotype.

Concernant les formes syndromiques de TSA, telles que les syndromes de Prader-Willi/Angelman et du X fragile, elles donnent lieu à un phénotype extrêmement sévère dans le spectre des TSA avec des anomalies physiques et une DI. Néanmoins, ces formes syndromiques ne représentent que 4 à 5% des patients diagnostiqués avec un TSA (Tammimies et al. 2015). Leur rareté est inversement proportionnelle à la gravité des symptômes des TSA.

La recherche s'est donc davantage intéressée aux variants hétérogènes et affectant l'expression des gènes associés à un risque de TSA, comme le gène codant pour la protéine de liaison à l'ADN à chromodomaine hélicase 8 (CHD8), impliqué dans le remodelage de la chromatine et lié à d'autres gènes associés aux TSA (Cotney et al. 2015). Les conséquences de variants délétères sur le gène *Chd8* sont d'ordre physique : macrocéphalie, dysmorphie faciale mais également des troubles GI, retrouvés chez plus de 87% des patients diagnostiqués avec des TSA (Morris-Rosendahl & Crocq 2020). Un autre gène d'intérêt souvent étudié dans la physiopathologie des TSA est *Scnc2a*, codant pour la sous-unité α 2 du canal sodique voltage dépendant Nav1.2 (SNC2A), et qui est impliqué dans l'initiation et la propagation des potentiels d'action. Les variants pathogènes liés aux TSA et/ou aux DI ont pour conséquence une perte

de fonction de SNC2A, et consécutivement une perte de fonction de Nav1.2 (Ben-Shalom et al. 2017).

De plus, la sévérité des troubles neurodéveloppementaux chez les enfants a été positivement corrélée avec la présence importante de variations du nombre de copies d'un gène (CNV) rares et larges, notamment lors de la présence de DI parmi les symptômes (Girirajan et al. 2011; Kirov et al. 2014). Ces formes de TSA sont d'origine polygénique, et résultent d'une perturbation de l'architecture chromosomique, par le biais d'une duplication ou d'une délétion d'une région impliquée sur un ou plusieurs gènes. Ces variants peuvent donc influencer l'expression génétique et contribuer à l'expansion du trouble par différents mécanismes (Masini et al. 2020). Sanders et ses collaborateurs ont par ailleurs montré que les patients diagnostiqués avec des TSA avaient une prévalence dix fois plus importante de présenter des CNV *de novo* comparés à des individus non affectés par des TSA (Sanders et al. 2011). De plus, leur taux de mutation est cinq fois plus important que celui de leurs frères et/ou sœurs sans TSA (Sanders et al. 2015). Cette forte présence de mutations génétiques pourrait expliquer 30% des formes monogéniques de TSA (Bernier et al. 2016; Morris-Rosendahl & Crocq 2020).

De façon intéressante, le nombre de gènes touchés par les CNV, la fréquence de CNV et des *single nucleotide variants* (SNV) *de novo* sur des gènes liés aux TSA sont plus importants chez les femmes que chez les hommes (De Rubeis et al. 2014; Sanders et al. 2015). Une autre étude de séquençage d'exomes entiers ou « whole exome sequencing » sur la Simons Simplex Collection a montré que les gènes impliqués par les SNV *de novo* chez les femmes atteintes de TSA sont les mêmes retrouvés chez les hommes présentant seulement un quotient intellectuel bas (Iossifov et al. 2014). Il existe actuellement 17 emplacements de CNV retrouvés de façon récurrente chez les patients avec des TSA (SFARI). De façon intéressante, les patients diagnostiqués avec un TSA ne sont pas les seuls à présenter des mutations *de novo*. En effet, des patients schizophrènes avec un DI en présentent également. Ces patients ont en commun

une perte de fonction d'un ou de plusieurs gènes liés à la plasticité synaptique et le remodelage de la chromatine, comme pour les formes d'autisme monogéniques (Fromer et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Pinto et al. 2010; Sugathan et al. 2014).

De nombreuses études se sont consacrées aux corrélations entre la présence de CNV sur des régions spécifiques et le diagnostic de TSA. Sanders et ses collaborateurs ont notamment montré que les CNV les plus présents chez les patients diagnostiqués avec un TSA se trouvent sur la région 16p11.2 du chromosome 16 (Sanders et al. 2011). Néanmoins, il existe d'autres régions enrichies en CNV liées à ce trouble neurodéveloppemental telles que 22q11.2, 1p.34.2, 2p.15-16.1, 15q13.2q13.3 et 15q13.3 (Kumar et al. 2010; Liang et al. 2009; Liu et al. 2011; Miller et al. 2009; Pagnamenta et al. 2009; Rajcan-Separovic et al. 2007). Ces CNVs ont des conséquences phénotypiques hétérogènes incluant des dysmorphies, une DI, des troubles du langage, des déficits de l'attention, de l'hyperactivité, un comportement agressif, des troubles de l'humeur ainsi que d'autres troubles comportementaux, qui peuvent être à l'origine d'une incapacité sociale dans les TSA (Persico & Napolioni 2013).

Malgré l'importance des altérations génétiques dans le phénotype des patients diagnostiqués avec un TSA, les CNV ou les mutations de nucléotides sur des gènes prédisposant aux TSA ne sont présents que chez 10 à 25% des patients TSA (Bourgeron 2015; Huguet et al. 2013). Il est proposé que les symptômes des TSA résulteraient davantage de plusieurs évènements génétiques associés à des facteurs environnementaux, plutôt qu'à une ou deux mutations génétiques délétères sur un unique gène. Une meilleure prise en charge diagnostique pour lier le génotype au phénotype est nécessaire dans les TSA.

### ii. Facteurs environnementaux

Il apparaît évident que les facteurs génétiques ne sont pas les seuls responsables de la croissance de la prévalence des TSA, puisqu'ils ne représentent que 10 à 25% de l'étiologie des TSA (Bourgeron 2015; Huguet et al. 2013). Les facteurs environnementaux seraient donc majoritairement impliqués dans l'apparition de TSA. Leur diversification et multiplicité pourrait en partie expliquer l'hétérogénéité de cette pathologie neurodéveloppementale. En effet, dans une étude sur des jumeaux monozygotes diagnostiqués avec des TSA, des facteurs environnementaux non partagés expliqueraient 39,1% des variations de sociabilité (Deng et al. 2015). Certains facteurs environnementaux auraient donc une incidence différente entre des jumeaux monozygotes. Parmi ces facteurs non partagés, on retrouve les infections, les toxines, les drogues et substances pharmacologiques, les problèmes immunitaires, l'alimentation et la pollution (métaux lourds, pesticides, air) (Deng et al. 2015).

À l'heure actuelle, aucun facteur commun n'a été identifié comme directement lié à la prévalence des TSA (Turner et al. 2011). Néanmoins, ces facteurs environnementaux voient leurs effets délétères décuplés pendant des périodes critiques, en prénatal, périnatal et postnatal (Wang et al. 2017). Ainsi, l'environnement de la mère va être déterminant dans le risque de développer des TSA chez son enfant.

#### a. Risques prénataux

La présence de maladies chez la mère est un facteur de risque non négligeable. Une méta-analyse a montré que le risque de développement de TSA chez des enfants ayant une mère diabétique est de 62%, de 28% chez des enfants ayant une mère en sous-poids, et de 36% chez des enfants ayant une mère obèse (Wan et al. 2018). De plus, une association entre obésité et diabète maternel, qu'il soit pré-gestationnel ou gestationnel, augmente le taux de prévalence de TSA associé avec des DI de plus de 3% (Li et al. 2016). D'autres maladies, comme des maladies

auto-immunes, des infections virales et bactériennes, sont associées au risque de développer des TSA (Jiang et al. 2016; Zerbo et al. 2015). Les infections vont provoquer une activation du système immunitaire maternel et une augmentation de molécules pro-inflammatoires, cytokines et chémokines, qui ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) mais aussi de modifier les caractéristiques de cette barrière (Zawadzka et al. 2021). Des études sur des modèles animaux MIA ont pu mettre en évidence qu'une agression pendant la gestation avait des répercussions sur le développement cérébral et que ces modifications menaient à des phénotypes de TSA mais également à d'autres désordres neurologiques (Meyer et al. 2009).

De plus, les perturbations du système immunitaire peuvent être liées à des modifications du microbiote intestinal et à la perméabilité de la paroi intestinale. En effet, une dysbiose intestinale maternelle, c'est-à-dire un déséquilibre des niveaux bactériens de la flore microbienne intestinale, peut être due à une utilisation d'antibiotiques pendant la grossesse. Une étude sur une large cohorte au Danemark a permis de mettre en évidence que le recours aux sulfonamides et à la pénicilline pendant le deuxième et troisième trimestre de grossesse est associé à une augmentation d'environ 50% du risque de diagnostic de TSA chez l'enfant (Atladóttir et al. 2012). Cette dysbiose du microbiote intestinal peut influencer la perméabilité de la barrière intestinale et permette une translocation bactérienne et la production anormale de métabolites en grande quantité comme les acides gras à chaîne courte (AGCC). Une réaction immunitaire pro-inflammatoire va donc se mettre en place et va agir sur le développement cérébral du fœtus, notamment les interactions neurone-glie dans la mise en place d'un réseau neuronal fonctionnel (Figure 3) (pour revue, Davoli-Ferreira et al. 2021).

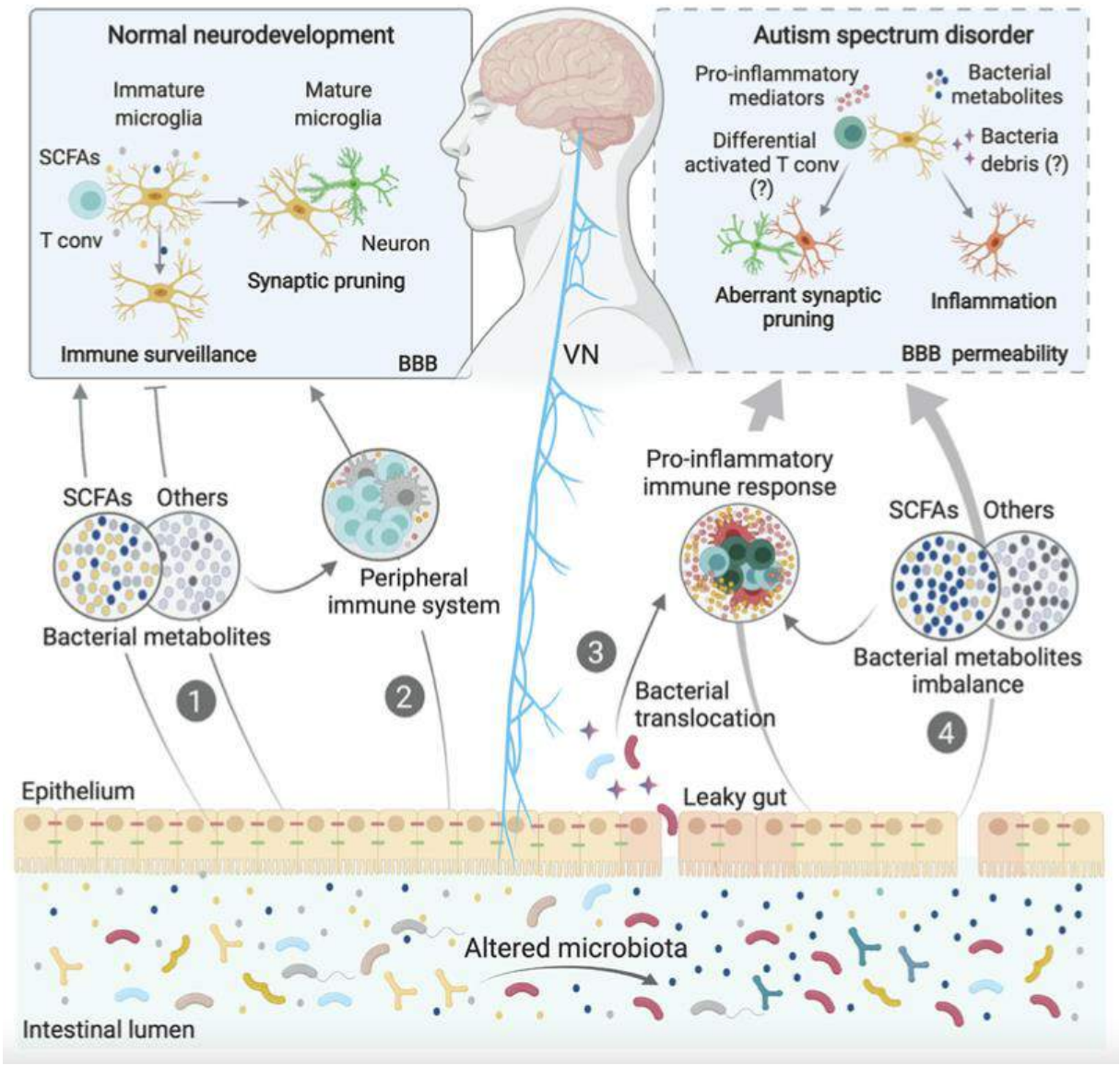



***Figure 3 : Interactions entre microbiote intestinal et microglie dans le cadre de TSA***

*Plusieurs mécanismes directs et indirects agissent sur le lien entre microbiote intestinal et microglie. En conditions physiologiques, les métabolites bactériens tels que les acides gras à chaîne courte (AGCC) peuvent agir directement par le nerf vague ou bien indirectement par la modulation du système immunitaire périphérique* ***(1-2)****. Dans le cadre des TSA, une dysbiose induit une plus grande perméabilité intestinale et de ce fait, la translocation de bactéries, et un déséquilibre de AGCC et d'autres métabolites bactériens* ***(3-4)****. Cela a pour conséquence de générer une réponse pro-inflammatoire du système nerveux périphérique et donc de produire des molécules pro-inflammatoires et des cytokines, pouvant activer directement le nerf vague et traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette réponse pro-inflammatoire a des conséquences sur les fonctions microgliales, notamment au niveau de la surveillance, l'élagage synaptique et l'inflammation, ce qui contribue aux symptômes autistiques.*

*D'après Davoli-Ferreira et al. 2021*

Une dysbiose du microbiote intestinal ne mène pas seulement à des troubles comportementaux de type autistique mais également à des désordres GI, faisant partie des comorbidités retrouvées chez les patients atteints de TSA et évoquées plus haut (Cryan & Dinan 2015; Erny et al. 2015; Hsiao et al. 2013; McElhanon et al. 2014). On retrouve de façon consistance un changement du ratio *Bacteroidetes*/*Firmicutes* chez les patients ayant des TSA (De Angelis et al. 2015). De façon intéressante, des niveaux élevés de zonuline, une protéine permettant d'augmenter la perméabilité de la paroi intestinale, ont été retrouvés chez des enfants diagnostiqués avec un TSA et des désordres GI (Rose et al. 2018).

Par ailleurs, l'exposition à des composés chimiques tels que les métaux lourds, les organophosphorés, les xénobiotiques ont également été mis en cause dans l'étiologie des TSA (pour revue, Masini et al. 2020). De plus, la consommation excessive de substances nocives comme le tabac, l'alcool et certains médicaments pendant la grossesse ont longtemps représenté un risque de diagnostic de TSA pour le futur enfant. Néanmoins, une consommation faible ou modérée d'alcool par la mère ne semble pas entraîner une augmentation de prévalence de TSA chez les enfants (Gallagher et al. 2018) et deux méta-analyses ont également montré que le tabac ne représente pas un facteur de risque des TSA (Rosen et al. 2015; Tang et al. 2015). Concernant les différents médicaments pris pendant la grossesse, les anti-dépresseurs et antiépileptiques ont été les premières cibles de recherche quant à leurs effets potentiels sur le fœtus. L'acide valproïque (VPA), un composé pharmacologique agoniste des récepteurs GABA de type A (GABA-A) et commercialisé sous le nom de Dépakine ®, est utilisé dans le traitement de l'épilepsie et les troubles bipolaires. Son utilisation pendant la grossesse mène à des malformations congénitales par son effet tératogène, des retards développementaux et des déficits cognitifs (Meador 2008; Veroniki et al. 2017). Une large étude de 2013 sur tous les enfants danois nés entre 1996 et 2006 a rapporté un risque de 4,42% de diagnostic de TSA chez les enfants exposés au VPA pendant la grossesse (Christensen et al. 2013). Un facteur de risque

de 4 à 5 pour un diagnostic de TSA chez des enfants exposés au VPA pendant le stade fœtal est quant à lui retrouvé dans une étude française (Coste et al. 2020).

L'alimentation de la mère pendant la grossesse représente un autre facteur de risque pour les TSA. En effet, une absence de certains micro- et macronutriments ont notamment été mis en cause dans l'étiologie des TSA, comme les vitamines B1, B6, B12, A et D, le zinc, le chrome, le magnésium ou encore le fer. Une déficience de ce dernier par exemple, assez commune pendant la grossesse, est associée à une prévalence de TSA pour l'enfant cinq fois supérieure à la normale (Robea et al. 2020). Cette prévalence peut encore augmenter si d'autres facteurs de risque sont présents, comme une autre insuffisance ou déficience en micronutriments comme la vitamine D. Concernant l'insuffisance en vitamine D chez la femme enceinte, elle a été corrélée à une augmentation du risque de diagnostic de TSA associé à des DI chez l'enfant (Magnusson et al. 2016). De plus, une déficience de plusieurs vitamines, dont la vitamine D, est également retrouvée chez les patients atteints de TSA (Robea et al. 2020).

De façon intéressante, ces micro-nutriments semblent jouer un rôle sur le phénotype des patients atteints de TSA mais aussi sur celui de modèles animaux. Grabrucker et ses collaborateurs ont montré par exemple chez la souris qu'une déficience en zinc pendant la gestation avait un impact délétère sur la sociabilité, l'anxiété et la communication de la descendance à l'âge adulte (Grabrucker et al. 2016).

Malgré plusieurs inconsistances entre les études et des effets secondaires (pour revue, Robea et al. 2020), une étude récente a montré qu'une supplémentation en vitamine D et en acide docosahexaénoïque (DHA), acide gras (AG) polyinsaturé à longue chaîne (AGPI-LC), avait un effet bénéfique sur l'irritabilité et l'hyperactivité chez des enfants diagnostiqués avec des TSA (2,5 à 8 ans) (Mazahery et al. 2019). Une autre étude combinant du magnésium et la vitamine B6 avait permis, en 6 mois, d'augmenter la sociabilité chez des enfants âgés de 1 à 10 ans et diagnostiqués avec des TSA selon le DSM-IV (Mousain-Bosc et al. 2006).

L'exposition fœtale à des stéroïdes, tels que la testostérone et les estrogènes, et leur incidence dans l'étiologie des TSA fait débat (Ruigrok & Lai 2020). Pourtant essentiels pour le neurodéveloppement, des niveaux élevés de testostérone et d'estrogènes sont corrélés avec un risque d'apparition de TSA chez les personnes de sexe masculin (Auyeung et al. 2009; Baron-Cohen et al. 2015, 2020). Pourtant, à l'âge adulte, les hommes atteints de TSA présentent des niveaux de testostérone sanguins physiologique (Bejerot et al. 2012). De façon intéressante, il a été retrouvé dans cette même étude des niveaux de testostérone plus élevés chez les femmes avec des TSA. Les estrogènes sont reconnus pour leurs effets protecteurs face au vieillissement et aux maladies dégénératives mais aussi par leur implication dans les processus de synaptogénèse et corticogénèse (Russell et al. 2019; Sakamoto et al. 2003; Sasahara et al. 2007). Des niveaux réduits du récepteur à estrogènes bêta (ER-β), l'aromatase et de ses coactivateurs ont été retrouvés dans le gyrus frontal des patients avec des TSA. De plus, des corrélations ont été mises en évidence entre certains symptômes des TSA et la présence de *single nucleotide polymorphims* (SNP) sur des gènes codant pour des protéines liées à la synthèse, au transport et aux voies de transduction de stéroïdes sexuels comme le récepteur à estrogènes 2 (ESR2), le *cytochrome P450 family 17 fubfamily A member* 1 (CYP17A1) et le *cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1* (CYPB11B1) (Chakrabarti et al. 2009).

### b. Risques périnataux et néonataux

L'accouchement représente l'une des périodes les plus critiques. En effet, Gardener et ses collaborateurs, par le biais de méta-analyses, ont montré qu'une dizaine de facteurs obstétriques sur 60 étudiés, comme une détresse fœtale, une hémorragie maternelle, une naissance en été, un poids de naissance bas, une malformation congénitale, une anémie néonatale, ou encore l'hyper bilirubinémie, présentaient un lien avec un risque de développement de TSA (Gardener et al. 2009, 2011). L'accouchement par césarienne semble également augmenter la prévalence

de TSA (Wang et al., 2017). Néanmoins, d'autres n'y sont pas du tout associés comme l'anesthésie, une naissance après le terme de la grossesse et la circonférence de la tête (Gardener et al. 2009, 2011).

### c. Risques postnataux

Une exposition à des infections chez le nourrisson représente un facteur de risque de TSA. Plusieurs études ont montré qu'une infection lors du premier mois après la naissance, comme une méningite ou une otite, mais également des maladies virales infantiles comme la varicelle ou les oreillons, représentent un risque de diagnostic de TSA (Bittker & Bell 2018; Gardener et al. 2011; Rosen et al. 2007). En effet, ces agressions du système immunitaire ont un impact sur le système nerveux, que cela soit au niveau de la glie ou des neurones et de leurs systèmes de transmission et transduction (Meltzer & Van de Water 2017).

Tout comme leur mère, les nourrissons sont très sensibles aux composés chimiques présentés plus haut, comme les métaux lourds, qui provoquent une réaction inflammatoire et un stress oxydatif cérébral (Modabbernia et al. 2019; Rossignol et al. 2014). Le stress oxydatif peut notamment augmenter le risque des TSA, en perturbant le métabolisme énergétique et en provoquant de l'excitotoxicité dans les mitochondries, ce qui peut mener à une altération de la balance énergétique cérébrale (Napoli et al. 2013). De façon intéressante, des problèmes métaboliques et des dysfonctionnements mitochondriaux sont retrouvés chez les patients diagnostiqués avec des TSA (Rossignol & Frye 2012).

De nombreux autres facteurs peuvent avoir un impact sur les données épidémiologiques et étiologiques des TSA tels que les facteurs culturels et socio-économiques, l'origine ethnique, et l'âge maternel lors de la grossesse (Christensen et al. 2016; Wu et al. 2016). Très peu d'études se sont intéressées à l'influence de ces facteurs sur prévalence des TSA, mis à part des études américaines, souvent contradictoires, ne considérant pas les mêmes sous-types de TSA dans le

spectre de la pathologie et ne prenant pas en compte la grande variabilité de l'origine ethnique (pour revue, Newschaffer et al. 2007).

Les facteurs environnementaux sont capables d'altérer l'expression génétique par des mécanismes épigénétiques, sans pour autant provoquer de changements sur la séquence d'ADN. Ces mécanismes sont pluriels, par la méthylation de l'ADN, la modification des histones et des microARNs (miARN) et jouent un très grand rôle dans la prédisposition aux TSA (Herbert et al., 2010). Plusieurs études cliniques ont notamment identifié des régions spécifiques qui étaient différentiellement méthylées (*differentially methylated regions*, DMR), dans l'ADN des patients diagnostiqués avec des TSA (Nguyen et al. 2010; Wong et al. 2014). Pour aller plus loin, 596 DMR ont été retrouvées au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans le développement neuronal dans l'ADN placentaire des enfants diagnostiqués avec des TSA (Zhu et al. 2019). Deux de ces DMR, situés au niveau des gènes codant pour le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) et le récepteur 2 à l'insuline (IRS2), voient leur niveau de méthylation associé au diagnostic de TSA et au génotype dans les DMR pour CYP2E1 et au recours à des vitamines avant la grossesse pour IRS2 (Zhu et al. 2019).

## II. Les modèles animaux de TSA

Afin d'étudier la physiopathologie des TSA, des modèles animaux sont d'une grande utilité et sont complémentaires aux études cliniques. En effet, les modèles animaux présentent plusieurs avantages : (i) en modélisant les troubles, il est possible d'isoler une seule cause, génétique ou environnementale, (ii) ils permettent d'étudier les effets des différentes manipulations à de nombreux niveaux de détails : comportemental, anatomique, cellulaire, moléculaire et électrophysiologique, et ce, (iii) dès la période embryonnaire, afin d'étudier l'impact des TSA sur les processus neurodéveloppementaux.

Les TSA ayant une origine neurodéveloppementale et leurs symptômes étant visibles tôt dans l'enfance, il apparaît nécessaire de réaliser des études à des stades précoces pour en

déterminer les causes mais cela reste difficile à mettre en place chez l'Homme. Les études anatomiques par imagerie ont apporté un grand nombre d'informations mais des corrélations cellulaires et moléculaires ne sont possibles qu'en post-mortem (Courchesne 1997; D'Mello & Stoodley 2015). Les modèles animaux quant à eux, offrent la possibilité de mettre directement en évidence des réseaux neuronaux impliqués dans ces troubles mais également de tester des approches thérapeutiques à différents stades de développement.

Différents types de modèles animaux existent, parmi lesquels on retrouve en grande majorité les rongeurs, mais également le poisson zèbre permettant d'étudier les aspects génétiques des TSA mais également les effets de composés pharmacologiques visant à réduire la présence de symptômes comportementaux. Des modèles *in vitro* sont également utilisés pour étudier les processus cellulaires et des voies de signalisation jouant un rôle dans les TSA. Ces modèles regroupent les cultures cellulaires, les organoïdes et les cellules souches (Gordon & Geschwind 2020).

Les modèles murins sont donc très largement utilisés, particulièrement dans les TSA. Ces modèles ont leurs limites et certains comportements humains retrouvés chez les patients avec des TSA comme les troubles du langage et les DI, sont difficilement modélisables chez la souris ou le rat. À titre d'exemple, les vocalisations ultrasoniques chez les rongeurs ne représentent qu'une indication des déficits de langage.

Néanmoins, les modèles murins présentent des structures cérébrales homologues à l'Homme, même si le primate non humain reste le modèle le plus adéquat de ce point de vue. Les modèles murins permettent des manipulations génétiques et environnementales, une reproductibilité des résultats mais également des facilités d'ordre économique et temporel. D'après la SFARI, il existe actuellement 1353 modèles de souris de TSA.

C'est pourquoi dans cette partie, je m'attèlerai à présenter plusieurs exemples de modèles murins de TSA génétiques et environnementaux.

### A. Modèles génétiques

Une grande variété de modèles génétiques de TSA existe, basée sur les gènes mutés retrouvés chez les patients en clinique. Comme décrit précédemment, les gènes impliqués dans les TSA sont principalement liés à la formation et la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique, ainsi qu'aux mécanismes de plasticité neuronale. Selon la banque de données SFARI, on y retrouve des mutations de gènes syndromiques codant pour la protéine associée aux contactines 2 (CASPR2), la protéine de liaison aux îlots CpG méthylés 2 (MECP2), la protéine *fragile X messenger ribonucleoprotein 1* (FMR1), la protéine *SH3 and multiple ankyrin repeat domains* (SHANK3) et la protéine *tuberous sclerosis complex 1/2* (TSC1/2) mais également des gènes classés selon leur niveau d'implication dans les TSA : des gènes de haute confiance comme la sous-unité bêta 3 du récepteur GABA-A, des gènes candidats comme les contactines et les protéines associées aux contactines 3, 4 et 5 et enfin des gènes supposés comme la protéine de liaison aux acides gras 4 (*fatty acid binding protein 4*, FABP4) et les récepteurs aux lipoprotéines à basse densité (*low density lipoprotein receptor*, LDLR).

Les modèles animaux génétiques permettent d'isoler un gène et d'étudier les conséquences de sa mutation du niveau cellulaire et au niveau comportemental par le biais d'invalidation d'un gène (knock-out ou KO) ou bien par des mutations *de novo*. Des approches thérapeutiques peuvent alors être testées, par le biais de molécules pharmacologiques. Néanmoins, il est important de rappeler que l'étiologie génétique des TSA ne représente que 10% des cas cliniques approximativement (Bourgeron 2015). De plus, par leur hétérogénéité phénotypique et leur causes multifactorielles, la modélisation des TSA par une simple mutation d'un gène donné reproduit partiellement la complexité étiologique de la pathologie.

Ci-dessous, j'ai choisi de détailler les modèles murins syndromiques Shank3 et Cntnap2, deux modèles très étudiés dans le cadre des TSA.

### a. Shank3

Les protéines SHANK 1, 2 et 3, issues des gènes *Shank 1*, *2* et *3* respectivement, sont impliquées dans la formation de la synapse excitatrice et interagissent avec plus de 30 protéines synaptiques (Figure 4). Shank se révèle donc essentielle dans la transmission glutamatergique et les signaux neuronaux.

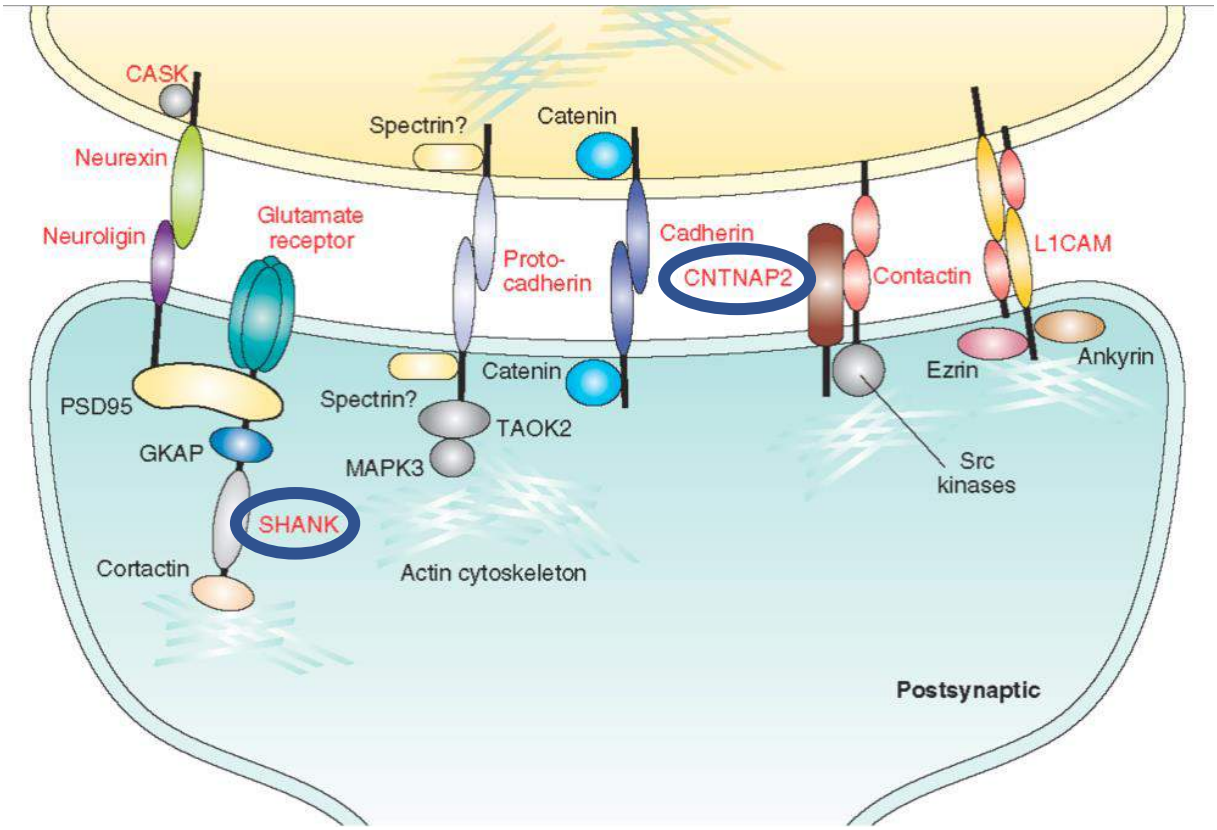



***Figure 4 : Différents types de molécules sont présentes à la synapse : des molécules d'adhésion, des protéines d'échafaudage, des protéines de cytosquelette, des molécules de signalisation***
*Parmi ces protéines, on retrouve SHANK3, qui fait partie des protéines d'échafaudage, et interagit avec les molécules d'adhésion, comme CNTNAP2. Ces protéines sont cruciales dans les TSA. L'expression des molécules d'adhésion peut déterminer la nature chimique des synapses et la signalisation en aval. L'expression et la localisation des molécules d'adhésion sont modulées par l'activité neuronale, ce qui mène à la régulation de la force synaptique et l'aménagement des composants synaptiques.*
*D'après Betancur et al. 2009*

Le modèle Shank3 a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années dans l'étude des TSA par la présence de déficits de sociabilité et la présence de comportements répétés et stéréotypés (Peça et al. 2011). En effet, comme décrit précédemment, des mutations de *Shank3* sont

retrouvées dans des formes syndromiques et non-syndromiques des TSA (Leblond et al. 2014). Néanmoins, il existe une multitude de modèles Shank3 et donc d'isoformes de la protéine, basés sur des délétions réalisées à différents endroits du gène *Shank3*, ce qui ne permet pas d'obtenir un phénotype unique avec ce modèle. Récemment, au sein de mon laboratoire, le modèle Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$, reposant sur la délétion de la partie C-terminale de l'exon 21 de Shank3 a permis de déterminer les différences phénotypiques, cellulaires et moléculaires entre les animaux homozygotes et hétérozygotes, ainsi qu'entre les animaux mâles et femelles (Matas et al. 2021). Cette délétion aboutit à un codon stop et plusieurs formes de Shank3 ne sont pas exprimées dont la protéine totale (Kouser et al. 2013). En effet, les animaux homozygotes présentent des altérations du comportement social, de la marche mais également une augmentation de stéréotypies de toilettage. Ces résultats phénotypiques sont associés à une perte de cellules de Purkinje (PC), les neurones de projection GABAergiques du cortex cérébelleux, et une expression réduite des récepteurs métabotropiques au glutamate de type 5 (mGluR5) dans le cervelet (Matas et al. 2021).

D'autres études ont montré que ce modèle présente également des comportements répétés ainsi que des altérations de l'apprentissage et de la mémoire (Speed et al. 2015). On retrouve également une morphologie anormale des épines dendritiques, une réduction de la réponse des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et un faible taux d'acétylation des histones dans le cortex préfrontal (Qin et al. 2018).

De ce fait, des études se sont tournées vers des approches thérapeutiques liées à l'épigénétique et au remodelage synaptique. En effet, en utilisant des inhibiteurs de l'histone déacétylase MS-275 ou des inhibiteurs de cofiline, des études ont montré une restauration du phénotype social et de l'activité des récepteurs NMDA (Duffney et al. 2015; Ma et al. 2018).

#### b. Cntnap2

Le gène *Cntnap2* code pour la protéine CASPR2. Celle-ci joue un rôle majeur dans le maintien de la synapse glutamatergique mais également dans l'organisation membranaire des canaux potassiques de type Kir dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (Figure 4) (Poliak et al. 1999).

Le modèle Cntnap2$^{-/-}$ et le lien avec une symptomatologie TSA ont été caractérisés par Peñagarikano et ses collaborateurs (Peñagarikano et al. 2011). Les souris Cntnap2$^{-/-}$ présentent un comportement en lien avec les symptômes majeurs de TSA, notamment des déficits sociaux, des stéréotypies motrices et des changements de vocalisations ultrasoniques (Peñagarikano et al. 2011; Scott et al. 2019). De façon intéressante, ces symptômes s'accompagnent d'épilepsie, une des comorbidités retrouvées chez les patients TSA (Peñagarikano et al. 2011). Il semblerait qu'au niveau cellulaire, une plus grande excitabilité des PC dans les régions crus I et II du cortex cérébelleux ainsi qu'une arborisation dendritique moins complexe soient retrouvées chez les animaux homozygotes (Fernández et al. 2021). De plus, certains processus de migration neuronale dans le cervelet se sont révélés anormaux chez les souris Cntnap2$^{-/-}$. En effet, les couches supérieures semblent ne pas pouvoir migrer dans les couches profondes du cervelet. De façon intéressante, ce modèle présente également une dysplasie néocorticale causée par une trop importante migration des neurones dans la couche I du cortex.

Dans un article paru cette année, il a été montré que les souris Cntnap2$^{-/-}$ présentent un retard dans le mouvement des pattes avant lors de la marche (Klibaite et al. 2022). Il semblerait donc que le modèle Cntnap2 présenterait des altérations de la motricité fine, notamment lors de la marche.

### B. Modèles environnementaux prénataux

De multiples modèles environnementaux des TSA existent, basés sur des facteurs environnementaux, qu'ils soient hormonaux, infectieux ou bien encore toxiques. Comme décrit

précédemment, la plus grande période de susceptibilité pour ces troubles est la grossesse, où le fœtus est fortement exposé à des risques de développement de troubles neurodéveloppementaux. Dans cette partie, j'ai fait le choix de présenter deux modèles d'exposition prénatale parmi les plus étudiés dans les TSA : le modèle polyinosinique-polycitydilique (poly I:C) et le modèle VPA.

### a. Acide polyinosinique-polycytidylique

Le modèle poly I:C est un modèle MIA qui, à l'instar du modèle d'exposition au lipopolysaccharide (LPS), repose sur une perturbation du système immunitaire maternel et de la descendance. En effet, le poly I:C et le LPS sont des composants viraux et bactériens respectivement, qui génèrent une réponse inflammatoire maternelle forte. Le LPS est un composant des bactéries à Gram négatif et représente une endotoxine pyrogène (Kirsten et al. 2013) qui va activer les récepteurs Toll-like 4 (TLR4) tandis que le poly I:C est un ARN double brin synthétique à la structure analogue de certains virus qui va activer les récepteurs Toll-like 3 (TLR3) (Meyer 2014). Ces deux récepteurs sont exprimées par la microglie, les astrocytes, les neurones et les lymphocytes NK (Muzio et al. 2000) et ces deux voies de signalisation génèrent une cascade inflammatoire avec des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 bêta (IL-1β), l'interleukine 6 (IL-6), *tumor necrosis factor alpha* (TNF-α) et l'interféron gamma (IFN- γ) (Figure 5) (Hameete et al. 2021; Lu et al. 2008; Shi et al. 2009).

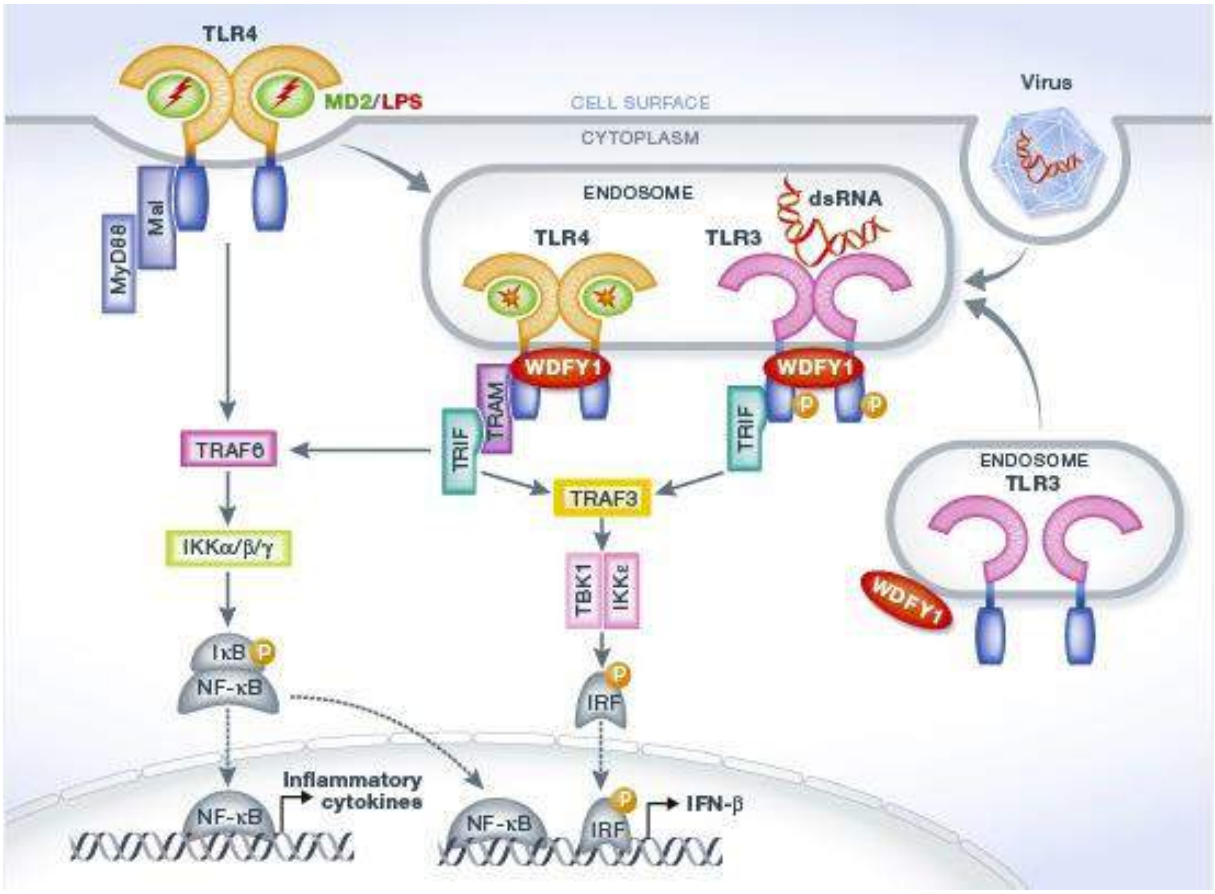



***Figure 5 : Voies de signalisation induites par des composés bactériens et viraux.***
*MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88; TRAF : TNF receptor-associated factor; IKK : inhibitor of kappa B (IκB) kinase; IκB : inhibitor of kappa B; NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; IRF : interferon regulatory factor; TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β; TRAM : TRIF-related adaptor molecule; TBK1 : TANK-binding kinase; TLR : Toll-like receptor; MD2 : myeloid differentiation factor 2 ; LPS : lipopolysaccharide; dsRNA : double stranded RNA*
*D'après Hu et al. 2015*

L'exposition forte *in utero* à ces molécules pro-inflammatoires comme l'IL-6 a montré leur implication dans la physiopathologie des TSA chez l'Homme et l'animal (Hameete et al. 2021; Patterson 2009, 2011; Smith et al. 2007; Wei et al. 2013). Le modèle poly I:C est particulièrement utilisé comme modèle dans les TSA et présente une bonne validité de construction, apparente et prédictive. En effet, son injection *in utero* comme le VPA cause des déficits sociaux, des mouvements et comportements répétés et stéréotypés, de l'anxiété, des troubles de la coordination sensorimotrice et de la communication mais également une dysbiose intestinale (Haida et al. 2019; Meyer et al. 2011; Naviaux et al. 2013; Patterson 2009; Schwartzer et al. 2013; Tartaglione et al. 2022; Xuan & Hampson 2014).

Ce modèle poly I:C montre également des caractéristiques histologiques similaires à celles retrouvées post-mortem chez l'Homme. En effet, une perte de neurones et notamment de PC dans le cervelet a été observée chez la souris exposée in utero au poly I:C (Naviaux et al. 2013; Shi et al. 2009). De plus, de précédents travaux sur ce modèle au sein du laboratoire ont permis d'identifier des différences entre les sexes au niveau de cette perte neuronale. En effet, chez les souris males exposées au poly I:C *in utero*, une baisse du nombre de PC dans les régions crus II et 7cb ont été retrouvées tandis que chez les femelles, la perte des PC est restreinte à la seule la région PM (Haida et al. 2019). Cette étude stéréologique a été complétée par une étude comportementale longitudinale qui a pu confirmer la présence de symptômes sociaux et moteurs caractéristiques de TSA, mais présents de façon modérée par rapport à d'autres modèles environnementaux comme le modèle VPA étudié au sein du laboratoire (Al Sagheer et al. 2018).

#### b. Acide valproïque

Le modèle murin VPA est celui que j'ai étudié le plus exhaustivement durant ma thèse. Comme décrit précédemment, le VPA est une molécule pharmacologique utilisée en traitement de l'épilepsie mais également dans les troubles bipolaires, et commercialisée sous le nom de Dépakine®.

Le VPA est un agoniste des récepteurs GABA-A (Löscher 2002). De ce fait, le VPA potentialise l'action inhibitrice dans certaines régions cérébrales, aux niveaux pré- et post-synaptiques, afin de contrôler la génération et la propagation des crises, ce qui résulte en un déséquilibre en faveur de l'inhibition et en défaveur de l'excitation. Néanmoins, le VPA n'agit pas seulement sur les récepteurs GABA-A et son action est région-dépendante, contrairement à d'autres composés pharmacologiques analogues au GABA, comme la tiagabine, qui agissent uniquement sur le système GABAergique dans la totalité du SNC (Löscher 2002).

Le VPA a également la capacité d'inhiber la GABA transaminase et d'activer l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et ce, dans plusieurs régions cérébrales chez le rat, dont le cervelet (Phillips & Fowler 1982). Il module également l'activité des transporteurs présents sur les cellules gliales et les terminaisons neuronales afin d'inhiber la recapture du GABA. Tous ces mécanismes mènent à une concentration importante de GABA au niveau de la synapse et donc à une augmentation de l'activité GABAergique et inhibitrice des neurones.

L'action du VPA n'est pas restreinte au système GABAergique. En effet, il a la capacité d'inhiber les canaux sodium voltage-dépendants présents sur les neurones glutamatergiques, ce qui va prohiber la génération de potentiels d'action et la libération de glutamate au niveau de la synapse (Löscher 2002). Dans une étude *in vitro* sur le néocortex de rat, il a également été montré que le VPA diminuait l'activité des récepteurs NMDA, ce qui contribue à l'inhibition des crises d'épilepsie (Zeise et al. 1991). En conséquence, l'activité glutamatergique est réduite, augmentant encore davantage le déséquilibre en faveur de l'inhibition et du système GABAergique.

D'autre part, le VPA possède également un rôle d'inhibiteur des histones déacétylases (HDAC) (Phiel et al. 2001). De ce fait, le VPA augmente l'acétylation des histones, des entités d'ADN compressé, ce qui promeut la transcription des gènes. Le VPA agit de façon non-sélective sur la grande majorité des classes d'HDAC, I-IV et de ce fait, sur une grande diversité d'expression de gènes liés au cycle cellulaire (Lloyd 2013). Ils peuvent par exemple promouvoir l'expression de *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), qui augmente l'apoptose et *homeobox A1* (Hoxa1), qui réduit la morphogenèse et la prolifération cellulaire (Ornoy 2009). D'autres gènes peuvent voir leur expression réduite comme le gène de la protéine kinase C (PKC), menant à une augmentation de la différentiation cellulaire au détriment de la croissance et finalement à l'apoptose (Sankar 2007). C'est pourquoi son utilisation peut être tératogène dans

certaines conditions, comme par le biais d'une hyperacétylation des histones H3 et H4 chez des embryons de xénope (Phiel et al. 2001).

Les différents mécanismes utilisés par le VPA démultiplient ses effets, ce qui explique notamment que son utilisation lors de périodes critiques provoque un large spectre de symptômes cliniques (Löscher 2002) (Figure 5).

Même si ce médicament ne présente aucun risque chez l'adulte, plusieurs études ont mis en lumière son effet tératogène pour le fœtus et leur lien avec les TSA (Moldrich et al. 2013; Phiel et al. 2001; Ranger & Ellenbroek 2016). En effet, sa prise durant la grossesse mène à des malformations congénitales, des retards développementaux et des problèmes cognitifs ainsi qu'à une augmentation du risque de TSA (Roullet et al. 2013). Les malformations du tube neural dues à une exposition *in utero* au VPA sont très fréquentes. Ainsi, la spina bifida est dix à vingt fois plus fréquente chez les fœtus exposés au VPA par rapport au reste de la population (Ornoy 2009).

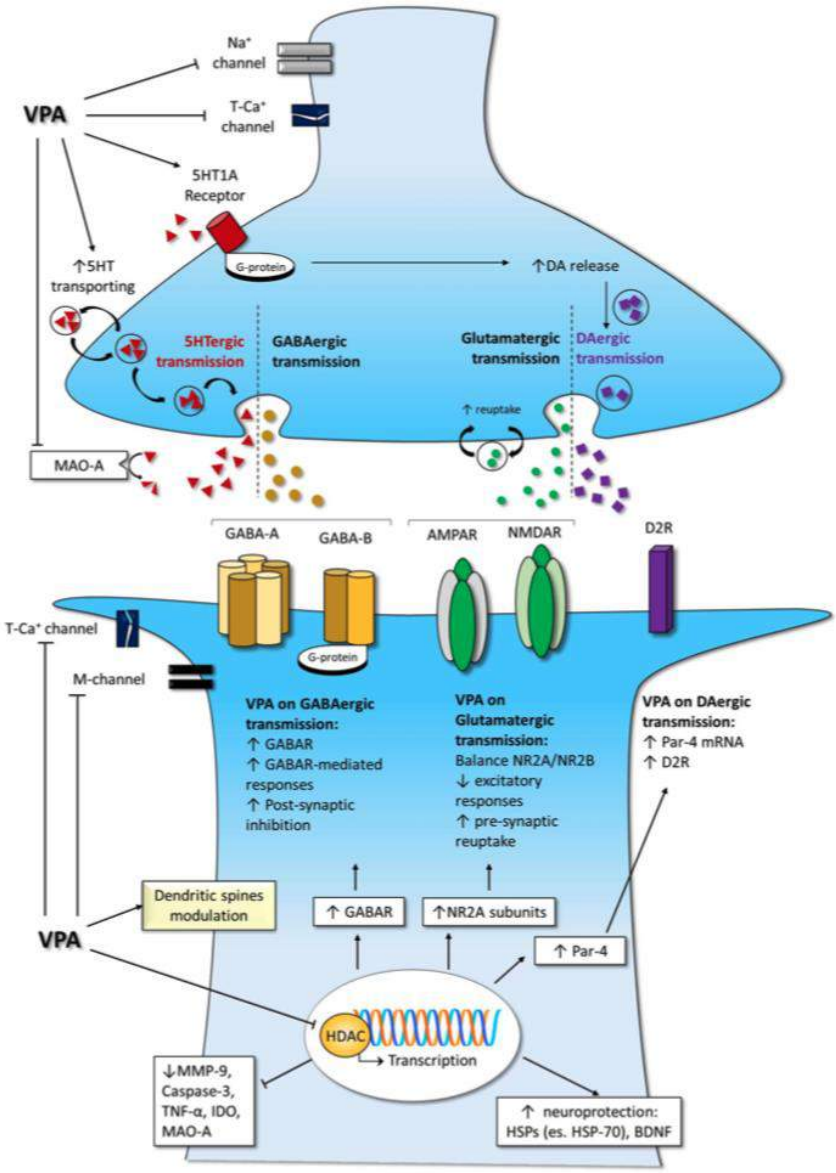



***Figure 6 : Mécanismes d'action de l'acide valproïque en pré et post-synaptique***

*L'acide valproïque potentialise l'activité GABAergique mais également d'autres systèmes aminergiques. Les canaux calciques et sodiques aux propriétés excitatrices sont inhibés tandis que les courants potassiques sont augmentés. Les mécanismes épigénétiques associés à l'acide valproïque comme l'inhibition des histones déacétylases influencent l'expression des récepteurs à la membrane et les voies liés à la neuroprotection.*

*AMPAR : récepteur α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid –AMPA-; BDNF : brain derived neurotrophic factor; DA : dopamine; D2R : récepteur dopaminergique D2; GABA : acide gamma-aminobutyrique; GABAR : récepteurs GABA; GABA-A : récepteur GABA type A; GABA-B : récepteur GABA type B; HSPs : heat shock proteins; HSP-70 : heat shock protein 70; $K^+$ : potassium; IDO : indoleamine 2,3 dioxygenase; MAO-A : mono-amines oxidase type A; M-channel : low-threshold noninactivating voltage-gated potassium current; MMP-9 : metalloproteinases-9; $Na^+$ channel : canaux sodiques; NMDAR : récepteur N-metyl-D-aspartate -NMDA-; NR2A : sous-unité 2A de NMDAR; NR2B : sous-unité 2B de NMDAR; Par-4 : prostate apoptosis response-4; T-$Ca^+$ channel : low-threshold T-calcium channel; TNF-α : tumor necrosis factor α; VPA : acide valproïque; 5HT : sérotonine.*

*D'après Romoli et al. 2019*

Le modèle VPA représente l'un des modèles environnementaux les plus utilisés afin de modéliser les TSA, par ses approches de validité de construction, apparente et prédictive (Bossu & Roux 2019; Mabunga et al. 2015; Nicolini & Fahnestock 2018) (Figure 6). Il existe actuellement plusieurs modèles, chez la souris et le rat, avec plusieurs concentrations de VPA injecté, du moment de l'injection et de la répétition d'injection, menant à un large éventail de symptômes retrouvés chez les patients TSA et notamment les deux symptômes caractéristiques des TSA : les altérations du comportement social et de communication ainsi que l'augmentation de comportements répétés. Ce modèle translationnel permet donc d'étudier les mécanismes phénotypiques des TSA, leur corrélats cellulaires et moléculaires et de tester des voies thérapeutiques. La concentration de VPA utilisée varie entre 300 et 800mg/kg et est réalisée entre les jours embryonnaires 9 à 12.5 (E9 à E12.5). La dose ayant montré des effets sur le comportement et la migration cellulaire sans effets toxiques pour la femelle gestante est de 500mg/kg environ. Les déficits sociaux, dans la communication et l'interaction, sont quant à eux dose-dépendants (Servadio et al. 2018). L'injection de VPA au jour E12.5 reste la plus utilisée car il a été montré que les souris et les rats exposés à ce temps gestationnel présentaient des altérations comportementales de type TSA, notamment au niveau social (Kataoka et al. 2013; Kim et al. 2011). Ce moment de l'embryogenèse correspond au développement des 5 vésicules alors que le tube neural est déjà fermé.

Les conséquences du VPA ne sont pas seulement phénotypiques, on retrouve notamment dans le cervelet une perte des PC chez le rat et la souris (Al Sagheer et al. 2018; Main & Kulesza 2017), comme ce qui est décrit chez l'Homme (Bailey et al. 2013; Bauman & Kemper 2005; Courchesne 1997; Fatemi et al. 2002).

Le modèle VPA ne représente pas un modèle inflammatoire en essence, mais de multiples études ont montré qu'une injection *in utero* allant de 400 à 800mg/kg, chez des rats et souris de

plusieurs fonds génétiques, donnait lieu à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires chez la souris adulte (pour revue, Deckmann et al. 2018).

Les différents modèles VPA existants ainsi que d'autres modèles environnementaux de TSA ne sont pas détaillés dans cette partie mais ont largement été présentés récemment dans la revue à laquelle j'ai participé et qui est incluse dans ce manuscrit (Thabault et al. 2022).

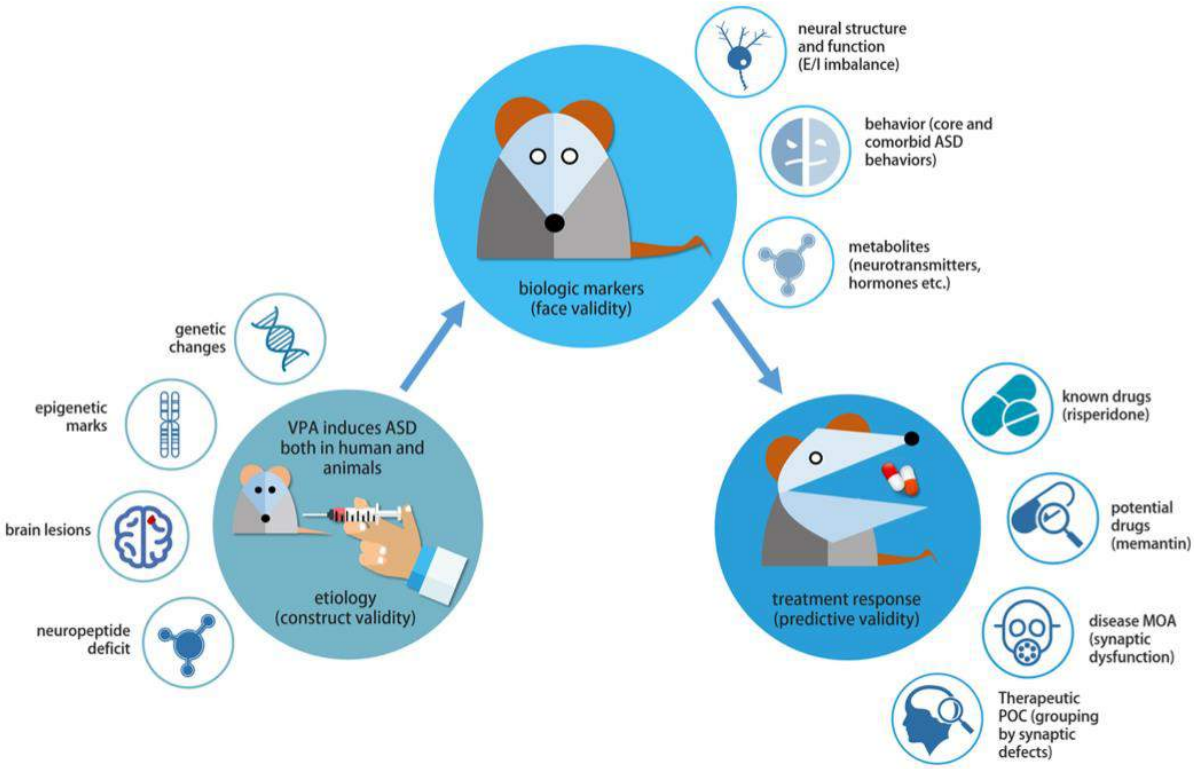



***Figure 7 : La validité du modèle murin à l'acide valproïque***
*La validité de construction (induire la pathologie de manière similaire aux conditions cliniques), la validité apparente symptômes similaires à ceux observés en clinique), et la validité prédictive (possibilité de translation des pistes thérapeutiques de la pré-clinique vers la clinique) sont toutes présentes dans le modèle VPA qui constitue donc un modèle pertinent pour explorer les TSA.*
*MOA : mécanismes d'action; POC : preuve de concept.*
*D'après Mabunga et al. 2015*

# CHAPITRE 2 : Le cervelet

## I. Rôle et anatomie fonctionnelle du cervelet

### A. Fonctions du cervelet

Le cervelet est une structure présente chez tous les vertébrés, longtemps exclusivement considérée pour ses fonctions liées à la coordination et au contrôle des mouvements. De nombreuses études d'imagerie fonctionnelle ont permis de montrer une connexion importante entre le cortex cérébelleux et les régions corticales et sous corticales, notamment dans le traitement de l'information sensorielle motrice (Allen et al. 1997). Cette transmission nerveuse se fait par le biais des noyaux cérébelleux profonds, comme le noyau fastigial, qui effectue un relais sur le thalamus ventral pour ensuite arriver au cortex moteur et réaliser l'action motrice en tenant compte de l'information sensorielle cérébelleuse (Ito 1984). Son implication dans les fonctions cognitives n'a été proposée puis démontrée que plus récemment, dans les années 80 et 90, notamment dans la régulation des émotions, qui n'était jusque-là réservée qu'au cortex et aux ganglions de la base (Middleton & Strick 1994) mais aussi dans les processus liés à la mémoire, la planification et le langage (pour revue, Schmahmann 2019). Par rapport au cortex, le cervelet est dix fois plus rapide dans l'exécution des taches, aussi précises soient-elles (D'Angelo 2018). Le cervelet joue en effet un rôle important dans la perception spatio-temporelle dans le cadre de la réalisation des taches motrices, notamment par son rôle intégratif sensorimoteur. Les processus d'apprentissage dépendants du temps sont notamment corrélés à l'activité électrophysiologique spécifique du cervelet (D'Angelo et al. 2009). En effet, les PC, des neurones GABAergiques représentant la seule sortie du cortex cérébelleux, génèrent des réponses de type « burst », qui permettent d'encoder la prédiction de l'état moteur en cours (D'Angelo 2018).

C'est pourquoi dans cette partie sera étudiée extensivement le cervelet, son implication dans les réseaux sensorimoteurs et cognitifs, ainsi que son lien avec la physiopathologie des TSA, avec des exemples chez l'Homme et dans les modèles animaux.

## B. Morphologie et anatomie fonctionnelle

### a. Le cortex cérébelleux

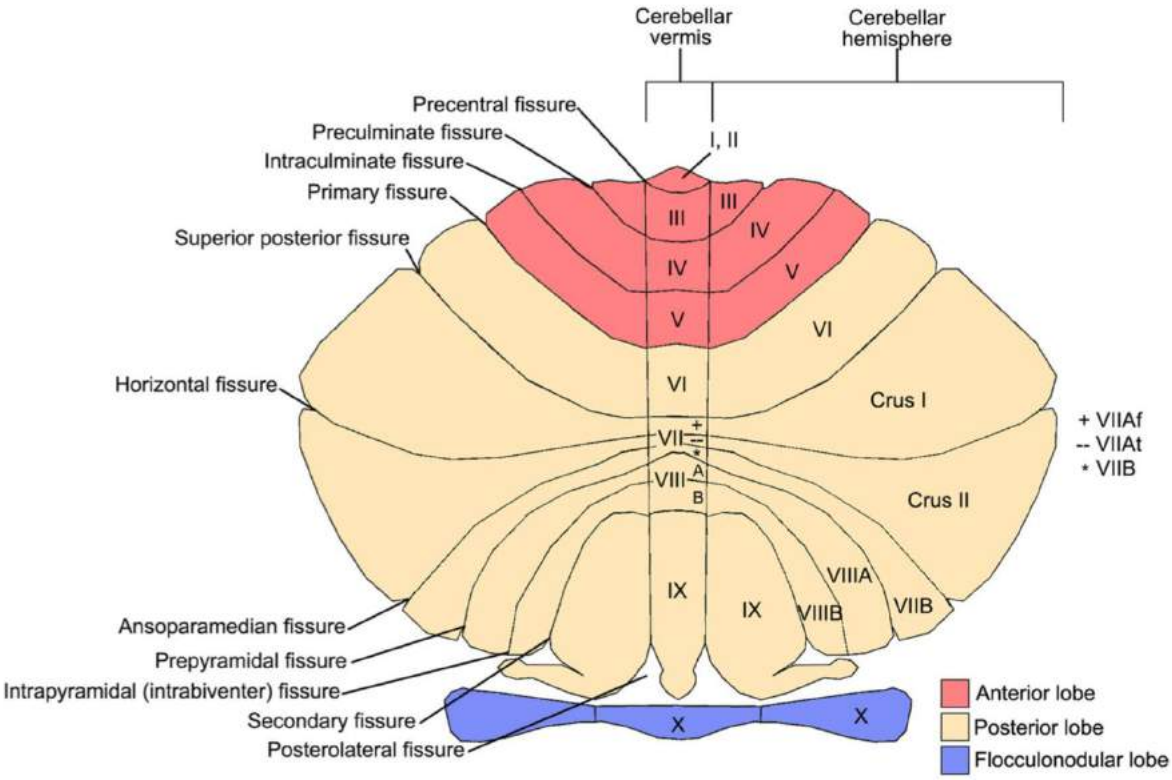



***Figure 8 : Anatomie du cervelet montrant les fissures principales, les lobes et les lobules***
*Adapté de D'Mello & Stoodley 2015*

Le cervelet est composé du cortex cérébelleux et des noyaux profonds du cervelet. Nous nous intéressons ici majoritairement au cortex cérébelleux, qui est composé d'une partie centrale, appelée le vermis, une partie intermédiaire, le paravermis, et de deux hémisphères latéraux (Figure 7). On appelle cérébro-cervelet la partie correspondant aux hémisphères latéraux, qui est fonctionnellement connectée au cortex notamment, tandis que le spino-cervelet est connecté à la moelle épinière, et correspond aux parties médianes du cervelet, le vermis et le paravermis.

L’organisation anatomique et fonctionnelle du cervelet est basée sur son agencement lobulaire. Trois lobes, séparés par des fissures transverses, constituent le cortex cérébelleux : le cervelet vestibulaire ou vestibulo-cervelet, le cervelet postérieur et le cervelet antérieur. Ces structures sont divisées anatomiquement par des foliations, et sont appelées des lobules numérotés de I à X. Le cervelet antérieur correspond aux lobules I-V, le cervelet postérieur aux lobules VI-IX, et finalement le cervelet vestibulaire au lobule X ou flocculonodulaire (Figure 7).

Le lobule flocculonodulaire est également appelé vestibulo-cervelet par ses connexions avec le système vestibulaire et les aires visuelles. Il contribue aux fonctions de l’équilibre et de l’orientation spatiale. Ce lobe est composé d’un nodule médian, participant au contrôle musculaire axial, et de deux flocculi latéraux, qui sont liés au contrôle oculaire. D’un point de vue évolutif, c’est la plus ancienne partie du cervelet chez les vertébrés.

De façon intéressante, le cervelet antérieur est davantage relié aux fonctions motrices tandis que les fonctions cognitives sont en lien avec le lobe postérieur. En effet, le lobe antérieur fait le lien entre le système sensitif et les fonctions motrices, afin d’ajuster à tout moment les mouvements, la posture et l’équilibre. Il reçoit des informations du corps, des membres et des systèmes auditifs et visuels puis projette, par le biais de relais synaptiques, sur le cortex et la moelle épinière, afin de moduler la commande motrice. Le lobe postérieur est quant à lui, le plus évolué du cervelet, et est d’ailleurs très développé chez l’Homme. Il possède des afférences du cortex cérébelleux et projette sur le thalamus. Ses fonctions sont liées à la planification des mouvements, l’apprentissage moteur, le langage, la gestion des émotions ainsi qu’à d’autres fonctions sociales et cognitives (D’Mello & Stoodley 2015).

Le lobule VII, et plus spécifiquement crus I et crus II, sont des régions situées dans le lobe postérieur, qui sont notamment impliquées dans des taches sensorimotrices et sociales, affectées dans les TSA (pour revue, Thabault et al. 2022). Les régions humaines crus I et crus

II sont homologues à celles des primates non-humains. De façon intéressante, chez le rongeur, la région crus I correspond aux crus I et crus II des primates et le crus II à la région HVIIB (Sugihara 2018).

### b. Les noyaux cérébelleux profonds

Chaque région anatomique du cortex cérébelleux est reliée spécifiquement à des noyaux cérébelleux profonds (Figure 8). En effet, le vermis est connecté au noyau fastigial, le paravermis aux noyaux interposés, c'est-à-dire le noyau emboliforme et le noyau globuleux, tandis que les hémisphères latéraux sont reliés au noyau dentelé. Il existe également le noyau vestibulaire de Deiters, qui, malgré sa localisation au niveau du tronc cérébral, reçoit des afférences directes du lobule flocculonodulaire, et peut donc être considéré dans cette catégorie.

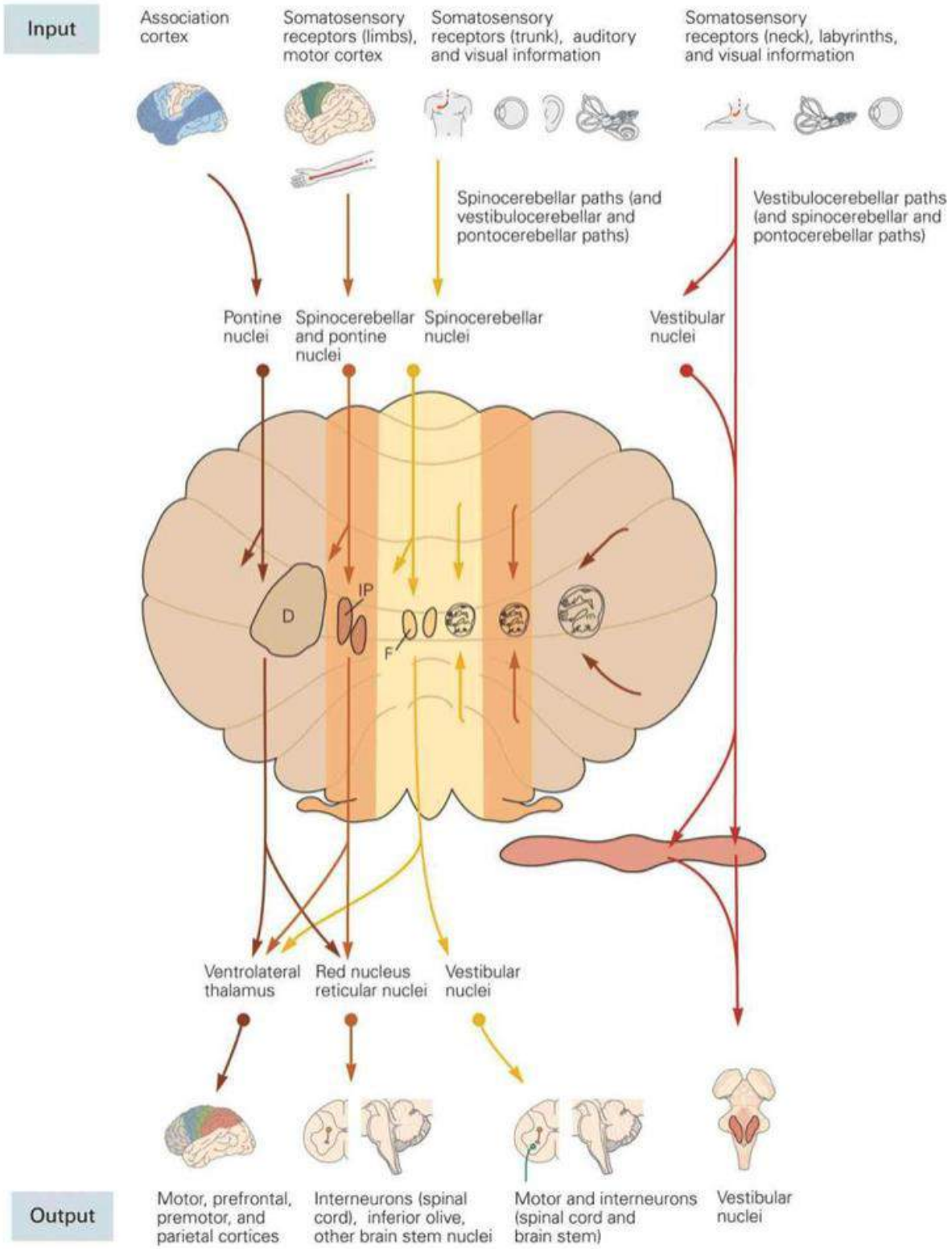



***Figure 9 : Les afférences et efférences des noyaux cérébelleux profonds***
*D'après Kandel et al. 2012*

## C. Organisation cellulaire du cervelet

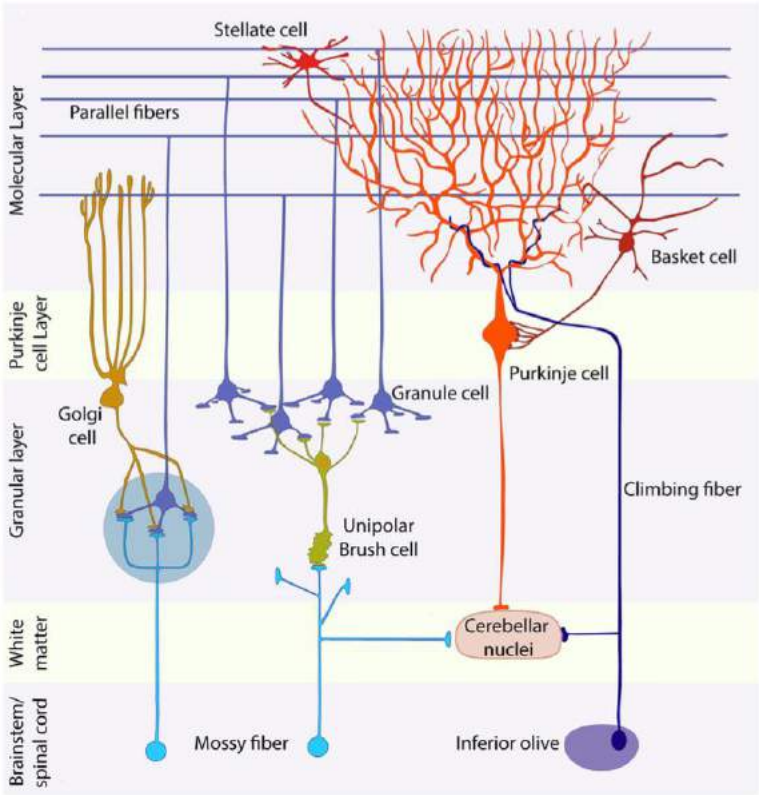



***Figure 10 : Organisation cellulaire du cervelet***
*D'après Consalez et al. 2020*

Le cortex cérébelleux est divisé en trois couches de la substance blanche jusqu'à la surface : (i) la couche granulaire, (ii) la couche des PC et (iii) la couche moléculaire. Chaque couche contient des types cellulaires spécifiques, ce qui permet d'associer les cellules à leur localisation dans le cervelet (Figure 9).

### a. La couche granulaire

#### i. Les cellules granulaires

Les cellules granulaires (GC) représentent la population cellulaire majoritaire de cette couche, mais également la plus nombreuse de tout le cerveau. En effet, le nombre de GC dans le cervelet serait de l'ordre de $10^{10}$-$10^{11}$, ce qui représente plus de 50% du nombre de neurones du cerveau (Braitenberg & Atwood 1958). Les GC sont glutamatergiques et reçoivent des

afférences des fibres moussues (FM) provenant des noyaux vestibulaires mais également des cellules de Golgi. Les GC projettent à leur tour par le biais de fibres parallèles (FP) sur les dendrites des PC. De façon intéressante, une FP peut faire synapse avec cent PC.

### ii. Les cellules de Golgi

Les cellules de Golgi sont les principales représentantes des neurones inhibiteurs de la couche granulaire (Dieudonné 2016). Elles peuvent inhiber les GC de façon directe et les fibres moussues en agissant sur leur activité pré-synpatique (Mitchell & Silver 2000). Les cellules de Golgi reçoivent des afférences excitatrices des GC, soit directement par les axones des GC ou indirectement par les FP. Les cellules de Golgi peuvent également recevoir des afférences inhibitrices des cellules de Lugaro et d'autres cellules de Golgi (Hull & Regehr 2012).

### iii. Autres cellules

Il existe dans la couche granulaire du cervelet d'autres cellules qui sont peu étudiées et de ce fait, très peu de choses sont connues de ces types cellulaires.

Les cellules de Lugaro sont des neurones aux propriétés inhibitrices, par le biais de GABA et de la glycine, qui peuvent inhiber les cellules de Golgi (Hirono 2016).

Les cellules unipolaires à brosse (UBC) sont des interneurones quasi exclusivement présents dans le cervelet vestibulaire qui interagissent localement avec les GC et les cellules de Golgi (Mugnaini et al. 1997). Ces cellules ne possèdent qu'un seul, mais très large dendrite, qui reçoit une très importante synapse excitatrice d'une seule FM. Elles forment des synapses dendrodendritiques avec les GC et reçoivent très peu d'afférences inhibitrices de la part des cellules de Golgi. Les UBC peuvent également connecter les GC et d'autres UBC par le biais d'autres FM (Mugnaini et al. 2011).

### b. La couche des cellules de Purkinje

#### i. Les cellules de Purkinje

Les PC sont des neurones GABAergiques, représentant la seule voie de sortie du cortex cérébelleux. Leurs axones inhibiteurs passent à travers la couche granulaire pour atteindre leur cible : les noyaux cérébelleux profonds. Les PC sont caractérisées par leur large soma et leur arborisation dendritique complexe. Chaque PC reçoit des informations provenant de plus de 200 000 synapses avec des FP et les projections d'une seule fibre grimpante (FG) provenant de l'olive inférieure. Ces innervations complexes promeuvent les PC comme un centre d'intégration du cortex cérébelleux sujet à la plasticité synaptique. En effet, les FG peuvent notamment générer une dépression à long terme (LTD), ce qui peut réduire la conductance synaptique des récepteurs post-synaptiques AMPA et rendre silencieuses certaines projections de FP (Hansel et al. 2001; Hansel & Linden 2000; Linden et al. 1991; Schonewille et al. 2011). Les PC peuvent être inhibées à différents endroits par les cellules présentes dans la couche moléculaire, comme les cellules étoilées (dendrites) et les cellules en panier (soma et segment para-initial) (Santamaria et al. 2007). De façon intéressante, les PC ont également la possibilité d'inhiber d'autres PC et des GC (Guo et al. 2016; Witter et al. 2016).

Comme décrit précédemment, les PC permettent d'encoder la temporalité de l'action au niveau électrophysiologique, par une décharge de potentiels d'actions régulière et en « burst » (Masoli & D′Angelo 2017).

La revue réalisée au cours de cette thèse et incluse dans ce manuscrit présente notamment les liens entre des pertes de PC et les TSA, chez l'Homme et l'animal (Thabault et al. 2022).

### ii. Les cellules de Bergmann

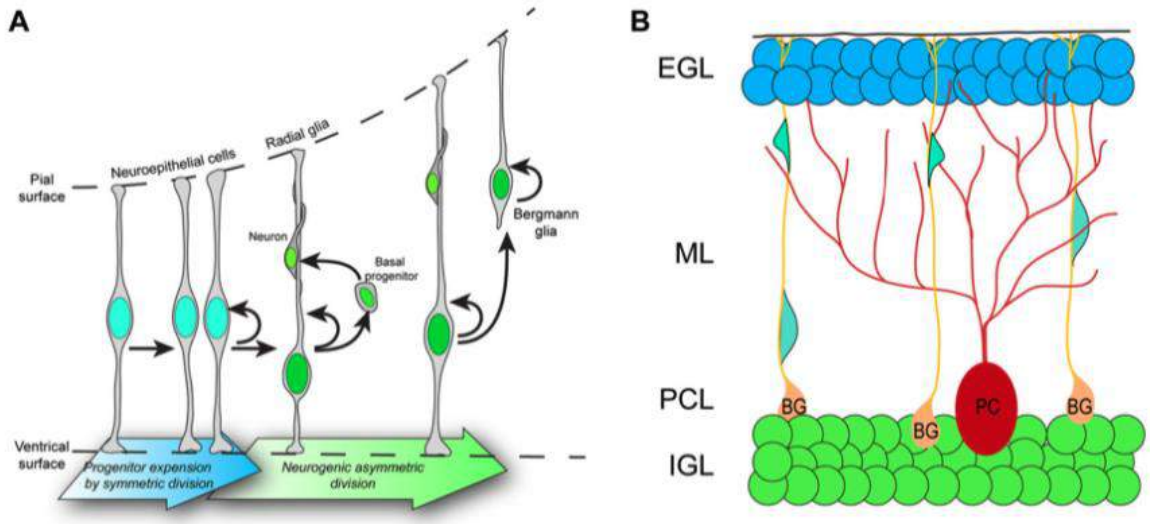



***Figure 11 : Processus de neurogenèse de la glie de Bergmann (BG) dans le cervelet pendant le développement embryonnaire et localisation des BG dans le développement périnatal***
***(A)*** *Les progéniteurs des BG vont passer par plusieurs étapes de division, prolifération et maturation pour donner les BG.* ***(B)*** *Les progéniteurs des cellules granulaires (GC) qui proviennent de la couche granulaire externe (EGL) migrent le long des BG vers la couche granulaire interne (IGL) pour maturer en GC.*
*Adapté de Leung & Li 2018*

Les cellules de Bergmann ou glie de Bergmann (BG) représentent un type d'astrocyte radiaire, des cellules gliales unipolaires situées auprès des PC (Reeber et al. 2018). Les précurseurs des BG proviennent de la glie radiaire, située dans la zone ventriculaire cérébelleuse (Figure 10A) (Leto et al. 2016). Par ses multiples fonctions, les BG représentent des éléments cruciaux du neurodéveloppement. En effet, elles font office de soutien structural pour la migration des neurones. Leurs fibres radiaires s'étendent jusqu'à la couche moléculaire (Buffo & Rossi 2013), et permettent la migration des neurones, notamment les précurseurs des GC, mais également l'élongation des prolongements de ces derniers (Figure 10B) (Buffo & Rossi 2013; de Blas 1984; Yamada & Watanabe 2002; Yuasa 1996). Les BG permettent ainsi une migration et un placement structurés des GC et des PC, menant à la foliation et à l'organisation cellulaire du cervelet (Leung & Li 2018). De plus, les BG entourent les synapses sur les dendrites des PC et sont impliquées dans les processus de plasticité, notamment par le

biais de la LTD. Elles jouent donc un rôle de premier plan dans l'intégration des informations dans le cervelet, par cette participation à l'activité synaptique des neurones mais également à l'intégrité structurale (Cui et al. 2001; Iino et al. 2001; Yamada & Watanabe 2002). De façon intéressante, les BG jouent un rôle fondamental dans l'homéostasie glutamatergique et l'une des causes les plus communes de mort neuronale est liée à un niveau élevé de glutamate extracellulaire, anormalité retrouvée chez les patients diagnostiqués avec des TSA (Essa et al. 2013; Purcell et al. 2001). Il a notamment été proposé que des modifications de ces cellules astrogliales seraient responsables de la perte de PC observée dans les TSA. Leurs prolongements au niveau de la synapse permettent la recapture du glutamate extracellulaire et ainsi la régulation des synapses des fibres grimpantes et parallèles avec les PC. Lorsque des souris sont déficientes en transporteurs glutamatergiques GLAST associés aux BG, elles présentent des problèmes de coordination mais également une plus grande innervation des PC par les FG (Iino et al. 2001; Watase et al. 1998). De plus, les antagonistes glutamatergiques ont montré une certaine efficacité dans la réduction des symptômes de TSA (Zimmerman 2000). Des gènes majoritairement liés à la transmission glutamatergique et également exprimés par les BG sont associés à un risque de TSA (Koirala & Corfas 2010). Il semble également que les BG, avec la microglie, jouent un rôle majeur dans la physiopathologie des TSA, notamment par leur rôle dans les processus inflammatoires. Dans la revue intégrée à ce manuscrit, il est par ailleurs détaillé qu'une forte prolifération ainsi qu'une forte activation astrogliale est retrouvée chez l'Homme adulte atteint de TSA mais également dans plusieurs modèles animaux de la pathologie tels que la souris Fmr1$^{-/-}$ et le rat VPA (Bailey et al. 2013; Ellegood et al. 2010; Sobaniec-Lotowska 2001; Vargas et al. 2005; pour revue, Thabault et al. 2022). De plus, les BG sont activées et prolifèrent dans les régions de pertes de PC, ce qui remet les PC au centre de la physiopathologie des TSA. En effet, les marqueurs retrouvés dans le compartiment périneural des PC soulèvent l'hypothèse d'une implication du système du complément dans les

voies immunopathogènes, à l'instar de ce qui est rapporté dans les maladies neurodégénératives. Ces résultats indiquent que les anomalies cérébelleuses trouvées chez les patients atteints de TSA pourraient être dues non seulement à des atteintes du développement prénatal, mais également à des processus neuro-inflammatoires chroniques médiés par la glie persistant tout au long de la vie.

#### c. La couche moléculaire

La couche moléculaire représente la couche cellulaire la moins dense, ne contenant que deux types cellulaires : les cellules étoilées et les cellules en panier.

Les cellules étoilées et les cellules en panier sont des interneurones inhibiteurs qui sont activés par les FP. Ces deux types cellulaires partagent les mêmes propriétés électrophysiologiques, notamment un patron de décharge à activité spontanée tout comme les PC. La cible de leur axone inhibiteur est identique, les PC, mais diffèrent par leur point de contact : les cellules en panier font synapse sur le soma et le segment para-initial des PC tandis que l'axone des cellules étoilées se positionne sur les dendrites. Les cellules étoilées peuvent notamment modifier le type de réponse des PC et réguler la LTD au niveau de la synapse entre FP et PC (Herzfeld et al. 2015; Mittmann & Häusser 2007).

### D. Organisation cellulaire des noyaux cérébelleux profonds

Les PC présentes dans le cortex cérébelleux inhibent l'activité des principaux neurones des noyaux cérébelleux profonds, c'est-à-dire en grande majorité les neurones glutamatergiques qui projettent en dehors du cervelet mais également des interneurones GABAergiques et glycinergiques projetant vers l'olive inférieure et la couche granulaire respectivement (Jaeger 2011). Ces neurones reçoivent également des afférences excitatrices collatérales des fibres moussues.

# II. Réseaux cérébelleux

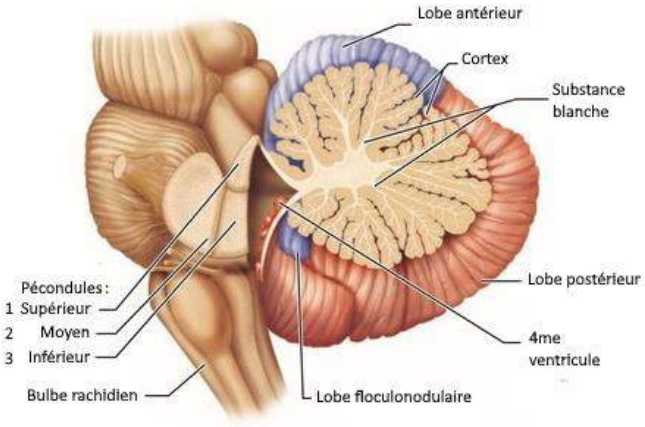



***Figure 12 : Anatomie en coupe sagittale du cervelet***
*Organisation lobulaire du cervelet et des pédoncules cérébelleux*
*Adapté de Kandel et al. 2012*

Les pédoncules cérébelleux sont de larges faisceaux permettant la liaison entre le cervelet et d'autres régions du SNC (Figure 11). Ils sont au nombre de trois : (i) le pédoncule cérébelleux supérieur représente une voie efférente du cervelet, (ii) le pédoncule cérébelleux moyen représente une voie afférente du cervelet et (iii) le pédoncule cérébelleux inférieur représente à la fois une voie efférente et une voie afférente du cervelet (Kandel et al. 2012).

## A. <u>Afférences cérébelleuses</u>

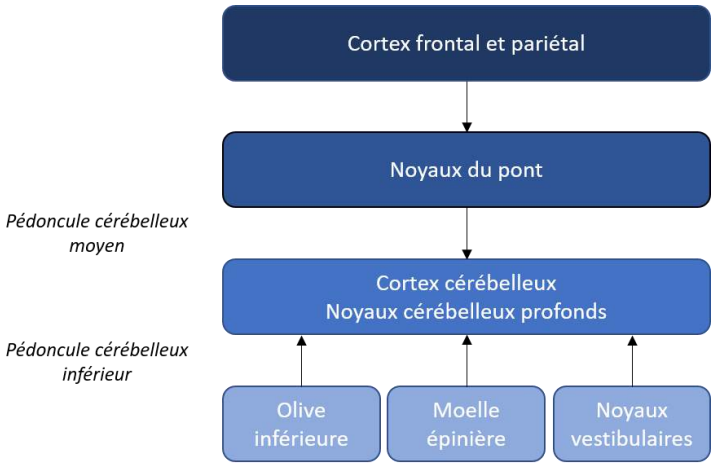



***Figure 13 : Afférences cérébelleuses***
*Adapté de Kandel et al. 2012*

Les afférences provenant du cortex sur le cervelet et plus précisément sur le cérébro-cervelet sont les plus nombreuses. Différentes régions corticales sont concernées comme le cortex moteur primaire, les aires prémotrices du lobe frontal, les cortex somesthésiques primaire et secondaire du lobe pariétal antérieur mais également des aires visuelles secondaires du lobe pariétal postérieur. Les afférences corticales se relaient au niveau des noyaux du pont du côté ipsilatéral, où les fibres pontiques vont ensuite décusser et former le pédoncule cérébelleux moyen, qui va transmettre ces informations sensorimotrices à l'hémisphère cérébelleux controlatéral (Kandel et al. 2012) (Figure 12).

D'autres afférences existent et sont cruciales dans l'intégration cérébelleuse. Certaines proviennent des noyaux du tronc cérébral et de la moelle épinière, et projettent sur le vermis du cortex cérébelleux, permettant de renseigner sur les fonctions auditives et visuelles. Il existe également des afférences sensorielles vestibulaires directes, provenant des fibres du nerf auditif et du pont. Celles-ci projettent sur le vestibulo-cervelet, contrairement aux afférences somesthésiques proprioceptives, qui projettent sur le spino-cervelet. Ces afférences proviennent de différents noyaux :

- Le noyau de Clarke de la moelle épinière, relié à la proprioception des membres inférieurs
- Le noyau cunéiforme du bas bulbe, relié à la proprioception des membres supérieurs
- Le noyau mésencéphalique du complexe trigéminal, relié à la proprioception du visage et de la tête.

Il existe également des afférences modulatrices provenant de l'olive inférieure et du locus coeruleus, cruciales dans l'apprentissage et la mémoire des circuits cérébelleux (Kandel et al. 2012) (Figure 12).

## B. Efférences cérébelleuses

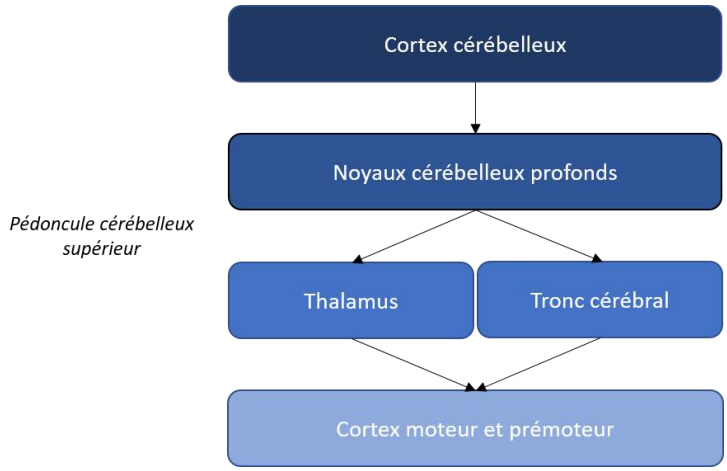



***Figure 14 : Efférences cérébelleuses***
*Adapté de Kandel et al. 2012*

Le cortex cérébelleux projette dans un premier temps sur les noyaux cérébelleux profonds par le biais des PC inhibitrices, représentant la seule voie de sortie du cortex cérébelleux. Ces noyaux vont ensuite se relayer dans le tronc cérébral ou le thalamus afin d'atteindre les neurones du cortex et réguler l'activité motrice (Kandel et al. 2012) (Figure 13).

De nombreux types d'efférences existent (Figure 14) :

- Les efférences cérébro-cérébelleuses provenant du noyau dentelé projettent majoritairement sur les aires prémotrices et associatives du lobe frontal en faisant relais sur le thalamus ventro-latéral, afin de moduler la planification des mouvements volontaires. Il existe également des efférences provenant du cérébro-cervelet et dirigées vers le cortex préfrontal afin de réguler des fonctions cognitives.
- Les efférences spino-cérébelleuses provenant du noyau fastigial (efférences vermiennes) et des noyaux interposés (efférences para-vermiennes) projettent sur les neurones supra-segmentaires du cortex moteur et du tronc cérébral et permettent l'exécution des mouvements.

- Les efférences vestibulo-cérébelleuses provenant du vestibulo-cervelet projettent sur les motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral afin de moduler l'équilibre, les mouvements oculomoteurs, de la tête et du cou.

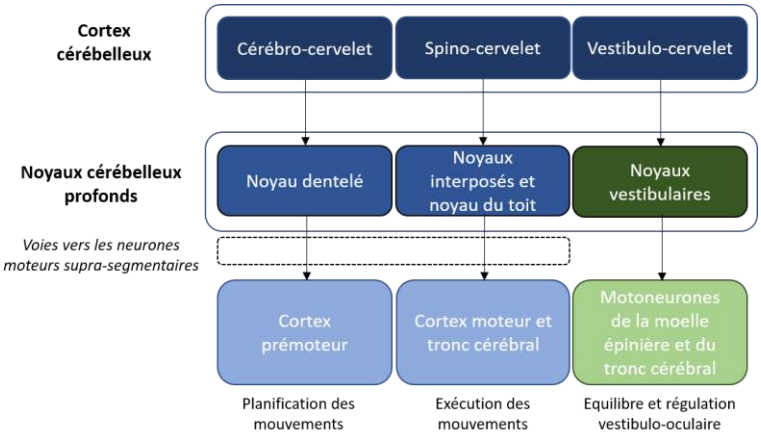



***Figure 15 : Efférences et fonctions reliées au cérébro-cervelet, au spino-cervelet et au vestibulo-cervelet***
*Adapté de Kandel et al. 2012*

### C. Réseaux cérébelleux internes

Par la grande diversité des afférences et efférences cérébelleuses, d'un point de vue fonctionnel mais également structural, le cervelet joue un rôle intégratif crucial (Kandel et al. 2012) (Figure 15). Le cortex cérébelleux reçoit des informations par le biais de deux types de voies et deux types de fibres :

(i) Les FM : du cortex cérébral par le biais des noyaux du pont, du tronc cérébral mais également de la moelle épinière par le biais des voies spinocérébelleuses dorsale et ventrale.

(ii) Les FG : de plusieurs noyaux du tronc cérébral, et majoritairement de l'olive inférieure.

Les FM et les FG représentent les deux voies d'entrée du cervelet. Les fibres moussues activent les GC et les cellules de Golgi, et à leur tour les GC projettent un troisième type de fibres, les FP, permettant d'activer tous les autres neurones présents dans le cortex cérébelleux.

Ainsi, les cellules de Golgi peuvent être activées par les FM mais également par les FP, ce qui leur permet de réguler l'activité des GC, en les inhibant, tout comme les cellules de Lugaro et les UBC. Les PC sont également activées par les FP mais également par des FG provenant de l'olive inférieure, et projettent sur les noyaux cérébelleux profonds en retour. Les PC peuvent être inhibées par les cellules étoilées et en panier.

Ces processus cérébelleux internes sont d'une importance capitale dans la physiologie du cervelet, et se mettent en place dès la période périnatale, pour atteindre un réseau mature dans les premières années de vie (Wang et al. 2014).

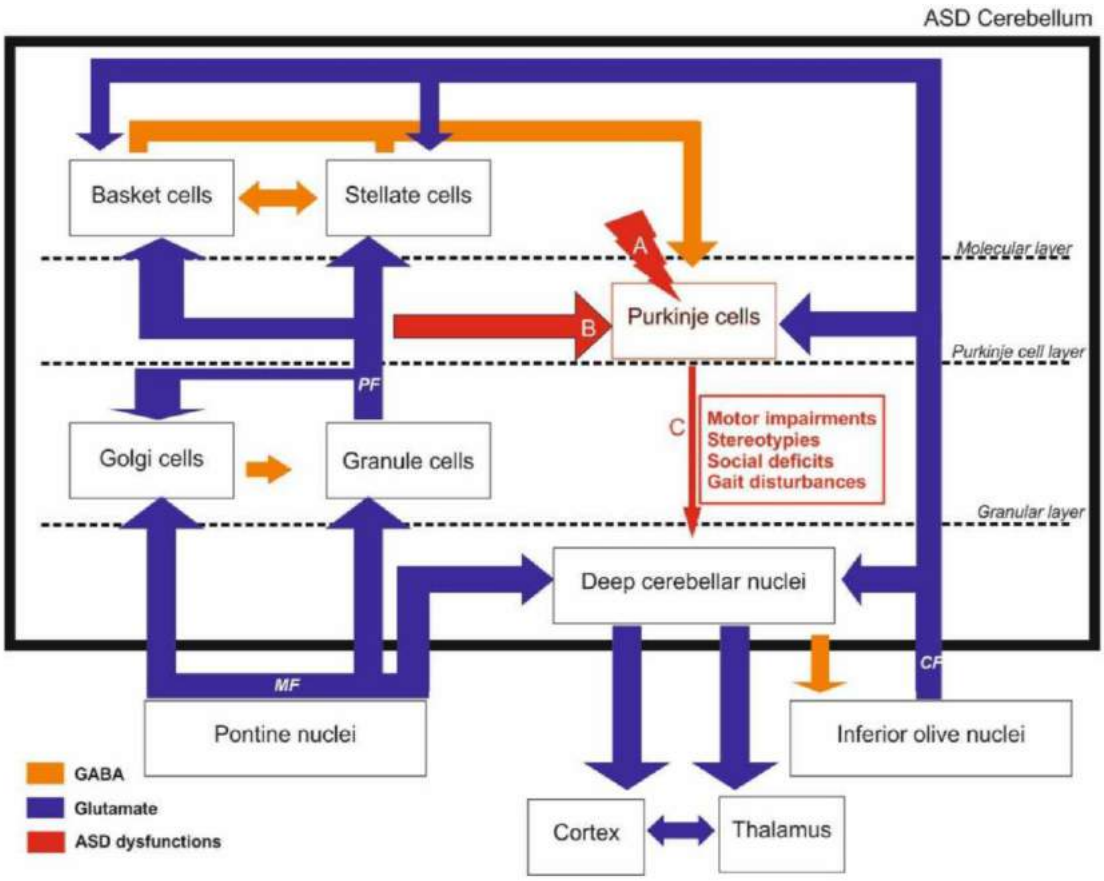



***Figure 16 : Le cervelet est impliqué dans les déficiences motrices et sociales rapportées dans les TSA***
*Les cellules de Purkinje (PC) dysfonctionnelles semblent être au centre de ces déficiences car elles représentent la seule sortie du cervelet et sont à la fois connectées à des cellules inhibitrices et excitatrices. Des dysfonctionnements des PC sont rapportés dans des contextes cliniques de TSA et dans des modèles animaux **(A, B, C)**. Des changements intrinsèques de PC **(A)** tels qu'une réduction de la densité de PC, de la taille du soma et une augmentation du nombre de PC ectopiques ont été retrouvés dans plusieurs modèles animaux génétiques et environnementaux, avec des différences lobulaires régionales entre les mâles et les femelles. Des modifications de la transmission synaptique des cellules granulaires à travers des fibres parallèles **(B)** ont également été signalées. L'action inhibitrice des PC vers les noyaux cérébelleux profonds **(C)** est également affectée par une modification des propriétés électrophysiologiques de ces dernières. Ces altérations centrées sur le PC conduiraient à un dysfonctionnement de la boucle cérébelleuse jusqu'au thalamus et au cortex, entraînant à la fois des troubles moteurs et cognitifs.*
*MF : fibres moussues, CF : fibres grimpantes, PF : fibres parallèles.*
*D'après Thabault et al. 2022*

## D. Physiologie du cervelet

Comme décrit précédemment, le cervelet a une fonction sensorimotrice cruciale et chaque région cérébelleuse est liée à un ou des rôles spécifiques. Cela a été largement montré par des études de lésions cérébelleuses. En effet, lorsque le cervelet vestibulaire est affecté, l'équilibre et le contrôle oculomoteur sont impactés. Tandis qu'une lésion au niveau du cervelet antérieur est notamment responsable d'une forte hétérogénéité de la marche, des dysfonctions du cervelet postérieur semblent affecter la planification des mouvements volontaires, avec la présence de problèmes d'écriture, des tremblements accompagnés de disarthrie et dysmétrie.

Les patients diagnostiqués avec des TSA montrent des déficits cognitifs et moteurs, démontrant une importante implication du cervelet dans ces dysfonctions. L'hypothèse neurodéveloppementale des TSA nous amène alors à étudier le neurodéveloppement du cortex cérébelleux en conditions physiologiques et pathologiques.

## E. Neurodéveloppement du cortex cérébelleux chez la souris

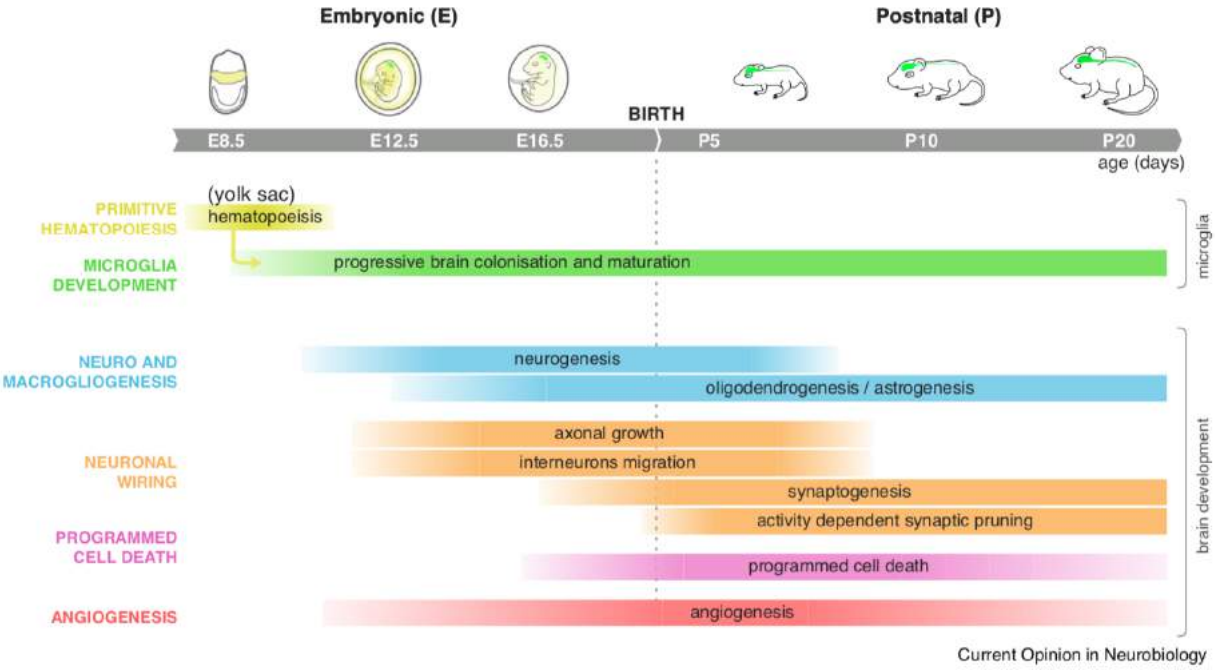



***Figure 17 : Chronologie du développement cérébral chez la souris***
*D'après Thion & Garel 2017*

Le cervelet de la souris se développe dans un premier temps selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral du tube neural. Une série de modifications cellulaires et morphologiques se met en place avant les trois premières semaines de vie et donne lieu à un cervelet développé : la prolifération et la migration cellulaire, la formation de dendrites et d'axones, la synaptogenèse, la myélinisation et la foliation. Cette cascade d'évènements neurodéveloppementaux est génétiquement régulée (Figure 16). En effet, de nombreuses souches de souris mutantes ont été utilisées pour caractériser le développement du cervelet chez la souris. À titre d'exemple, des mutations de gènes comme la phosphatase et tensine homologue (*Pten*) ou de *Chd8* montrent des conséquences neurodéveloppementales et phénotypiques caractéristiques de TSA (Katayama et al. 2016; Sarn et al. 2021).

Le cervelet et ses composés cellulaires se développent énormément pendant la période gestationnelle, notamment entre E9.5 et E11.5, jusqu'à P15 où la structure finale du cervelet mature est établie (Figure 17).

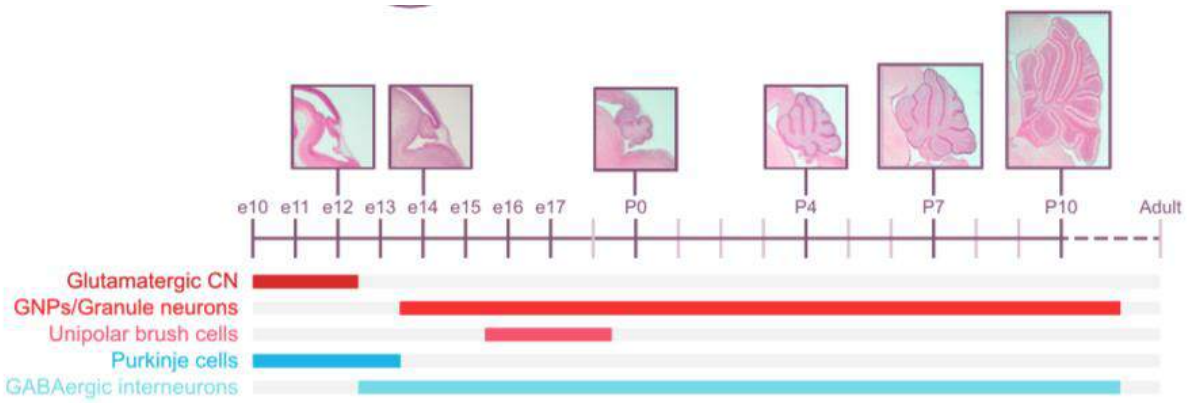



***Figure 18 : Chronologie de neurogenèse des différents neurones cérébelleux de la souris***
*Adapté de Carter et al. 2018*

Selon leur catégorie, les différentes populations cellulaires du cervelet ne dérivent pas du même tissu germinal. Les cellules gliales, les PC et autres neurones GABAergiques proviennent de la zone ventriculaire tandis que les GC et autres neurones glutamatergiques émanent de la lèvre rhombique. De plus, ces types cellulaires n'apparaissent pas au même moment. Ces processus sont régis par l'expression spécifique et localisée de facteurs de transcription. On

retrouve dans la zone ventriculaire l'expression du facteur de transcription pancréatique 1 (Ptf1α), de *achaete-scute family BHLH transcription factor 1* (Mash1), Neurogénines (Ngn) (Hoshino et al. 2005; Zordan et al. 2008) tandis que l'expression spécifique de atonal homologue murin 1 (Math1) et de paired box 6 (Pax6) caractérise la lèvre rhombique (Engelkamp et al. 1999; Machold & Fishell 2005; Wang et al. 2005a).

Par le biais de ces différences de localisation et d'expression de facteurs de transcription, les neurones glutamatergiques des noyaux cérébelleux profonds et les PC apparaissent les premiers, lors de la période embryonnaire, entre E10.5 et E13.5, suivis des progéniteurs aux interneurones GABAergiques à E12.5, des progéniteurs aux GC à E13.5 et des UBC à E15.5 (Englund et al. 2006; Hoshino et al. 2005; Machold & Fishell 2005; Wang et al. 2005a). Ces progéniteurs ne se différencient respectivement en interneurones GABAergiques et en GC que lors de la période postnatale (Leto et al. 2016; Sudarov et al. 2011). Concernant les progéniteurs aux GC, ils migrent de la lèvre rhombique jusqu'à la surface du cervelet pour former la couche granulaire externe (EGL). Leur importante prolifération atteint son pic entre P5 et P7, où ces progéniteurs se différencient et effectuent une migration radiaire, c'est-à-dire le long des prolongements des BG, afin de former les GC de la couche granulaire interne (IGL). La glie radiaire permet également la correcte migration des PC (Lin et al. 2009). Ce sont ces processus postnataux de prolifération cellulaire des GC majoritairement qui vont permettre l'augmentation de taille et la foliation du cervelet.

Les processus de prolifération, différentiation et migration cellulaire ainsi que le développement des dendrites et des axones et la formation de synapses, sont régulés par trois voies de signalisation spécifiques : *Wingless-related integration site* (Wnt), Notch et *Sonic Hedgehog* (Shh).

Concernant la famille des protéines Wnt, elle est notamment reconnue pour réguler le développement cérébelleux mais également la formation de la synapse (Pei et al. 2012). De

façon intéressante, une ablation de Wnt5a mène à une hypoplasie cérébelleuse, associée à une forte diminution du nombre de neurones glutamatergiques et GABAergiques (Subashini et al. 2017). En effet, Wnt7a et Wnt3 sont sécrétés par les GC, et induisent un remodelage des cônes de croissance des fibres moussues mais promeuvent également la prolifération des progéniteurs des GC situés dans la zone ventriculaire, tout en inhibant leur différenciation (Anne et al. 2013; Hall et al. 2000; Pei et al. 2012). Ce gradient a un effet opposé sur les progéniteurs de la couche granulaire externe (EGL), puisqu'il augmente leur différenciation tout en inhibant leur prolifération (Pei et al. 2012). Le signal Wnt, notamment Wnt5a, est également relié à l'apparition de médulloblastomes, qui serait causée par les mécanismes de prolifération des GC (Behesti & Marino 2009; Northcott et al. 2011; Subashini et al. 2017). En effet, plusieurs gènes liés aux progéniteurs de GC sont également impliqués dans le médulloblastome (Behesti & Marino 2009). De façon intéressante, chez l'Homme, des mutations de *Patched1* (*Ptc1*) donnent lieu à des médulloblastomes, ce qui est également retrouvé chez des souris $Ptc1^{+/-}$. Les mécanismes qui sous-tendent ces conséquences sont liés à des interdépendances cellulaires, et non pas seulement à la population de progéniteurs de GC et des GC elles-mêmes.

Le gradient Shh est également crucial dans les processus cellulaires puisqu'il régule tout comme la signalisation Wnt la prolifération des progéniteurs de la zone ventriculaire et des progéniteurs de l'EGL (Lewis et al. 2004; Vaillant & Monard 2009). La signalisation Shh, par le biais de son expression par les PC, agit notamment sur les récepteurs Ptc1 des GC, ce qui va activer la transcription de gènes liés à la prolifération cellulaire (Lewis et al. 2004). Le gradient Shh et l'expression du récepteur Ptc1 sont donc essentiels à une bonne régulation de la prolifération cellulaire et leur dérégulation peut mener à des médulloblastomes.

La dernière voie de signalisation est reliée aux composants Notch, exprimés dans les centres germinatifs liés à l'activation de processus immuns durant les périodes embryonnaire et postnatale. Cette signalisation régule également la prolifération des progéniteurs et serait

dépendante de l'activité de Wnt5a dans la régulation de l'expression de gènes liés à la prolifération cellulaire (Machold et al. 2007; Solecki et al. 2001; Subashini et al. 2017).

De nombreuses études se sont intéressées aux PC par leur rôle central dans les processus d'intégration cérébelleuse. Des agressions pendant le neurodéveloppement sur ce type cellulaire auraient donc des conséquences importantes et pourraient influencer le développement d'autres régions cérébrales (Badura et al. 2018; Wang et al. 2014). Les PC arrivent en effet parmi les premiers types cellulaires durant l'embryogenèse mais c'est à partir de la seconde semaine postnatale que l'arborisation des PC va largement se développer. En effet, les processus liés à la complexité et la longueur de ces arborisations ont lieu entre P7 et P14, puis c'est entre P14 et P21 que l'élagage synaptique se met en place (Beekhof et al. 2021). La suppression de Wnt5a mène principalement à une hypoplasie, due en partie à une baisse de la prolifération des PC, mais également à une arborisation dendritique anormale et à des PC immatures (Subashini et al. 2017).

Des gènes liés à la continuation et l'arrêt du cycle cellulaire, comme cycline D2 et l'inhibiteur 1B des kinases dépendant des cyclines (p27/Kip1) respectivement, sont également liés aux processus de prolifération cellulaire. L'inhibition de cycline D2 résulte en une hypoplasie cérébelleuse due à une réduction du nombre de GC à la suite de l'arrêt de la prolifération des progéniteurs de ce type cellulaire mais également à une augmentation de leur apoptose (Huard et al. 1999). Inversement, l'inhibition de p27/Kip1 mène à une augmentation du volume cérébelleux par la prolifération des GC (Miyazawa et al. 2000). Il a également été montré que l'inactivation de la protéine proto-oncogène N-myc (N-myc) avait des conséquences sur plusieurs types cellulaires cérébelleux, par le biais des régulateurs du cycle cellulaire cités précédemment (Knoepfler et al. 2002).

Durant la fin de la période embryonnaire, à partir de E17.5, les PC ne forment pas encore une couche unicellulaire, elles sont compartimentées selon leur profil d'expression de certains

gènes et molécules de surface (Sugihara & Fujita 2013). Cette organisation serait à l'origine de la mise en place d'une organisation cérébelleuse fonctionnelle. En effet, à ce stade, l'organisation lobulaire et hémisphérique ainsi que l'axe rostral-caudal sont déjà présents dans le cervelet. L'organisation des PC en couche unicellulaire, avec une disposition en rayures, n'apparaît qu'à P6 (Sugihara & Fujita 2013).

Une migration cellulaire réussie résulte de l'interdépendance de chaque type cellulaire. En effet, par le biais de souris mutantes, il a été montré que si les GC n'expriment que Unc5h3, un récepteur aux Nétrines, ces cellules ne parviennent pas à migrer correctement, et de ce fait, des PC se retrouvent à des positions ectopiques, c'est-à-dire en dehors de la couche unicellulaire caractéristique des PC (Goldowitz et al. 2000; Przyborski et al. 1998). D'autre part, la présence de Unc5h3 dans les GC dépend de l'expression de *Pax6*. Des souris Pax6$^{-/-}$ présentent des GC ectopiques, des anomalies morphologiques dans plus de la moitié des noyaux cérébelleux (Engelkamp et al. 1999).

Des souris mutées sur la voie de la reeline présentent un cerveau hypoplastique, résultant de la présence de PC ectopiques, situées en dessous de la couche des GC. Ces défauts de migration seraient liés à l'impact du manque de reeline sur les progéniteurs des PC. La reeline étant située dans la zone marginale, au-dessus de la région où les PC terminent leur migration, il est proposé que la reeline joue un rôle dans la fin de migration des PC immatures. Néanmoins, d'autres molécules en aval de la voie de la reeline, comme les récepteurs aux VLDL (VLDLR) et à l'ApoE de type 2 (ApoER2) ainsi que la protéine Disabled-1 (Dab1), sont également en lien avec le bon positionnement des cellules dans le cervelet (Howell et al. 1997; Trommsdorff et al. 1999).

Des gènes codant pour des protéines liées au cytosquelette et à l'adhésion cellulaire, comme CTNNA2 codant pour la catenine α-2, exercent également une influence sur la migration des PC (Park et al. 2002).

Concernant la mise en place de la connectivité cérébelleuse, les PC reçoivent des informations par le biais de FG, connectées à l'extérieur du cervelet mais également des GC présentes dans le cervelet. L'élimination de FG surnuméraires, mises en compétition avec les FP, est réalisée jusqu'à ce que chaque PC soit innervée par une seule FG. Ce processus serait relié à l'activité des récepteurs NMDA pendant la période postnatale : leur blocage par un antagoniste à P15 et P16 ne permet pas l'élimination de FG surnuméraires et résulte en une altération de la coordination motrice (Kakizawa et al. 2000).

## III. Implications du cervelet dans les TSA

Par son rôle dans les processus cognitifs et moteurs, le cervelet représente une structure d'intérêt dans le cadre des TSA (D'Mello & Stoodley 2015). En effet, dès 1958, des dysfonctionnements cérébelleux sont observés chez des patients diagnostiqués avec des syndromes autistiques et Asperger (Dow & Moruzzi 1958). Il a notamment été montré que la sévérité des symptômes des TSA à l'âge adulte est positivement corrélée à la gravité des lésions cérébelleuses s'étant produites dans l'enfance (Limperopoulos et al. 2007). Chez les personnes diagnostiquées avec des TSA, trois impacts cérébelleux sont majoritairement retrouvés : (i) une perte de PC, neurones inhibiteurs, qui représentent l'unique sortie du cervelet, (ii) une hypoplasie cérébelleuse et (iii) des dysfonctionnements au niveau de la boucle cérébello-thalamo-corticale (Bailey et al. 1998; Courchesne 1997). Sans le cervelet et spécifiquement les PC, une hypersensibilité est retrouvée dans les régions corticales et sous-corticales, ne bénéficiant plus de l'inhibition cérébelleuse (Baron-Cohen et al. 2009; Phillips et al. 2015).

Les diverses implications du cervelet dans la physiopathologie sont extensivement décrites dans la revue de la littérature publiée au cours de cette thèse (Thabault et al. 2022).

## A. Présentation de la revue de la littérature

Cette revue de la littérature porte sur les implications du cervelet et du striatum dans les TSA et s'appuie sur l'état actuel des études cliniques et précliniques. La revue met en exergue le manque d'études longitudinales, s'intéressant à l'âge et au sexe des patients et des modèles animaux. La revue met également en lumière les troubles moteurs répertoriés parmi les symptômes. En effet, comme décrit dans l'introduction, près de 80% des patients diagnostiqués avec des TSA présentent des troubles moteurs (Lai et al. 2014). Les travaux récents au sein du laboratoire proposent de considérer les troubles moteurs comme des critères de diagnostic à part entière, ouvrant une piste de diagnostic plus précoce chez les individus de sexe féminin (Al Sagheer et al. 2018; Haida et al. 2019; Matas et al. 2021).

La revue est découpée en deux parties, traitant d'abord des implications cérébelleuses dans les TSA puis des implications striatales, et celles-ci sont organisées de façon identique. Les aspects anatomiques sont décrits premièrement, puis les aspects cellulaires et enfin les aspects moléculaires.

En tant que co-première auteure de cette revue de la littérature, j'ai rédigé la partie concernant les implications cérébelleuses dans les TSA.

## B. Tiré à part

International Journal of
*Molecular Sciences*

MDPI

*Review*

# Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: From Clinical Observations to Animal Models

**Mathieu Thabault [1,†], Valentine Turpin [1,†], Alexandre Maisterrena [1], Mohamed Jaber [1,2], Matthieu Egloff [1,2,†] and Laurie Galvan [1,*,†]**

[1] Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Poitiers, 86073 Poitiers, France; mathieu.thabault@univ-poitiers.fr (M.T.); valentine.turpin@univ-poitiers.fr (V.T.); alexandre.maisterrena@univ-poitiers.fr (A.M.); mohamed.jaber@univ-poitiers.fr (M.J.); matthieu.egloff@univ-poitiers.fr (M.E.)
[2] Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86021 Poitiers, France
* Correspondence: laurie.galvan@univ-poitiers.fr
† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Autism spectrum disorders (ASD) are complex conditions that stem from a combination of genetic, epigenetic and environmental influences during early pre- and postnatal childhood. The review focuses on the cerebellum and the striatum, two structures involved in motor, sensory, cognitive and social functions altered in ASD. We summarize clinical and fundamental studies highlighting the importance of these two structures in ASD. We further discuss the relation between cellular and molecular alterations with the observed behavior at the social, cognitive, motor and gait levels. Functional correlates regarding neuronal activity are also detailed wherever possible, and sexual dimorphism is explored pointing to the need to apprehend ASD in both sexes, as findings can be dramatically different at both quantitative and qualitative levels. The review focuses also on a set of three recent papers from our laboratory where we explored motor and gait function in various genetic and environmental ASD animal models. We report that motor and gait behaviors can constitute an early and quantitative window to the disease, as they often correlate with the severity of social impairments and loss of cerebellar Purkinje cells. The review ends with suggestions as to the main obstacles that need to be surpassed before an appropriate management of the disease can be proposed.

**Keywords:** ASD; cerebellum; striatum; epigenetics; motricity; autism

check for updates

**Citation:** Thabault, M.; Turpin, V.; Maisterrena, A.; Jaber, M.; Egloff, M.; Galvan, L. Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: From Clinical Observations to Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2294. https://doi.org/10.3390/ijms23042294

Academic Editors: Masaru Tanaka and Lydia Giménez-Llort

Received: 14 January 2022
Accepted: 8 February 2022
Published: 18 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition manifested by early onset of (i) persistent deficits in communication and social interactions and (ii) restricted patterns of behaviors, activities or interests (DSM5). The severity range of each symptom, and the fact that other abnormalities can accompany ASD, led to the "spectrum" umbrella term. Comorbidities vary among patients, but the most common ones are: sleep disorders (up to 80%), intellectual deficits (45%), epilepsy (up to 30%) and, interestingly, motor abnormalities (79%) [1]. The WHO considers that ASD affects 1 in 160 children worldwide following a ratio of 3 boys for 1 girl [2], suggesting male susceptibility. To this day, the diagnosis age ranges from infant to adult, depending on the severity of the symptoms and the social environment.

The etiology of ASD is still uncertain, but evidence has strongly linked genetic, epigenetic and environmental factors to it. The gathered knowledge in this domain is interdependent with technological advances. The possibility to collect and analyze broad genetic information for the past ten years has led to breakthroughs. The first pieces of evidence of genetic involvement in ASD were the case studies of monozygotic twins. These twins displayed a 60% probability to share the same ASD diagnosis, whereas dizygotic

twins' probability was at 10% [3–5]. More importantly, the incidence of having an ASD child is proportional to the child's shared genomic percentage with an ASD parent or sibling [6–8]. The advancement of sequencing technics led to the possibility of analyzing the patient's whole genome, which helped identify more than 1200 susceptibility genes (SFARI gene, https://www.sfari.org/resource/sfari-gene/, accessed on 14 September 2021). These genes can be broadly categorized into two families, involving either chromatin modeling or synapse formation [9].

Perinatal factors have been identified as increasing ASD incidence, including maternal infection and maternal toxin exposure. A 2016 meta-analysis of more than 40,000 ASD cases highlighted an increased risk of ASD in children whose mother had a viral infection during pregnancy, leading to hospitalization [10]. One hypothesis underlying this observation is that maternal immune regulation leads to increased production of inflammatory cytokines. There is not a consensus about how the cytokines could reach the fetus brain. They could reach it by disrupting the brain–blood barrier (BBB) [11] or by the actions of proinflammatory cytokines able to cross the BBB (for review, see [12]). Several pharmacological agents are also responsible for increasing ASD incidence in children exposed during prenatal development. For instance, valproic acid (VPA) is widely used as an antiepileptic drug and a mood stabilizer. It has various effects, from inhibiting the histone deacetylase [13] to the GABA signaling potentiation [14]. Pregnant women under VPA medication are four to five times more likely to have an ASD child even when VPA was taken at the lowest doses [15] (for review, see [16] and Table 1). We will focus on the VPA as an environmental model of ASD in this review event, though; others have been described as the phthalic acid ester exposition (for review, see [17]).

Some of the mutations and perinatal factors increasing ASD incidence have led to the generation of corresponding animal models, with some showing good face validity compared to clinical conditions. However, not all ASD symptoms can be reproduced in rodents. For example, while social interaction and motor stereotypy can be robustly observed and scored in rodents using various and complementary behavioral tests, cognitive stereotypy and intellectual disability cannot be adequately assessed. Speech deficits are also a symptom in patients, which cannot be directly translated in the mouse models. The closest feature that can be measured is ultrasonic vocalizations (USVs). USVs are used by pups separated from their mother or littermates, by juveniles when playing and by adults during social interactions or mating. Although their exact significance is unclear, many different USVs parameters were modified in ASD mice compared to wild type. Shank1$^{-/-}$ pups emitted less isolation-induced USV with a shift in frequencies than control mice [18], but not Shank3$^{-/-}$ pups, where other parameters were modified [19]. Additionally, no difference in the number of USVs emitted by pups was found between the Frm1$^{-/-}$ mice and wild type but rather a change in specific frequency [20]. Thus, it seems challenging to observe consistent and robust USV changes through different ASD mouse models.

Since 1943 and the first description of autistic features by Leo Kanner [21], followed almost concomitantly in 1944 by Hans Asperger [22], motor and cognitive impairments have been within the core of ASD symptoms. Currently, studies focus more on cognitive aspects of ASD and the corresponding physiopathology and brain regions [23,24]. The notion linking ASD to a focal cerebral dysfunction has drastically evolved toward a consensus of cerebral multi-regional reorganization during development. We will focus this review on two complex brain areas involving sensory and motor functions: the cerebellum and the striatum.

**Table 1.** Various outcomes in various animal models of valproic acid administration during development in relation with species, dose and age. This table recapitulates the different VPA models and their phenotypes. IP: Intraperitoneal injection, USV: Ultrasonic vocalizations, D1R and D2R: D1 dopamine receptor and D2 dopamine receptor, PC: Purkinje cells, MOR: Mu opioid receptor, PV: Parvalbumin interneurons, mPFC: median Prefrontal cortex, GABAP3: GABA receptor subunit p3.

| Species | Treated Animal | Periodicity | Dose | Age of Treatment | Phenotype |
|---|---|---|---|---|---|
| Xenopus [13] | Embryo | 24 h exposition of the eggs | • 1 mM<br>• 2.5 mM<br>• 5 mM | Stage 8 embryo | • 5 mM: loss of anterior structures and shortening of anterior-posterior axis in 88% of embryos |
| C57BL/6J mice [25] | Pregnant female | One IP injection | 450 mg/kg | E12.5 | • ↗ Eye-opening delay<br>• ↗ Time to climb the wire and the grid<br>• ↗ Immobility in males<br>• ↘ Crossing in males<br>• ↗ Grooming duration<br>• ↘ Rearing in males<br>• ↘ Sociability index in males<br>• ↗ Errors during challenging beam test<br>• ↗ Gait abnormality<br>• ↘ PC number in Crus 1/2 and M1/M2 |
| C57BL/6J mice [16] | Pregnant female | One IP injection | 600 mg/kg | E12 | • ↗ PC density in young mice at P13<br>• ↘ PC number in males at P40 |
| C57BL/6J mice [26] | Pregnant female | One oral administration | 600 mg/kg | E12 | • ↘ PV expression level but not PV neurons<br>• ↗ mPFC volume<br>• ↘ KCNC1 mRNA level in forebrain<br>• ↘ Kv3.1b mRNA level in forebrain<br>• ↗ HCN1 mRNA level in forebrain |
| CD-1 and GFAP-eGFP mice [27] | Pregnant female | One IP injection | 500 mg/kg | E12.5 | • ↘ CB+ cells CB intensity and GABAP3 intensity in lobule X at P8<br>• ↘ Expression of GABP3 in ependymal glial cells<br>• ↗ Disrupted GABAP3 expression through development |

**Table 1.** *Cont.*

| Species | Treated Animal | Periodicity | Dose | Age of Treatment | Phenotype |
|---|---|---|---|---|---|
| FVB/NJ mice [28] | Pregnant female | One IP injection | 400 mg/kg | E11.5 or E12.75 | E11.5<br>• ↘ MOR1 expression in caudal striatum at P14<br>• ↗ Abnormal cell aggregation into striosomal patch<br>E12.75<br>• ↘ MOR1 expression in caudal striatum at P14<br>• ↗ CB number rich matrix in rostral in the ventro-medial striatum at P14<br>• ↗ Abnormal cell aggregation into striosomal patch<br>• ↗ FOXP2+ cell in layer 5 ( S1 cortex) and layer 6 (S2 cortex)<br>• ↘ Corticostriatal synapse in rostral striatum<br>• ↘ Number, duration, peak frequency and peak amplitude in USV |
| Long Evans rats [29] | Pregnant female | One IP injection | 600 mg/kg | E12.5 | • ↘ PC number in vermis, anterior, posterior lobes<br>• ↘ Granule layer volume in vermis, anterior, posterior lobes |
| Long Evans rats [30] | Pregnant female | One oral administration | 800 mg/kg | E12 | • ↘ Brain weight<br>• ↗ Errors in T-maze<br>• ↗ Deficits in females in skilled reaching but improvement in male<br>• ↗ Time in open arms in elevated plus maze<br>• ↘ Dendritic branching in male<br>• ↘ Dendritic length; decrease spine density, decrease cortical thickness |
| Sprague-Dawley rats [31] | Pregnant female | Two oral administrations | 800 mg/kg | E10 and E12 | • ↘ Body weight between P21 and P28, ↘ brain weight<br>• ↘ Body length<br>• ↘ Purkinje cell size in all ten lobules<br>• ↘ Number of calbindin positive PC in all ten vermal lobules<br>• ↘ Primary dendrite thickness.<br>• ↗ Time to righting<br>• ↘ Length in limb stride<br>• ↗ Time to complete static beam and number of errors and of failed attempts |

**Table 1.** *Cont.*

| Species | Treated Animal | Periodicity | Dose | Age of Treatment | Phenotype |
|---|---|---|---|---|---|
| Winstar rats [32] | Young rat | Daily intragastric administration | 200 mg/kg | 1 month<br>3 months<br>6 months<br>9 months<br>12 months | • ↗ Swelling of perikarya and dendritic process<br>• ↗ Abnormalities of mitochondria<br>• 9 and 12 months: severe degenerative changes<br>• ↗ Swollen Bergmann astrocytes |
| Winstar rats [33] | Pregnant female | One IP injection | 500 mg/kg | E12.5 | • ↘ Social play behavior and sociability in 3-CT<br>• ↘ Social discrimination ability<br>• ↗ D2R expression in Nucleus accumbens<br>• ↗ D1R expression in Nucleus accumbens<br>• ↘ Resting potential in MSNs<br>• ↗ Altered action potential discharge pattern in MSN |

## 2. Cerebellar Involvement in ASD

### 2.1. Structure and Function of the Cerebellum

All vertebrates have a cerebellum, although not all have a cortex [34]. The cerebellum might have first emerged in fish, providing computational analysis of sensory feedback from their lateral lines and hair cells on their skin that help them detect their environment [35]. The primary role of the cerebellum has long been linked to coordination and control of movement. Its implication in higher function has first been proposed by Leiner, following the observation in higher primates of an enlargement of the cerebellum that paralleled that of the frontal cortex during phylogenic evolution [36]. A few years later, Middelton and Strike provided anatomical evidence of cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function [37]. Since then, many studies highlighted the eminent role of the cerebellum in cognitive and emotional function, and that was attributed to its connections with cortical and subcortical centers [38,39]. In addition, extensive connections between the cerebellum and frontal associative cortical areas suggest a critical role in treating sensory motor information from visual, auditive and sensory input, as well as a role in memory, language processing and planification [40].

Although relatively simple in its general structure, as well as afferent and efferent projections and cellular organization, the anatomy of the cerebellum can be difficult to describe. This is mainly due to three factors: (i) the structure/function of the cerebellum is quite different depending on whether one is considering the anteroposterior or parasagittal plans; (ii) each part of the cerebellum can have several names depending on the user and the current trend; (iii), not all authors agree on what each part encompasses. When viewed from the anteroposterior axis, the cerebellum is formed from three lobes: the vestibulocerebellum, the posterior cerebellum and the anterior cerebellum, which are separated by deep fissures. Each lobe is constituted by lobules numbered I to X, giving the cerebellum its folded shape. The vestibulocerebellum (also called lobule X) comprises a median nodule and flocculus lateral ones. It is directly connected to the vestibular nuclei within the brainstem and receives projections from the auditory nerve. Most of the efferent projections from the cerebellum originate from four deep cerebellar nuclei within the vestibulocerebellum that receive projections from collateral fibers, parallel fibers and Purkinje cells (PC). This is the oldest part of the cerebellum phylogenetically, and it is shared among all vertebrates. It handles perception of self-motion and spatial orientation through the auditory system of the head's position and motion. The anterior lobe is composed of lobules I–V and includes the medial vermis part. It receives proprioceptive information from the body and limbs, as well as from the visual and auditive systems. It sends projections toward the cortex and the spinal cord, modulating the descending motor system. The anterior lobe is responsible for balance, posture and consequent movement adjustments in time and space. The posterior lobe is composed of lobules VI–IX. This lobe constitutes the cerebellar hemispheres and is the most recent and evolved part of the cerebellum. It is only present in higher mammals and is particularly enlarged in the human species. The posterior lobe receives projections exclusively from the cerebellar cortex and sends projections to the ventrolateral part of the thalamus. It is thought to be implicated in movement planification, motor learning, timing, language processing and emotional, cognitive and social functions.

From a parasagittal perspective, the central part of the cerebellum is constituted by the vermis, followed by the paravermis and ending laterally by the cerebral hemispheres, which constitute the most significant part in the primate's cerebellum. Each lobule can have a different function and set of projections, depending on its parasagittal plan. Of interest to us here are crus I and crus II that constitute the lateral parts of lobules VI and VII, respectively, within the posterior lobe and that are affected in ASD. Crus I and crus II are homologous in human and non-human primates. However, rodent crus I corresponds to crus I and crus II in primates [41], while rodent crus II may be homologous to HVIIB.

At the cellular level, the cerebellar cortex is organized into three layers that are, from the surface to the white matter: (i) the molecular layer, a cell-poor layer containing stellate and basket cells as well as PC dendrites connected to parallel fiber axons from granule

cells and to climbing fibers. The climbing fiber axons are also found in the granular layer, (ii) the PC layer, a thin single cell layer and (iii) the granule cell layer containing what is thought to constitute more than 50% of whole nerve cells within the brain (up to $10^{11}$ neurons) [42]. Granule cells receive projections from mossy fibers originating from the vestibular nuclei. In turn, they project excitatory parallel fibers to PC dendrites within the molecular layer, each parallel fiber contacting 100 PC. Each PC receives an approximate number of 150,000 synapses from parallel fibers and projections emanating from a single climbing fiber [43] originating from the inferior olive. The PC are large neurons with flat and rich dendritic arborization. Their inhibitory GABAergic axon projects through the granular layer to the vestibular nuclei and constitutes the sole efferent projection from the cerebellar cortex (Figure 1).

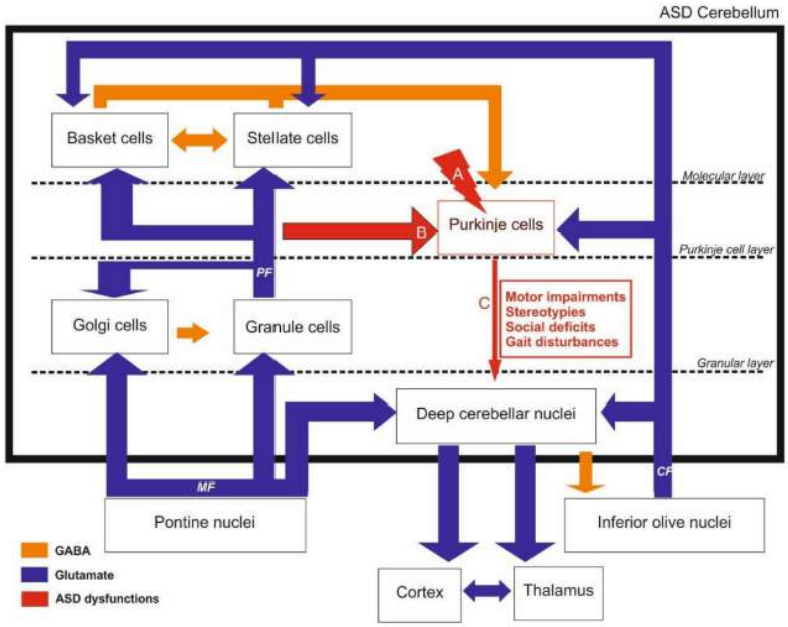



**Figure 1.** The cerebellum is involved in both motor and social impairments reported in ASD. Dysfunctional Purkinje cells (PC) seem to be at the center of these impairments as they represent the sole output of the cerebellum and receive inputs from both inhibitory and excitatory cells. PC dysfunctions are reported in ASD clinical settings and in animal models (A, B, C). PC intrinsic changes (A) such as reduced PC density was shown in Fmr1 KO mice [44], TSC2f/- mice [45], Mecp2 deficient mice [46], VPA mice [47], polyI:C mice [48] and Shank3ΔC/ΔC mice [49], with regional lobular differences between males and females. Low PC numbers associated with a decrease in soma size and an increase in ectopic PC number were also reported in VPA rats [50], especially in lobule VII hemispheres (crus I and II) that are involved in sensorimotricity. Impaired inputs from granule cells through parallel fibers (B) were also reported. For instance, the mGluR-long term depression (LTD) was altered at the PF-PC synapse in both PC-specific Grip1/2 KO mice and Fmr1 KO mice [51,52]). Furthermore, PC abnormal dendritic branching and reduced density of dendritic spines were found to impair synapse formation in VPA rats [53,54] and in Fmr1 KO mice [44,51]. Outputs from PC onto deep cerebellar nuclei (C) are also impacted, as PC firing pattern is impaired in mice lacking Calbindin, with decreased complex spike duration and pause, as well as decreased simple high spike firing rate [55]. In the Shank2 KO mice, an increased irregularity in simple spike PC firing accompanied by increased inhibition was only found in the posterior cerebellum [56]. Altogether, these PC-focused alterations would lead to dysfunctional cerebellar loop up to the thalamus and cortex leading to both motor and cognitive impairments. MF: Mossy fibers, CF: climbing fibers, PF: parallel fibers.

The various functions of the cerebellum that have been described to date, whether motor or cognitive, seem to converge toward a peculiar capacity of the cerebellum to estimate and keep track of time. James Albus proposed that the anatomy and physiology of the cerebellum both point toward a pattern-recognition data processing that allows the handling and storage of information based on trial (intent) and error (action) and that this is achieved by weakening the synaptic weights rather than by strengthening them [36,57]. Clumsiness and deficits in motor coordination and manual dexterity, abnormal balance gait and posture are all dependent on the cerebellar function and are affected in ASD [58–60]. These deficits can be detected even in the first months of life, with affected babies exhibiting difficulties positioning their body when carried, hypotonia and uncoordinated movements.

Based on the existing knowledge of the sensory motor role of the cerebellum and suspecting its implication in psychiatric disorders, Dow and Moruzzi developed test batteries early in 1958 on patients with various psychiatric disorders. They reported severe cerebellar-type impairments in what was referred to as patients suffering from autistic and Asperger syndromes [61]. Since then, a growing number of papers have reported substantial implications of the cerebellum in motor and non-motor deficits in ASD. From this aspect, the severity of cerebellar injury in premature infants is predictive of the severity of ASD symptoms in adult age [62]. Indeed, there are three cerebellar-related deficits reported in ASD patients based on imaging and post-mortem histological observations: (i) a decrease in the number of PC, (ii) reduced cerebellar volume and (iii) disrupted circuitry between the cerebellum and connecting brain areas, such as the thalamus, the pons and the cortex [63,64]. As PC are inhibitory, this, in turn, leads to hypersensitivity of cerebellar target areas [65,66].

### 2.2. Anatomical Evidence of Cerebellar Involvement in ASD

The involvement of cerebellum in the ASD context is also supported by genetic evidence. Indeed, 38 genes, whose expression is enriched in the cerebellum, were identified as ASD-linked susceptibility genes [25]. Several studies showed that ASD patients displayed hypoplasia (−12% [67,68], for review, see [63]). Using magnetic resonance imaging (MRI) in both adult ASD and healthy patients, Murakami et al. reported a reduced size of both vermis and hemispheres in ASD patients without and with mild mental retardation [67]. This alteration is not always found in ASD mouse models and could be due to the spectrum of the disease or the heterogeneous way of assessing it at the levels of (i) methodology (stereology vs. MRI), (ii) diversity of genetic background of ASD animals, (iii) animal age and (iv) gender (for review, see [69]). A decrease in cerebellar volume has also been reported in multiple genetic pathologies related to ASD, including fragile X syndrome (FXS) [70,71], Rett syndrome [70–72], the Phelan–McDermid syndrome, including *Shank3* deletion [73,74] (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2), and *NLGN4* (Neurologin-4) associated non-syndromic X-linked ASD [46]. Decreases in cerebellar volume can also be observed in corresponding animal models, such as the Fmr1 Knock-out (KO) [44] and Nlgn4 KO [75] mice models (Table 2).

**Table 2.** Cerebellar dysfunctions in ASD. This table recapitulates cerebellar dysfunctions found in patients and animal models.

| | | Children | | Teenagers | Adults | Animal Models |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | <5 years old | 5 to 14 years old | 14 to 21 years old | >21 years old | |
| Anatomical impairment | Global cerebellar volume | • N/A | • N/A | • N/A | • Hypoplasia [55,56] | • No consistent changes [57]<br>↘ Fmr1KO [64] and Nlgn4KO$^{-}$ [65], = Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$, VPA and Poly I:C models [25,66,67] |
| | White matter (WM) changes | • ↗ WM [68,69] | • No change [69]<br>• Local thickening in boys [70,71] | • No change [69] | • N/A | • N/A |
| | Connectivity | • N/A | • ↗ in the right Crus I and left inferior parietal lobule [76]<br>• ↗ Right during motor task [72]<br>↗ in the left supplementary motor areas [72]<br>Global right overconnectivity [73] | | • ↗ in right Crus I and left mPFC [77] | • ↗ in at least 30 mouse lines for Crus I/II projections [78]<br>• ↗ PC firing in left mPFC when right crus I is inhibited [76] |
| Cellular correlates | Purkinje cell (PC) | • ↘ axon numbers [79] | • ↘ axon numbers [79] | • ↘ PC density [80] | • ↘ PC density [51,80–82]<br>• ↘ soma size & ectopic PC in molecular layer [81,82] | • ↘ PC density [25,66,67,83]<br>↗ PC density [63]<br>↘ PC arborization in LPS rats [84]<br>↘ Dendritic spine density in VPA rats [30] |
| | Bergmann cells | • N/A | • N/A | • N/A | • Activated/reactivated in PC loss area [51,85] | • ↗ Increased ectopic PC in VPA rats [29,30]<br>• Activated / reactive in PC loss area in Fmr1$^{-/-}$ [64] and VPA rat [32] |
| | Microglia | • N/A | • High global microglial activation [85] | | | • No changes in poly I:C mice [67] |
| Neurotransmission | Glutamate | • N/A | • ↘ AMPA-R density [86]<br>↘ glutamate & glutamate metabolite levels [87] | • ↘ AMPA-R density [86]<br>• ↘ glutamate & its metabolite levels [87] | • ↘ AMPA-R density [86]<br>• ↗ levels of EAAT1/2 [88] | • Impaired mGluR LTD [89–91]<br>• ↗ mGluR5 expression in Grip1/2-PC, Fmr1$^{-/-}$ and Shank2$^{-/-}$ [90,92–94]<br>↘ mGluR5 expression in Shank3$^{\Delta c/\Delta c}$ [66] |
| | GABA | • ↘ GABA-A β3 level [95] | • ↘ GABA-A β3 level [95] | • ↘ GABA-A β3 level [95] | • ↘ GABA-A α, GABA-B R1 density, GAD65/67 levels [96,97]<br>• ↘ GABA-A β3 level [95] | • Abnormal PC firing pattern in Calbindin deficient mice [98]<br>↘ GABA-A ρ3 levels in VPA model [27]<br>↘ GABA-A β1 & β2 levels in Fmr1 KO [99] |

N/A: not applicable.

PC loss has been consistently described in ASD patient brains, and cerebellar hypoplasia was found in most cases [49,62,63,75]. In our previous articles, three ASD mice models (Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ [49], VPA [47] and polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) [48]) displayed no global changes in cerebellum size, although they did show PC loss predominantly in crus I and II. Beyond the cell count, cerebellar connectivity is also affected in ASD, and white and gray matter abnormalities have been observed by voxel-based morphometry. Analysis of cerebellar white matter in low- and high-functioning ASD young male children shows a significant increase in white matter volume compared to a typical children group [77]. That characteristic has been robustly used as a prediction for ASD diagnosis in this same study. A specific change in cerebellar white matter is typical in 2–3-year-old ASD children, which is not observed in older ASD children and adolescents [78]. A few studies have investigated fiber tracts and myelin differences in ASD patients using diffusion tensor imaging (DTI), revealing changes in white matter structure and projections. The evaluation of white matter in male ASD children (6–12 years old) shows a thickening of the left cerebellar peduncle and of both middle cerebellar peduncles compared to typical children [76]. Interestingly, motor-related structures were also affected, such as the left putamen and the corticocortical pathway [76]. Considering motor deficits in ASD, another study assessed, contingently, motor function and DTI in ASD children (5–14 years old, twelve males and one female) compared to a non-ASD control age group [100]. In this study, ASD children displayed the poorest motor function scores (manual dexterity, ball skills and balance) compared to neurotypical children. Additionally, these motor deficits were correlated with a decrease in fractional anisotropy (white matter microstructural integrity index) bilaterally in the superior cerebellar peduncle [100], the efferent cerebellar tract to the midbrain being mainly composed of the cerebellothalamic tract. Taken together, these white matter analyses reveal an alteration of cerebellar motor pathways in ASD.

Lateralization of functional connectivity patterns is modified in ASD, revealing changes in functional topography. Noonan et al. assessed the functional connectivity of ASD brains by asking adult patients to perform a memory task while undergoing an MRI. They selected high functioning ASD adult males who showed the lowest score at general word recognition and source recognition performance compared to a control group. Although ASD and control groups showed no differences in functional connectivity in the left hemisphere, ASD patients showed greater connectivity in the right hemisphere, including the right supplementary motor areas and the cerebellum [101]. This right overconnected lateralization of the ASD cerebellum was also observed in ASD children and adolescents [81]. Interestingly, the performance of a simple motor task (self-paced button press with the dominant thumb) by young ASD adults and control patients while being imaged revealed that the magnitude of activation of the ipsilateral anterior cerebellum is strongly increased in ASD patients [68]. Moreover, the authors found that contralateral and posterior cerebellar regions that are not generally associated with simple motor tasks were abnormally active in ASD patients [68].

Consequently, based on the over-recruitment of crus I and II in ASD patients, as well as in cerebral regions involved in both cognitive and motor tasks, these regions might be essential for understanding the behavior impairments in ASD patients. From this aspect, MRI analysis in young children showed that ASD children with repetitive movements had a negative correlation with cerebellar vermis area of lobule VI and VII (crus I and II) [82]. Evidence from 10-year-old ASD children revealed higher functional connectivity between the right crus I and the left inferior parietal lobule than neurotypical children [102]. This connectivity is not the only one impaired in ASD. Similar observations were reported regarding projections originating from the right crus I to the left mPFC in ASD patients [79] and in 30 out of 94 ASD mice models [83]. Consequently, chemogenetics-specific inhibition of PC in the right crus I in the tuberous sclerosis complex 1 (Tsc1) ASD mouse model led to increased firing in the left mPFC associated with improved sociability behavior, inflexibility and motor stereotypies [80]. This pathway is polysynaptic, as it anatomically relays on the ventral medial thalamus. In the Tsc1 ASD mouse models, the optogenetic inhibition

of these specific thalamic neurons was sufficient to prevent both social impairments and repetitive behavior [83].

The posterior cerebellar circuits allow the processing and integration of multisensory information, including visual, proprioceptive and somatosensory, which may be reduced in ASD patients. This raises the hypothesis of compensating mechanisms in ASD patients regarding their sensory forward control deficits in prehension, gait and postural control. When high-functioning ASD children have been asked to perform a simple motor task, such as a "grip", they displayed an increase in the grip to load force, suggesting temporal dyscoordination. Since Vilensky's study in the 1980s, ASD patients' walking features have been highly investigated, and a dozen differences were found, such as increased stance duration, reduced stride length, toe striking and increased angular motions [103]. Interestingly, these features are also modified in some ASD mice models. ASD patients seem to slow down their movements in relation to task difficulty and need more practice than typical individuals. These deficits in complex social motor skills could be associated with social and imitation impairments and over-reliance on proprioceptive feedback in motor control and learning (for review, see [104]).

### 2.3. Cellular Correlates

The PC number decreases from 35 to 95% in ASD patients [49,63,75,84], and their soma size and, consequently, their density [29,84], are affected too. Differences in the extent of the reported decreases seem to result from a high variability both in subjects and methods. One of the pioneer post-mortem studies found PC loss and ectopic PCs within the molecular layer only in adults, whereas PC inclusions were described in a sole child case [30]. In parallel, fewer axons were found in PCs from ASD children (male and female, 3.6–13.3 years old) using diffusion MRI tractography [31]. These findings highlight age as a crucial parameter in ASD cellular consequences. The spectrum of symptoms in this disorder might account for the difficulty in obtaining homogenous results in both patients and animal models. This is even the case with genetic mouse models of ASD, where different cellular outcomes have been reported. For instance, PC density was reduced in both Fmr1 KO mice (C57BLJ6J, P30) [44] and mice with a specific deletion of the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) [45], whereas an increase was observed in Mecp2-deficient mice [46]. In our study, Shank3$^{\Delta c/\Delta c}$ mice displayed an extensive loss of PC in both crus I and II, but only in males [49]. While gait was disrupted only in males, deficits in social novelty were observed in both sexes. In environmental ASD models, our previous studies showed PC loss in both crus II and 7cb in males and PM in females, with poly I:C prenatal insult [48]. In the VPA mouse model (E12.5; 450 mg/kg) (Table 1), PC number was reduced in crus I in males and crus II in females [47]. This sex-specific reduction was correlated with behavioral tests assessing sociability and motor impairments. Sexual dimorphism was also found in another study that reported PC decrease only in VPA males in the cerebellar lobules VI, VIII, IX and the paramedian one [16]. Clinical studies also established correlations between sex and regional-specific PC loss. For instance, Skefos et al. found that ASD male patients (7–56 years old) exhibited a 21% decrease in regional volume-weighted mean compared to females (4–21 years old). Only males presented a reduction in PC in the lobule X of the flocculonodular lobe. The posterolateral region seems to be the most affected, specifically the lobule VII hemispheres, which are crucial sensorimotor areas with reciprocal interaction with the PFC and the posterior parietal cortex [105] (Table 2).

Differences between males and females in ASD seem to find their origin in the brain masculinization during brain development, a critical period that puts males at risk regarding neurodevelopmental disorders. During the second postnatal week, arachidonic acid and estradiol production peak. It has been shown that inflammation or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) result in impaired play behavior in males [106]. Even though it is still assumed that the cerebellum is not sexually dimorphic, as opposed to the preoptic area, for example, specific subregions such as lobules VI and VII have been demonstrated to represent a particular sexual orientation dimorphism related to emotion and

sensation [106]. In the cerebellum, prostaglandins stimulate aromatase and local estradiol production. PCs respond to prostaglandin E2 (PGE2) and 17-estradiol (E2) levels. Indeed, E2 induced BDNF expression at physiological levels and promoted PC dendritic growth, spinogenesis and synaptogenesis during neonatal life. High E2 levels stop dendritic growth and reduce excitatory synapses number [89,106]. Given that E2 is the primary hormone in females, this raises the hypothesis that E2 could protect females from environmental insults, whether toxic, pharmacologic or immune. Indeed, only male rats exposed to LPS or PGE2 during the second postnatal week displayed reduced PC arborization and impaired juvenile social play behavior [107] (Table 1).

Unfortunately, not all studies separate male and female groups; many use only males, and some studies even pool the data from both sexes, undermining sex differences. For instance, rats (male and female pooled) prenatally exposed to a single VPA dose exhibited a reduced number of neurons in the cerebellum, abnormal dendritic branching and reduced density dendritic spines affecting axonal projections of PC [53,54]. Double-dose VPA-exposed rats (male and female pooled, E10 and E12 800 mg/kg) exhibited an increased number of ectopic PCs correlated with a 21% reduction in soma size compared to control ones in all ten vermal lobules. While lobules IV and VIc were both affected in decreased PC soma size (30 and 39%, respectively) and PC number (55 and 36%, respectively), lobule VII seemed to be less affected, with only a 9% decrease. In the same study, VPA gestational exposure induced a reduction in Calbindin across all ten vermal lobules. Only 65% of vermal PC were Calbindin positive compared to control animals that were 90% PC Calbindin positive [50]. In this model, Calbindin-positive PC dendrites were shorter and showed reduced branching complexity, in accordance with a previously reported slight increase in spine length and volume in Calbindin KO mice [85], suggesting that a lack of Calbindin could lead to impaired spine morphology, hence reducing synapse formation. Interestingly, no significant changes were observed in the Parvalbumin KO mice. Nonetheless, double transgenic KO mice for the two EF-hand type $Ca^{2+}$ binding proteins (Calbindin and Parvalbumin (PV)) showed significant differences in PC spine morphology compared to wild type [85]. Synapse establishment is a crucial process for PC to engage in cognitive and motor tasks. It has been known that mutations of genes coding for SHANK are impaired in autistic patients [32]. These mutations lead to fewer mature dendritic spines due to impaired spine induction and morphology. In detail, this leads to reduced mature glutamatergic synapses, which would affect cognitive functions. Studies on the male Fmr1 KO mouse model also showed dendritic impairments in the cerebellum, with PC exhibiting longer and immature dendritic spines [44,88]. The eye-blink conditioning, a behavior managed by the cerebellum and mainly the interpositus nucleus, was impaired in both Fmr1 KO and PC-specific Fmr1 KO mice [88] (Table 1). Although eye-blink conditioning was impaired in FXS patients [88,108], repeated training led to improvements in adult patients [108].

Bergmann cells are cerebellar astrocytes that are crucial for PC dendritic formation and maintenance. Post-mortem analysis of six male ASD patients revealed that these cells were activated and reactive in cerebellar areas where PC were reduced [64,90]. This was also observed in VPA rats [86] and Fmr1 KO mice [44]. The microglia oversee the proper neuronal development and have been demonstrated to be involved in synaptic density, spatial localization, morphology, process retraction and thickening, resulting in synaptic pruning. The co-activation of microglia and astroglia seems to correlate with degenerating PC, granule cells and axons. Indeed, post-mortem analysis of ASD patients' cerebellum (male and female, 5–44 years old) showed a pattern of high microglial activation compared to control tissues [90]. However, in our study, no change in microglia was found in the poly I:C animals (P45) [48]. Since microglia are known to be activated during a specific time window, a more detailed investigation of the timing of these processes is needed. In addition, microglia and astroglia activation in post-mortem samples could be an independent event that may not be linked to ASD but rather to traumatic cause of death (listed in [90]). PCs seem to be at the center of the gliosis found in ASD patients and animal models through

auto-toxic mechanisms, independent of adaptative immunity. Indeed, markers found in the perineural compartment of PCs raise the hypothesis of complement system involvement in immunopathogenic means, similarly to what is reported in neurodegenerative disorders. These findings indicate that cerebellar abnormalities found in ASD patients could be due not only to prenatal developmental insults but also to glia-mediated chronic neuroinflammatory processes persisting throughout life.

Other cerebellar cell types, such as basket and stellate cells, seem to be preserved in ASD patients [109]. These observations reinforce the hypothesis that PC density loss could be due to an insult during late prenatal periods, when PCs and inferior olivary neurons establish their connections [105]. Only one study found a decreased granule cell number in ASD patients [90], but findings in this cellular population rarely constitute a perfect match through animal models of various cerebellar pathologies.

### 2.4. Neurotransmission Systems Implicated

Glutamate and GABA have consistently been reported to be the most affected neurotransmission systems in ASD. The nature of motor and cognitive impairments in ASD points toward an excitatory/inhibitory imbalance within the cerebellum (for review, see [87]). The GABA–glutamate imbalance was thought to be responsible only for seizures occurring in some schizophrenic and ASD patients, but recent evidence has proven a wider array of pathologies [51]. For instance, glutamate has been extensively related to neurogenesis, synaptogenesis and neuronal maintenance in relation with emotional behavior acquisition. The cerebellum contains various AMPA, NMDA and kainate glutamate receptors. Using microarrays, autoradiography and western blot on post-mortem patient samples, Purcell et al. compared markers of glutamatergic neurotransmission in ASD subjects (5–54 years old) and neurotypical ones (2.4–53 years old) and reported a decreased AMPA receptors (AMPAR) density in patients' cerebellum [110]. Since glutamatergic interacting proteins 1/2 (Grip1/2) regulate AMPAR trafficking and synaptic strength, PC–AMPAR signaling in ASD was recently examined in a PC-specific knockout mouse model. The specific loss of expression of Grip1/2 in PC resulted in an increased repetitive self-grooming in 3-month-old male mice and impaired mGluR long-term depression (LTD) at the parallel fiber (PF)-PC synapses [51]. In addition, mGluR5 and Arc were increased in a possible attempt to compensate for AMPAR inefficient recycling in the absence of Grip 1/2 [51]. However, no PC loss was found in this animal model [109]. Both excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) and 2 (EAAT2) mRNA and proteins were increased in ASD patients [87]. The EAAT1 and 2 are mainly expressed by Bergmann astroglia in the cerebellum, which is highly activated in ASD patients. The glutamatergic extracellular concentrations are thus suspected to be abnormally elevated in ASD subjects, resulting in an imbalance in excitation/inhibition. This may implicate a glutamate-mediated strong activation of PCs, which in turn would lead to cerebellar inhibition. Interestingly, the precursor of the glutamate synthesis, glutamine, is also upregulated in the left cerebellum of ASD patients [52]. However, a few studies did not report any increase in the ASD glutamatergic system. For instance, DeVito et al. used proton magnetic resonance spectroscopic imaging (1H MRSI) to detect various low-molecular-weight metabolites in vivo in young male ASD patients (6–17 years old) and control subjects (6–16 years old) [111]. Among the studied metabolites, both N-acetyl aspartate and glutamine were reduced in the cerebellum of ASD patients compared to controls, suggesting not only neuronal loss or dysfunction but also reduced levels of glutamate. These results suggest widespread reductions in gray matter neuronal integrity and a dysfunction of cerebellar glutamatergic neurons in ASD patients. However, it is to be noted that no females were used in this study, contrary to the work from Hassan et al. [52]. This is of relevance, as the menstrual cycle influences women's neurotransmitter levels across cortical regions [112]. Further studies with a larger cohort, including sex, age and menstrual cycle parameters, are required to determine parameters influencing the glutamate and glutamine levels in the ASD cerebellum [113]. Glutamatergic transmission is also modified in ASD animal models. Shank2-deficient mice

(Shank2$^{-/-}$) displayed abnormal and repetitive behaviors, as well as autism-like social deficit behaviors [114]. The cerebellar synaptosomes from these mice had fewer AMPA receptor subunits (GluA1 and GluA2) than control without affecting dendritic arborization and postsynaptic density. Electrophysiological recordings in these animals revealed deficits in long-term potentiation (LTP) in PF–PC [114]. In line with these findings, mice with a Shank2 deletion restricted to PC (*Pcp2-Cre;Shank2fl/fl* mice) displayed an interesting phenotype that only partially related to ASD symptomatology [98]. Indeed, social behavior and repetitive behaviors were not observed in this mouse line, as these transgenic mice showed mainly motor coordination impairments and increased anxiety. The PC lacking Shank2 protein (*Pcp2-Cre;Shank2fl/fl* mice) displayed fewer miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) and fewer GluA1,GluA2,GluN2C, VGluT1 and GluD2 protein levels than control [98]. Specific loss of the TSC1 in the PC (*L7Cre;Tsc1flox/1* and *L7Cre;Tsc1flox/flox*) results in ASD behaviors [96]. Indeed, mice carrying this mutation displayed an increase in stereotypic movements, abnormal behavior and changes in PC electrophysical properties. PC lacking Tsc1 had a decrease in action potential frequency and EPSCs, but not IPSCs. This modification led to a decrease in the Excitation:Inhibition (E:I) ratio in mutant mice compared to control [96].

GABA has been studied to a lesser extent in the cerebellum compared to glutamate. Indeed, even though PC generate a GABAergic output, their cerebellar inputs are mainly glutamatergic, except for interneurons regulating PCs' firing pattern. Interestingly, Calbindin reduction in mice resulted in abnormal firing patterns in PC, such as decreased complex spike duration and pause and simple high spike firing rate [55]. These findings suggest that GABAergic inputs on the PC could be partially dependent on Calbindin levels. Lower densities of the two GABA receptor subtypes—GABA-A and GABA-B—have been found in ASD individuals. The GABA-A receptor is known for its fast inhibitory action, whereas GABA-B receptor activation results in excitatory/inhibitory regulation. The subunits GABA-A α protein levels and GABA-B R1 receptor density and levels of glutamic acid decarboxylase (GAD) 65 and 67 proteins, in charge of glutamate to GABA conversion, were all found to be decreased in the cerebella of ASD patients [97,115]. Furthermore, ASD children (5–15 years) showed increased GABA concentration in their plasma [116]. GABAρ3 is a subunit of the GABA-A receptor, with a high affinity for GABA, providing the receptor with low desensitization upon activation. The GABAρ3-composed GABA-A receptor plays an important role in regulating GABAergic transmission during the postnatal development of the cerebellum [27]. In the VPA model, GABAρ3 is decreased by 43% in the lobule X [99], in charge of the gaze coordination. Importantly, GABAρ3 level linearly increases during typical development, but not in the VPA model, as it chronically decreases at each studied time point (P4: −54%, P30: −83%) [99]. A significant reduction of GABA-Aβ1 and GABA-Aβ2 levels were also observed in the cerebellum of Fmr1 KO mice. Interestingly, the decrease in GABA-Aβ1 mRNA is only observed in the cerebellum, whereas GABA-Aβ2 mRNA levels also drop in the cortex, hippocampus and diencephalon [117]. In this mouse model, the administration of a GABA-A (Diazepam) or GABA-B (STX209) agonists results in the improvement of several behavioral deficits and a partial rescue at the molecular level [95,118] (Table 2).

Excitatory/inhibitory imbalance is one of the major hypotheses explaining ASD symptoms. Of interest is the finding that both ASD patients and ASD mouse models (FMRP) displayed surprising GABA dysregulations and glutamate receptor subunit changes, even in *post-mortem* cerebella of ASD subjects, without FXS or FMRP being downregulated, which was associated with increased levels of mGluR5 and decreased levels in GABA-A β3 subunits [92]. Fmr1 KO mouse models confirmed these findings, as PSD-95 (Postsynaptic Density protein 95) and mGluR5 were found to be increased in the cerebellum [93,94,119]. In our study, mGluR5 levels were reduced in the cerebellum of Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ males [49]. These findings suggest that mGluR5 plays a crucial role in the synaptic targeting and postsynaptic assembly of the Shank3 scaffolding complex. Drug therapies targeting this protein could be of interest, as the administration of 3-Cyano-N-(1,3diphenyl-1H-pyrazole-

5-yl) benzamide, which increases mGluR5 activity, was shown to alleviate functional and behavioral ASD defects [91]. In another study, the Fmr1 KO mouse model showed abnormal presynaptic vesicle dynamics and increased LTD induction at the PF-PC synapse [88]. Other models, such as Shank2 KO mice and specific patDP/+ mutant mice, also showed impaired LTD associated with dysfunctional intrinsic plasticity [56]. The latter is based on findings in ASD patients with mutations in 15q11-q13, a genetic region involved in GABA A β3 subunits and two other subunit candidate genes for ASD [120]. The patDp/+ mice mutants within the cerebellum exhibited impairments in motor coordination, learning, eye-blink conditioning, along with abnormal climbing fiber elimination of the PCs [56]. In the Shank2 KO mice, an increased irregularity in simple spike PC firing, accompanied by increased inhibition, was only found in the posterior cerebellum, possibly underlying cognitive impairments in this model. mGluR1 receptors are expressed by PC mediating LTD plasticity with parallel fiber [121]. In the postnatal developing cerebellum, the mGluR1 activating pathway is involved in axon pruning [122]. The inactivation of this receptor in mice (mGluR1$^{-/-}$) leads to a lack of motor coordination [123]. Even though the role of these receptors is crucial in glutamatergic transmission in the cerebellum, there is yet no direct evidence of mGlur1 dysfunction in ASD. In conclusion, there is an imbalance of the excitation/inhibition inputs in the cerebellum of ASD animal models and patients, with a significant reduction in GABA amount due to a reduction of its synthesizing enzymes GAD65 and GAD67. This is accompanied by a decrease in GABA receptors' activity, causing an increase in the activity of mGluR5. The mGluR signaling has been shown to be involved in GABA-A receptor stabilization at the synaptic membrane [124] in a healthy context. This may underly the fact that mGluR dysfunctions in ASD are often linked to GABA-A dysregulations. However, it appears that a reduction of the activity of mGluR5 can also lead to social deficits. Pharmacological treatments in animal models indicate that either activating the GABAergic system or inactivating the mGluR5 receptor may be of interest in managing some of the ASD symptoms where a reduced activity of the GABAergic system is reported. In the case of a decrease in mGluR5 levels or activity, the activation of mGluR5 reduces social deficits by restoring the excitation/inhibition balance.

### 2.5. Evidence from Our Previous Work

We have recently set up a series of studies on environmental and genetic animal models of ASD [47–49]. Our choice of the models was based mainly on their reported strong construct and face validity, as they were known to replicate both the etiology of the disease and at least some of its cardinal behavioral symptoms. The predictive value of animal models is hard to achieve, especially when no known treatment for the corresponding illness is available, which is the case for ASD. Our main aims when starting these studies were: (i) to determine whether different animal models of the same pathology would yield a spectrum of behavioral and cellular outcomes, mirroring the large and variable range of ASD symptoms in clinical settings, i.e., whether the nature (motor, social, gait) and the severity of the symptoms are variables depending on the etiology of the disease; (ii) to determine whether we can replicate the sexual dimorphism reported in clinical settings, as ASD affects three times more males than females [2], and again, whether sexual dimorphism is observed whatever the animal model and with the same proportion; (iii) to determine whether motor and gait deficits are observed in all animal models and whether they are correlated with the severity of social deficits. All experiments were performed within a relatively short timeframe (4 years in total), in the same laboratory and animal facility, using the same behavioral and bench equipment and software. For this, we have chosen two environmental animal models: the VPA and the poly I:C, a maternal immune activation (MIA) animal model and a genetic animal model bearing a Shank3 deletion. All three animal models showed major motor and gait deficits that were more pronounced in males than in females, but to a variable extent.

VPA animal models were obtained by injecting the drug i.p. at 400 mg/kg to pregnant females at E12.5 [47,125] (Table 1). In this model, we have found that the male offspring, but not females, expressed severe social deficits. However, both sexes showed motor coordination and gait deficits that were more pronounced in males than in females in their severity and variety. Cellular consequences accompanied these differential social and behavioral phenotypes. We reported a decrease in the number of PC found in the crus I cerebellar subregion in males and in crus II in females. In addition, only males showed a reduction in the number of neurons within the motor cortex. No neuronal decrease was found in the striatal region. Of interest is the finding that the severity of motor and gait disturbances was directly and strongly correlated to deficits in social behavior, as mice that had the most motor coordination deficits were the ones that had major social deficits and the highest decrease in PC within the cerebellar cortices.

In order to induce MIA, pregnant mice received a single i.p. injection of poly I:C (20 mg/kg, a double-stranded RNA analog polyinosinic:polycytidylic acid, which presents strong construct and face validity toward ASD and is the preferred MIA paradigm compared to direct injection of viruses [48,126]. Mice that received a Poly I:C injection at the prenatal age of 12.5, inducing an MIA phenotype, showed less dramatic social and motor behavior alterations than those following VPA injection [48]. Only males showed deficits in social behavior and motor coordination. Of interest is that neither gait nor walking skills were affected in either males or females. A reduced number of PC in the cerebellum was found to be more widespread and within distinct lobules in males than in females.

The Shank3$^{\Delta c/\Delta c}$ mice that we have used for our studies are those with C-terminal 508 deletion in the Shank3 gene following a frameshift in exon 21, which includes the homer-binding site in the sterile alpha motif domain. Consequently, there is a partial or total loss of the major naturally occurring isoforms of Shank3 proteins in heterozygotes and homozygotes, respectively [127]. This mutation has a strong construct validity, as it mimics a human mutation, which is not the case for several other Shank3 mutations in mice [127]. In homozygote animals, we reported significant impairments in social novelty preference, stereotyped behavior and gait. These were accompanied by a decreased number of PC in restricted cerebellar sub-regions and decreased cerebellar expression of mGluR5. Heterozygote mice showed impairments only in social novelty preference, grooming and decreased mGluR5 expression, but to a much lesser extent than in homozygote mice. All reported deficits were more pronounced in males than in females (Table 2).

Several elements of conclusion can be drawn for our studies: (i) The severity of ASD phenotypes, whether behavioral, cellular or molecular, varies from one animal model to another. This recapitulates in some way the spectrum of the disease, where variability may be due to its etiology, i.e., to what initially caused it. In our study, the VPA model yielded the most robust and severe phenotypes at all explored behavioral and cellular levels. (ii) Females are globally less affected than males in all the paradigms explored, whatever the treatment or the mutation. This is in line with clinical settings, where ASD is reported to be present three times more in males than in females. Notably, females showed no social deficits but still exhibited motor and gait alterations. In addition, the decrease in the number of PC was found in different sub lobules in females than in males. This suggests that ASD may be expressed differently in relation to sexual dimorphism. Thus, the proportion of affected ASD females may be higher than previously suspected if one also investigates motor and gait behavior. Such behaviors may be of relevance to implement in clinical exploration to help diagnose the disease. (iii) When the phenotypes explored are robust, as with the VPA animal model, the magnitude of social deficits can be correlated to both motor and gait deficits and PC cell number. In line with the previous conclusion, this further suggests that exploring motor and gait deficits may constitute an objective, early and quantitative diagnosis tool in ASD.

## 3. Striatal Involvement in ASD

### 3.1. Anatomical Evidence of Striatal Involvement in ASD

The basal ganglia are a group of subcortical nuclei involved primarily in motor skills. The term "Basal Ganglia" refers to the striatum and the globus pallidus, while the substantia nigra (mesencephalon), the subthalamic nuclei (diencephalon) and the pons are related nuclei [128]. The basal ganglia and their related nuclei can be split into three groups: input nuclei receiving incoming information from different cerebral areas, output nuclei sending basal ganglia information to the thalamus and intrinsic nuclei located in between, playing the role of a relay. The striatum is the largest subcortical structure and the only input nucleus of the basal ganglia (Figure 2). Although it has been remarkably conserved through the evolution of the vertebrate lineage for 530 million years, the striatum enhanced its role from primarily motor relay in amniotes to a complex circuitry capable of motor control (action selection), dealing with emotions and motivational state in mammals [129,130]. In primates and humans, the striatum is formed by the caudate and the putamen, separated by the internal capsule in the dorsal part and the nucleus accumbens in the ventral part. For the rest of the mammalians, the striatum is divided into two parts: the dorsal and ventral striatum. The dorsal striatum receives inputs from the sensory and motor cortices, the insular cortex and the orbital cortex on its lateral part (i.e., on the putamen in primates and humans) and the visual cortex, the anterior cingulate cortex, the ventral hippocampus and the amygdala on its medial part (i.e., on the caudate). The nucleus accumbens receives inputs from prelimbic and infralimbic cortices, the amygdala, the hypothalamus and the ventral hippocampus. This input organization leads to each territory's specializations from the motor to associative and cognitive mechanisms, from dorsolateral to dorsomedial and ventral striatum [129,130].

In the late 20th century, several studies took an interest in symptoms and brain structures other than the cardinal ones by studying the link between ASD and the cerebellum, as we discussed before. First evidence of the involvement of the striatum in the physiopathology of ASD was obtained from imaging studies [131–133]. Studies over the last decades highlighted anatomical differences between ASD and non-ASD subjects regarding the striatum and reported a wide range of modifications and inconsistencies. On the one hand, only the putamen and nucleus accumbens volumes appear to increase by, respectively, 22% and 34% in ASD patient brain compared to age-matched controls. The caudate volume was not significantly different between groups [84]. On the other hand, all the striatum, i.e., the caudate, was found to be more prominent in ASD patient brains than age-matched controls in magnetic resonance imaging studies [134–136]. Thus, the larger right caudate volume seems to be positively correlated with repetitive and stereotyped behavior [134–136] and negatively correlated with insistence on sameness [135]. Interestingly, neuroanatomical changes of the striatum are also found in animal models of ASD but can be different from one model to another: Neuroligin3 Knock-In (B6/129F2 strain, 15 weeks of age), Shank3$^{-/-}$ (B6/SV129 strain, 22–23 weeks of age) and Cntnap2$^{-/-}$ (C57BL/6J strain, 8–9 weeks of age) transgenic mice, for example, have bigger striatum than control littermates [69], while 16p11$^{+/-}$ mice (B6/129F2 strain 32–35 weeks of age) have a bigger nucleus accumbens [137]. Idiopathic models of ASD, such as the BTBR mice (C57BL/6J strain, 11 weeks of age) show a reduction of their striatal volume [138]. Although no modification of the global striatal volume has been reported in FVB/NJ mice exposed in utero to valproic acid (VPA) (National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan), the balance between striosomes and the matrix is reported to be impaired at postnatal day 8 (P8) depending on the time of the VPA administration. These two compartments receive different cortical inputs: the matrix compartment receives inputs from the cortical sensorimotor areas, while the striosomal compartment receives inputs from prelimbic and insular cortices. The authors reported that both striosomal and matrix areas were affected and could be linked with both social and motor impairments in ASD, highlighting the heterogeneous nature of the disease [28] (Table 2). These differences align with the inconsistencies reported in humans and reflect the large scale of striatal neuroanatomical changes. More generally, all three parts of the

striatum are involved in functions that are altered in one way or another in ASD. The dorsolateral striatum has been linked to motor stereotypies in a large range of species, from rodents [139] to monkeys [140], and to insensitivity to reward devaluation [141]. The dorsomedial striatum has been linked to executive dysfunctions and abnormal reactivity [142], and the nucleus accumbens has been linked to the inability to process and respond to social cues [33].

Taken together, these sets of results indicate that all three striatal parts are affected in ASD patient brains and animal models of ASD, reinforcing the link between the striatum and ASD symptoms.

### 3.2. Cellular Consequences Correlates

Despite increasing their volume, the numerical density of neurons is reported to decrease by 15% in the nucleus accumbens and 13% in the putamen in patients diagnosed with ASD and comorbidities [84]. These findings need to be more thoroughly replicated, as 7 out of 14 patients included in the study (50%) were diagnosed with seizure, and death was seizure related for 5 of them. Similar variations in striatal cellular alterations were also found in ASD animal models. In VPA mice and rats, no drastic striatal neuronal loss has been described. A recent paper strongly suggested that the lack of PV staining observed in the striatum of VPA mouse model should not be attributed to cell loss but rather to a decrease in PV protein contents within the interneurons, as the cell can still be observed using another marker (Vicia Villosa lectin, VVA) [26,143]. Nevertheless, the general cellular organization within the striatum appears to be disturbed, with an impaired aggregation of striosomal cells into cell clusters [28] (see Table 1). This could cause (or enhance) an imbalance between sensorimotor and cognitive inputs on the striatum, leading to social and motor impairments.

Representing more than 95% of the striatal neuronal population, medium spiny neurons (MSNs) are the striatum's main neuronal population and are the striatum's only output. They are segregated into at least two subtypes according to their axonal projection patterns: striatonigral MSNs, or direct pathway MSNs, expressing dopamine receptor D1 (RD1) and striatopallidal MSNs, or indirect pathway MSNs, expressing dopamine receptor D2 (RD2) [129,144]. All MSNs share a similar morphology and exhibit similar properties, except for excitability, which appears to be increased in DRD2-expressing MSN [145]. Male and female 5-week-old Shank3$^{B-/-}$ MSNs exhibit increased neuronal complexity, increased total dendritic length and surface area, but a lower spine density compared to Shank3$^{B+/+}$ littermates [146]. At the age of 2–4 months, a reduced MSNs spine density is also found in Shank3$^{B-/-}$mice, in both males and females, only in DRD2-expressing MSNs [147]. This is particularly relevant to human findings, where regional quantification revealed that RD2, but not RD1, was significantly more expressed in both caudate and putamen of 4–20-year-old ASD male patients, with multiple ethnicities and non-comorbidities-related death [148] (Table 2).

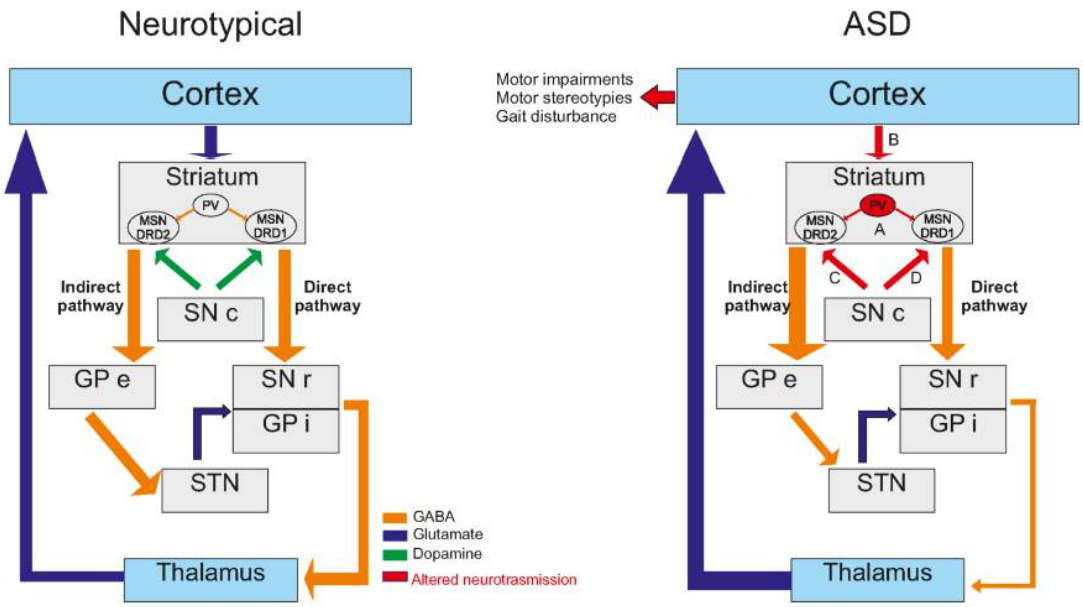



**Figure 2.** Basal ganglia modifications in ASD. Basal ganglia network is shown to be deeply affected in ASD models. The main alterations are found at 4 points of interest (A,B,C,D). Striatal local inhibition mediated by PV interneurons. (A) is altered in some ASD models like Shank1$^{-/-}$ and Shank3B$^{-/-}$ mice [149], VPA mice [26] or Cntnap2$^{-/-}$ mice [143]. Responsible of feed-forward inhibition, alteration of these interneurons may lead to altered MSNs' functionality. Interestingly, corticostriatal pathway (B) is widely described as altered in ASD models. For instance, in Ngln$^{-/-}$ mice, Ngln3$^{-/-}$ mice, Shank3$^{-/-}$ mice [150] or Shank2$^{-/-}$ rats [151], alterations of the glutamatergic transmission onto MSNs are reported. Thus, alterations of plasticity were also highlighted in Shank3e4-22$^{-/-}$ mice [91]. However, the dichotomy between direct and indirect pathway allows to highlight some pathway-specific alteration. On the one hand, some alterations were found to be specific of the indirect pathway (C), like an increase of DRD2 expression in the striatum, leading to a dopaminergic imbalance in favor of the indirect pathway [148,152]. On the other hand, some alterations were found to be specific to the direct pathway (D) as alteration of synaptic transmission has been highlighted in DRD1 MSNs but not DRD2 in NL3-cKO mice [153]. Thus, in Nlgn1$^{-/-}$ mice, the AMPA/NMDA ratio was found to be reduced specifically in direct pathway MSNs [154], leading to an altered response.

The striatal interneurons are responsible for local inputs and regulation, which play a major role in the striatum's functionality. A conjoint depletion of the PV fast-spiking and cholinergic interneurons in the dorsal striatum leads to autism-like behavior in male mice [155], but not in females, suggesting that interneurons, including cholinergic interneurons, could be involved in ASD physiopathology and could take part in the reported sexual dimorphism in ASD patients and animal models [47–49]. The central role of cholinergic interneurons is further highlighted, as they are also involved in other brain pathologies. For instance, they have been directly linked to Tourette's syndrome or attention deficit hyperactivity disorder [156] and motor stereotypies, as a lesion of these cells in the dorsal striatum significantly prolonged their duration [157,158]. A significant increase in the stereotyped behavior was also found in mice (C57BL/6, 6–21 weeks) with a loss of MeCP2 in somatostatin-expressing interneurons, including in the striatum [159]. Nevertheless, there is no available information regarding the involvement of striatal somatostatin-expressing interneurons in ASD physiopathology.

The striatal PV fast-spiking interneurons, responsible for gamma oscillations and feed-forward inhibition onto MSNs, are important in the excitatory/inhibitory balance [129,160]. The inactivation of the PV gene in mice leads to reduced social interactions, reduced ultrasonic vocalizations and repetitive and stereotyped patterns of behavior [161]. This ASD-like phenotype of $PV^{-/-}$ mice is also directly correlated with brain morphological abnormalities similar to those reported in patients. This is accompanied by functional disturbances, as $PV^{-/-}$ fast-spiking interneurons exhibit a lower excitatory post-synaptic current facilitation, i.e., a lower excitatory synaptic plasticity [161]. Interestingly, these striatal PV fast-spiking interneurons are not only related to ASD-like mechanisms when targeted but are commonly affected in ASD models. PV expression levels are reduced in the striatum of $Shank1^{-/-}$ and $Shank3^{B-/-}$ mice, the two mice models of ASD, without a loss of PV interneurons [149]. Similar findings are reported in VPA mice [26] or $Cntnap2^{-/-}$ mice [143]. Given that $PV^{-/-}$ mice ASD-like phenotype is strongly relevant to human ASD core symptoms and related abnormalities and that PV fast-spiking interneurons are affected in a wide range of ASD models, a PV hypothesis of ASD has been formulated recently [162] (Table 3).

Glial cells, including astrocytes and microglia, are now well known to influence synapse formation and function, as astrocytes, for example, can make contact with multiple neurons and express receptors and ion channels that are also expressed in neurons [163]. The role of astrocytes in ASD physiopathology has been demonstrated by re-expressing Mecp2 in whole-brain astrocytes in $Mecp2^{-/-}$ mice (C57BL/6 strain, 4–8 weeks of age), leading to the recovery of motor symptoms [164]. However, no striatum-specific astroglial changes in $Shank3^{+/\Delta C}$ and $Cntnap2^{-/-}$ male mice (C57BL/6J strain, 5–6 months of age) were reported [165]. The overexpression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in macrophages in mice, i.e., in microglia in the central nervous system, leads to elevated protein synthesis and abnormal morphology of microglia, as well as an increase in their size and number within the striatum of both males and females (C57BL/6 strain, 2–6 weeks of age). This overexpression of eIF4E in microglia has no phenotypic consequences in females, but it causes ASD-like phenotype in male mice [166], suggesting that microglial impairment could cause ASD with a sexual polarity. Thus, a significant increase in the size and number of microglial cells in the striatum has been reported in $Pten^{+/-}$ and $Fmr1^{-/-}$ mice [166]. These two models exhibit core ASD features, such as social deficits [167,168] and repetitive behavior [169,170], suggesting that microglia could also be impaired due to ASD.

### 3.3. Neurotransmission Systems Implicated

In the early 2000s, John Rubenstein and Michael Merzenich formulated the excitation/inhibition (E/I) imbalance hypothesis of ASD, suggesting that the physiopathology of ASD and their related comorbidities may reflect a disturbance in such a balance [87]. Even though their work focused only on the cortical networks, it may be easily extended to striatal networks, as the striatum receives major excitatory inputs from cortices areas and major inhibitory inputs from the local interneurons network [142]. Added to the dopaminergic and serotoninergic neuromodulations, this would lead to a balance within the striatum, which is essential for its functioning. Another argument suggests an E/I imbalance in the striatum is found in the numerous genes involved in ASD physiopathology. According to the SFARI database, nearly one-third of genes (68 out of 213) used to model ASD in mice directly concern synaptic establishment, strength and/or transmission or are associated with receptors in pre- and/or post-synaptic compartments. Most of these genes are expressed in the striatum, although not exclusively.

**Table 3.** Striatal dysfunctions in ASD. This table sums up the striatal dysfunctions identified in patients and animal models of ASD.

| | | Children | | Teenagers | Adults | Animal Models |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | <5 yo | 5 to 14 yo | 14 to 21 yo | >21 yo | |
| Anatomical impairment | *Volume* | • N/A | • ↗ Volume of putamen and nucleus accumbens but not of the caudate [82] | • ↗ Volume of putamen, accumbens & caudate [133–136] | | • ↗ Striatal volume in cntnap2 ko mice [57]<br>• ↘ Striatal volume in btbr mice [137] |
| | *Matrice/striosome organization* | • N/A | • N/A | • N/A | • N/A | • Impaired balance in vpa exposed mice [28] |
| Cellular correlates | *Medium spiny neurons* | • N/A | • Decreased neuronal density in nucleus accumbens and putamen [82] | | | • ↗ Neuronal complexity, ↗ dendritic length and surface area, ↘ Spine density in Shank3B KO mice [146]<br>• ↗ Spine density in DRD2-expressing msns in Shank3B$^{-/-}$ mice [147] |
| | *PV interneurons* | • N/A | | | | • ↘ ePSCs [155]<br>• ↘ PV expression [26,143]<br>• No cell loss [143–156] |
| | *Astrocyte* | • N/A | • N/a | | | • No striatum-specific changes in shank3$^{+/\delta c}$ or cntnap2 ko mice [160] |
| | *Microglia* | • N/A | • N/a | | | • ↗ Size and number of microglial cells [161] |
| Neurotransmission | *Glutamate* | • N/A | • N/A | • N/A | • N/A | • ↗ sEPSCs amplitude and frequency [171]<br>• ↘ NMDA/AMPA ratio [170] & ↘ NMDA-R function [172]<br>• ↘ AMPA mediated mEPSCs amplitude & frequency, no defect in paired-pulse ratio [146]<br>• ↘ NMDA/AMPA ratio but no changes in mEPSCs amplitude or frequency [173]<br>• Abnormal distribution and ↗ expression of mGluR5 in MSNs in [119] |
| | *GABA* | • N/A | • N/A | • N/A | • N/A | • ↘ mIPSCs amplitude [171]<br>↘ mIPSCs frequency in ventral DRD1-expressing MSNs only [174]<br>↗ sIPSCs & mIPSCs frequency in Fmr1 KO mice [175] |
| | *Dopamine* | • N/A | • N/A | • ↗ DRD2 mRNA in MSN [148] | • N/A | • ↘ DAT level in BTBR and Fmr1 KO mice [176] |

N/A: not applicable.

Both ionotropic and metabotropic receptors mediate the glutamatergic responses in the striatum and are differentially expressed throughout the striatal territories at the pre-or post-synaptic compartments. While metabotropic receptors are involved in long-term synaptic plasticity, the ionotropic receptors, i.e., AMPA-R and NMDA-R, are responsible for the neurotransmission itself in the striatum [172,177]. In ASD, alterations of the glutamatergic transmission are reported in several models, such as Nlgn1$^{-/-}$ mice, Ngln3$^{-/-}$ mice, Shank3$^{-/-}$ mice [150] or Shank2$^{-/-}$ rats [151]. In Ngln1$^{-/-}$ mice (C57BL/6 strain, P15-P38), the NMDA/AMPA ratio is reported to be decreased in the dorsal striatum and can be restored to WT levels with the application of D-Cycloserine (DCS), a co-activator of NMDA-R. This rescue of NMDA-R function also lowers the increased grooming behavior observed in Nlgn1$^{-/-}$ mice [178]. Interestingly, in the same mice that are 2–3 weeks old, the NMDA/AMPA ratio is reduced in the direct pathway (DRD1-expressing MSNs) but not in the indirect pathway (DRD2-expressing MSNs) and is directly driven by a decrease in GluN2A-containing NMDA-R currents. However, the strength of the synapse, measured by input/output curves, as well as the short-term plasticity, are not reported to be impaired in KO mice compared to WT littermates [154]. Such a dichotomy between direct and indirect pathway has also been described regarding endocannabinoid (CB)-mediated LTD in a model of selective loss of TSC1 in either DRD1-expressing MSNs or DRD2-expressing MSNs (C57BL/6 strain, P40 to P50) [179]. Here, the authors highlighted impairments of CB-mediated LTD in TSC1$^{-/-}$ DRD1-expressing MNSs but not in DRD2-expressing MSNs. In Fmr1$^{-/-}$ mice (C57BL/6J, males only, adult), a loss of LTD has been described in ventral MSNs, without any CB1-R functional alteration [173]. These findings suggest that impairments of glutamatergic neurotransmission and plasticity are directly linked to the neuromodulation system specificity in ASD.

In another neuroligin model of ASD (R451C-NL3 male mice, B6/J strain, 2 months), a high-frequency stimulation (HFS) protocol failed to induce LTD in R451C-NL3 mice, while it did do so in WT littermates. Furthermore, the application of quinpirole to activate D2 receptors, known to be involved in the establishment of LTD during HFS protocol, did not prevent the induction of LTD in the dorsal striatum of mutated mice [180]. Male and female Shank3B$^{-/-}$ mice (C57BL/6 strain, 5 weeks) exhibited a lower MSNs population spike amplitude than control and reduced miniature AMPA-mediated post-synaptic currents (mEPSCs) amplitude, suggesting a reduction of the post-synaptic response on available synapses [146]. Shank3B$^{-/-}$ MSNs also exhibited a reduced mEPSCs frequency, but there were no defects in the paired-pulse ratio, suggesting that the number of functional synapses is decreased. These findings indicate that cortico-striatal impairments are occurring at the post-synaptic, i.e., striatal disturbances. In another Shank3 mouse model (Shank3$^{e4-9}$ mice, C57BL/6 strain, 3–4 weeks), the NMDA/AMPA ratio significantly decreased at glutamatergic synapses on MSNs from both Shank3$^{e4-9+/-}$ and KO mice compared to WT. Nevertheless, no difference in mEPSCs amplitude of frequency has been highlighted [181]. However, in another mouse model of ASD (eIF4E overexpressing mice, males only, 2–6 months), increased mEPSCs amplitude but not frequency has been highlighted [182]. The authors suggested that the increased expression of this translation initiation factor may lead to exaggerated cap-dependent protein synthesis, such as mGluR5 pathway, as it has been described in the hippocampus of Fmr1$^{-/y}$ mice (C57BL/6J, males only, 3–6 weeks). Considering that no AMPA-mediated disturbances have been reported in several models and that mGluR5 are involved in the potentiation of NMDA response, these findings suggest that the disturbances at glutamatergic synapses are due to decreased NMDA-R function. The mGluR5 receptors are mainly involved in the potentiation of NMDA responses in striatal MSNs and are reported to be abnormally distributed and accumulated in striatal MSNs in Shank3$^{e4-22-/-}$ mice (C57BL/6 strain, 2–5 months). These same mice's MSNs also exhibit enhanced excitability and a loss of plasticity through impairments of high-frequency stimulation (HFS)-induced LTD. All this information suggests that mGluR5 receptors could be dysfunctional and involved in electrophysiological changes observed at excitatory synapses on striatal MSNs in mice models of ASD. To further test

such a hypothesis, the authors proposed a pharmacological enhancement of mGluR5 with 3-cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazole-5-yl)-benzamide (CDPPB) and showed that it restores Shank3$^{e4-22-/-}$ MSNs normal excitability and plasticity, as well as behavioral ASD-like behavior [91]. In Shank3Δ11$^{-/-}$ mice (C57BL/6 strain, 3 months), pharmacological enhancement of mGluR5 with CDPPB leads to a total recovery of NMDA receptor functions, compared to WT littermates [91].

Although GABAergic transmission is crucial for proper striatal function, this transmission is far less studied in an ASD context. The first apparent involvement of the GABAergic transmission in ASD physiopathology is following the knock-out of either GABA-A receptor subunit α5 or β3 in mice that leads to ASD-like phenotype [171,174]. In Chd8$^{+/-}$ mice (C57BL/6 strain, males only, 6–8 weeks), the MSNs of the ventral striatum exhibited decreased miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) amplitude, compared to WT littermates, while no changes were observed in mIPSC frequency. The authors also report increased spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) amplitude and frequency but no changes in mEPSCs [175]. This suggests that the observed enhancement of the excitatory transmission is partly allowed by a local decrease in inhibitory transmission. In the NL3-cKO mice (C57BL/6 strain, males only, 4–6 weeks), a reduction in the mIPSC frequency, but not amplitude, is reported in ventral striatum D1-MSNs only. The authors also report no changes in the paired-pulse ratio of evoked IPSCs or short-term plasticity and no changes in excitatory transmission. Added to a significant decrease in inhibition/excitation ratio, measured by the ratio between GABA receptor-mediated inhibition and AMPA receptor-mediated excitation, this suggests that the GABAergic alterations observed in inhibition of D1-MSNs of the ventral striatum could be responsible for a shift of balance between synaptic excitation and inhibition [153]. Little is known regarding the implication of dorsal striatum GABAergic transmission in ASD. To date, the most comprehensive study on that topic concerns the Fmr1$^{-/-}$ mouse model, in which extensive GABAergic disturbances have been reported [183]. In this study, the authors found that dorsal striatal MSNs of Fmr1$^{-/-}$ mice (C57BL/6 strain, 2–3 months) have a higher sIPSCs and mIPSCs frequency than WT littermates, but no changes were found in sIPSCs and mIPSCs amplitude and kinetic properties. In addition, the paired-pulse ratio of evoked IPSCs is lower in Frm1$^{-/-}$ mice than WT littermates at 50 ms interstimulus interval, but not at 80 ms interstimulus interval. Taken together, these findings suggest that alterations may occur in pre-synaptic neurons, but in an action-potential-independent manner.

Post-mortem analysis of striata of ASD young patients revealed an increase in RD2 mRNA within MSNs in both the caudate and putamen using radioisotopic in situ hybridization histochemistry [148]. This suggested a dopaminergic imbalance in favor of the indirect pathways in ASD patients [152]. This may support dopaminergic targeted therapeutics that are currently used to manage ASD-related symptoms, such as irritability or aggression. Indeed, treatments with D2 antagonists result in improved sociality (under risperidone) [184] and a decrease in stereotypy scores (under aripiprazole) [185]. Interestingly, it seems that the direct pathway is only dysfunctional when activated during a task. A study in young ASD adults using PET ([$^{11}$C]raclopride, a D2-antagonist) simultaneously with magnetic resonance scanning during an incentive task revealed a decrease in phasic dopaminergic release in the putamen and caudate nucleus, suggesting an impairment in the learning and goal-directed reinforcement [186]. The dopaminergic content is not extensively studied in ASD due to the result disparateness among animal models, especially regarding the striatal dopaminergic content, tyrosine hydroxylase staining and dopaminergic transporter (DAT) levels (for review, see [176]). Dysfunction in the striatal direct pathway in ASD animal models leads to deficits in social interactions and an increase in grooming [153,187,188]. Optogenetic stimulation of the nigrostriatal pathway (ii) was shown to reduce the preference for the social target in the 3-chamberts test (3-CT) with an increase in rearing but no change in grooming or digging behaviors. The stimulation also caused an increase in p-ERK1/2 and p-CAMKIIα levels in the dorsal caudate nucleus-putamen (CPu) [187]. The indirect pathway seems to be not as affected as the direct pathway in ASD mouse

models, but studies on early life stress in $D2R^{+/-}$ heterozygous mice showed that these mice display ASD-like phenotype [188] (Table 3).

Alterations in the dopaminergic and glutamatergic systems have been found in several animal models of ASD. For example, a diminution of DAT level is observed in the BTBR mice and Fmr1 KO mice models [188]. It is also interesting to note that in both models, there is an increase in tyrosine hydroxylase-positive neurons (TH+) coupling with VGlut1+ neurons [188] due to the existence of a strong link between VGlut1 and mGluR5 [189]. The inactivation of adenylyl cyclase 5 (AC5), an effector of the D2R and mGluR3 receptor in the striatum, induces ASD-like behaviors in mice [190]. Interestingly, mGluR3 has an antagonistic effect on mGluR5, mirroring the interrelation between D1R and D2R. In the case of WT mice, either the activation of mGluR5 (with DHPG) or the inactivation of mGluR3 (with LY341495) is sufficient to induce ASD-like behaviors [190], as is the inactivation of either GluA1 or GluN2B.

## 4. Epigenetic Alterations in the Brain of ASD Animal Models

Interactions between specific genes and environmental factors play an essential role in the development of ASD, acting directly or indirectly on the transmission and transduction systems detailed above [191]. Environmental factors can affect gene expression without causing changes in the DNA sequence, but by acting via epigenetic mechanisms: DNA methylation, histone modifications or post-transcriptional regulation by non-coding RNAs. Thus, the exposure to environmental factors can cause changes in the expression of critical genes in a crucial period of embryonic and fetal development, resulting in an increased risk of inducing ASD [192]. This is a significant focus of current research, specifically in deciphering the link between environmental insults that occur very early in life and a pathological phenotype that is only observed later in childhood or even adulthood. Epigenetic modifications may be essential molecular mechanisms that can translate early aggressions into lasting brain pathologies that could even be transmitted to the descendants. The best-characterized epigenetic modification is DNA cytosine methylation [193]. This mechanism is already known to be involved in neurodevelopmental disorders, such as Prader Willy/Angelman or Fragile X syndromes, which are major causes of ASD with intellectual disability that have been known for a long time in humans [194]. Methylated cytosines are mainly localized at CpG islands, corresponding to regions of the genome enriched in GC and essentially present in the promoter regions of genes. The primary known function of cytosine methylation at these islands is to repress transcription of the downstream gene(s) [195]. However, there are many exceptions, and the mechanism by which DNA methylation regulates transcription may be specific to different contexts, such as gene content, locus and time of development. Furthermore, DNA methylation is thought to be more abundant in gene bodies, where it probably plays a primary role in fine alternative splicing and expression regulation [196].

In the mouse prefrontal cortex, significant reconfiguration of the methylome occurs throughout synaptogenesis from fetus to young adult [197]. This is thought to be a critical process in defining the molecular identity of neurons [197]. In humans, DNA methylation alterations in the cortex and anterior cingulate gyrus have been observed in patients with ASD [198]. The differentially methylated genes were primarily related to microglial cell specification and synaptic pruning during brain development [198]. More recently, Nardone et al. refined these observations more selectively on neurons after FACS cell sorting of the prefrontal cortex. In doing so, they identified differences in DNA-specific methylation profiles in neuronal nuclei affecting genes related to synaptic, GABAergic and immune processes [199]. This is the first characterization of neuron-specific DNA methylation changes in ASD and is consistent with observations by Lister et al. in mice that showed a specific distribution of methylation in neurons that appeared very different from other tissues, with as many methylated cytosines outside of GC-rich regions as in CpG islands [197]. Epigenetic changes in specific brain structures other than the cortex have only rarely been reported. Notably, the differences in methylation and acetylation

of lysine 27 of histone 3 (H3K27) in the cerebellum have been detected in autistic patients compared to controls [200]. Furthermore, in the developing human prefrontal cortex, the 3D organization of chromatin forms loops around synapse-related genes, allowing the regulation of their expression [201]. The formation of these loops is probably regulated by DNA methylation [196]. Other yet unresolved functions of DNA methylation likely play major roles in brain development and neurodevelopmental disorders such as ASD.

Regarding transmission systems, the GABA and Glutamate pathways have already been linked to epigenetic changes. Indeed, an increase in glutamate concentration was identified in the blood of ASD patients compared to healthy subjects [201]. This increase in glutamate metabolism, which could be associated with ASD in children, could be genetic in origin and under epigenetic control. Similarly, the alterations in synaptic physiology in PV interneurons previously described may be related to a deficiency in genes encoding GABA-related enzymes, which alters neuronal GABA content [202].

Concerning the link between epigenetics and environmental insults known to increase the risk of ASD, Richetto et al. [203] showed that maternal infections mimicked by poly I:C injection result in persistent changes in DNA methylation. These changes are visible in many different genomic regions and are related to the timing of prenatal infection. Indeed, late prenatal infection during pregnancy induced methylation changes in significant genes of GABAergic cell development, while early prenatal infection seemed to affect mainly the WNT signaling pathway, involved in the nervous system development [203]. These epigenetic mechanisms have been suggested to be involved in maintaining the long-term effects of prenatal insults, as well as maintaining the cellular dysfunctions they generate [203,204].

In addition, a growing body of evidence proposes the gut microbiota as a likely key player modulating the effect of environmental factors on brain function. This could occur through changes in the immune system and epigenetic machinery. Changes in microbiota composition have been found in patients with behavioral disorders and autism spectrum disorders [205], adding further complexity to the already multifactorial pathogenic mechanisms associated with neurodevelopmental and psychiatric disorders. Epigenetic changes in ASD could notably be induced by metabolites produced by an abnormal gut microbiota [206].

## 5. Conclusions and Future Direction

Although we better understand the implication of the cerebellum and the striatum in ASD, further studies are needed on at least two aspects. First, more knowledge should be gathered on a widespread population of ASD patients without gender or age bias. This means systematically including women and middle-aged and senior ASD patients that are often left out of clinical studies. The state of the brain and its maturation are both sex- and age-dependent. Second, there is an urgent need to focus on developing effective treatments to alleviate ASD symptoms, and knowledge of cellular and molecular correlates of the disease is key to help in this research avenue. Motor social and cognitive functions are common features between the cerebellum and the striatum, which are only two synapses away from each other. A better and more thorough assessment of the corresponding interconnections may lead to breakthroughs in this field.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, M.T., V.T., A.M., M.E., M.J. and L.G.; writing—review and editing, M.J., L.G.; visualization, L.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** M.T. and V.T. are partially funded through "Région Nouvelle Aquitaine".

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

3

## References


1. Lai, M.C.; Lombardo, M.V.; Baron-Cohen, S. Autism. *Lancet* **2014**, *383*, 896–910. [CrossRef]
2. Loomes, R.; Hull, L.; Mandy, W.P.L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **2017**, *56*, 466–474. [CrossRef] [PubMed]
3. Liu, J.; Nyholt, D.R.; Magnussen, P.; Parano, E.; Pavone, P.; Geschwind, D.; Lord, C.; Iversen, P.; Hoh, J.; Autism Genetic Resource Exchange Consortium; et al. A Genomewide Screen for Autism Susceptibility Loci. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 327–340. [CrossRef] [PubMed]
4. Folstein, S.E.; Rutter, M.L. Autism: Familial aggregation and genetic implications. *J. Autism Dev. Disord.* **1988**, *18*, 3–30. [CrossRef] [PubMed]
5. Bailey, W.; Popovich, B.; Jones, K.L. Monozygotic twins discordant for Russell-Silver syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1995**, *58*, 101–105. [CrossRef]
6. Sandin, S.; Lichtenstein, P.; Kuja-Halkola, R.; Larsson, H.; Hultman, C.M.; Reichenberg, A. The familial risk of autism. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2014**, *311*, 1770–1777. [CrossRef]
7. Constantino, J.N.; Zhang, Y.; Frazier, T.; Abbacchi, A.M.; Law, P. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *Am. J. Psychiatry* **2010**, *167*, 1349–1356. [CrossRef]
8. Risch, N.; Hoffmann, T.J.; Anderson, M.; Croen, L.A.; Grether, J.K.; Windham, G.C. Familial recurrence of autism spectrum disorder: Evaluating genetic and environmental contributions. *Am. J. Psychiatry* **2014**, *171*, 1206–1213. [CrossRef]
9. De Rubeis, S.; He, X.; Goldberg, A.P.; Poultney, C.S.; Samocha, K.; Cicek, A.E.; Kou, Y.; Liu, L.; Fromer, M.; Walker, S.; et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **2014**, *515*, 209–215. [CrossRef]
10. Jiang, H.Y.; Xu, L.L.; Shao, L.; Xia, R.M.; Yu, Z.H.; Ling, Z.X.; Yang, F.; Deng, M.; Ruan, B. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *58*, 165–172. [CrossRef]
11. Shigemoto-Mogami, Y.; Hoshikawa, K.; Sato, K. Activated microglia disrupt the blood-brain barrier and induce chemokines and cytokines in a rat in vitro model. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 494. [CrossRef] [PubMed]
12. Zawadzka, A.; Cieślik, M.; Adamczyk, A. The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11561. [CrossRef]
13. Phiel, C.J.; Zhang, F.; Huang, E.Y.; Guenther, M.G.; Lazar, M.A.; Klein, P.S. Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36734–36741. [CrossRef] [PubMed]
14. Löscher, W. Basic pharmacology of valproate: A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* **2002**, *16*, 669–694. [CrossRef] [PubMed]
15. Coste, J.; Blotiere, P.O.; Miranda, S.; Mikaeloff, Y.; Peyre, H.; Ramus, F.; Zureik, M.; Weill, A.; Dray-Spira, R. Risk of early neurodevelopmental disorders associated with in utero exposure to valproate and other antiepileptic drugs: A nationwide cohort study in France. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
16. Roux, S.; Bailly, Y.; Bossu, J.L. Regional and sex-dependent alterations in Purkinje cell density in the valproate mouse model of autism. *Neuroreport* **2019**, *30*, 82–88. [CrossRef]
17. Morová, M.; Krškova, L. Autistic-Like Traits in Laboratory Rodents Exposed to Phthalic Acid Esters During Early Development – an Animal Model of Autism? *Physiol. Res.* **2021**, *70*, 345–361. [CrossRef]
18. Wöhr, M.; Roullet, F.I.; Hung, A.Y.; Sheng, M.; Crawley, J.N. Communication impairments in mice lacking shank1: Reduced levels of ultrasonic vocalizations and scent marking behavior. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e0020631. [CrossRef]
19. Yang, M.; Bozdagi, O.; Scattoni, M.L.; Wöhr, M.; Roullet, F.I.; Katz, A.M.; Abrams, D.N.; Kalikhman, D.; Simon, H.; Woldeyohannes, L.; et al. Reduced excitatory neurotransmission and mild Autism-Relevant phenotypes in adolescent shank3 null mutant mice. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 6525–6541. [CrossRef]
20. Roy, S.; Watkins, N.; Heck, D. Comprehensive Analysis of Ultrasonic Vocalizations in a Mouse Model of Fragile X Syndrome Reveals Limited, Call Type Specific Deficits. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44816. [CrossRef]
21. Kanner, L. Autistic Disturbances of affective contact. *Nerv. Child* **1943**, *2*, 217–250.
22. Asperger, H. Die „Autistischen Psychopathen" im Kindesalter. *Arch. Psychiatr. Nervenkrankh.* **1944**, *117*, 76–136. [CrossRef]
23. Amaral, D.G.; Schumann, C.M.; Nordahl, C.W. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 137–145. [CrossRef] [PubMed]
24. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; American Psychiatric Association: Washington, DC, USA, 2013; ISBN 0-89042-555-8.
25. Sarnat, H.B.; Netsky, M.G. When does a ganglion become a brain? Evolutionary origin of the central nervous system. *Semin. Pediatr. Neurol.* **2002**, *9*, 240–253. [CrossRef] [PubMed]
26. Dianne, M. Broussard What Do. In *The Cerebellum*; Wiley Online Books; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp. 213–214, ISBN 9781118730133.
27. Leiner, H.C.; Leiner, A.L.; Dow, R.S. Does the Cerebellum Contribute to Mental Skills? *Behav. Neurosci.* **1986**, *100*, 443–454. [CrossRef] [PubMed]
28. Middleton, F.A.; Strick, P.L. Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. *Science* **1994**, *266*, 458–461. [CrossRef]
29. Allen, G.; Buxton, R.B.; Wong, E.C.; Courchesne, E. Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* **1997**, *275*, 1940–1943. [CrossRef]

30. Leroi, I.; O'Hearn, E.; Marsh, L.; Lyketsos, C.G.; Rosenblatt, A.; Ross, C.A.; Brandt, J.; Margolis, R.L. Psychopathology in Patients With Degenerative Cerebellar Diseases: A Comparison to Huntington's Disease. *Am. J. Psychiatry* **2002**, *159*, 1306–1314. [CrossRef]
31. Ramnani, N.; Behrens, T.E.J.; Johansen-Berg, H.; Richter, M.C.; Pinsk, M.A.; Andersson, J.L.R.; Rudebeck, P.; Ciccarelli, O.; Richter, W.; Thompson, A.J.; et al. The Evolution of Prefrontal Inputs to the Cortico-pontine System: Diffusion Imaging Evidence from Macaque Monkeys and Humans. *Cereb. Cortex* **2006**, *16*, 811–818. [CrossRef]
32. Sugihara, I. Crus I in the Rodent Cerebellum: Its Homology to Crus I and II in the Primate Cerebellum and Its Anatomical Uniqueness among Neighboring Lobules. *Cerebellum* **2018**, *17*, 49–55. [CrossRef]
33. Braitenberg, V.; Atwood, R.P. Morphological observations on the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **1958**, *109*, 1–33. [CrossRef] [PubMed]
34. Eccles, J.C. An instruction-selection theory of learning in the cerebellar cortex. *Brain Res.* **1977**, *127*, 327–352. [CrossRef]
35. Ellegood, J.; Pacey, L.K.; Hampson, D.R.; Lerch, J.P.; Henkelman, R.M. Anatomical phenotyping in a mouse model of fragile X syndrome with magnetic resonance imaging. *Neuroimage* **2010**, *53*, 1023–1029. [CrossRef] [PubMed]
36. Reith, R.M.; McKenna, J.; Wu, H.; Hashmi, S.S.; Cho, S.H.; Dash, P.K.; Gambello, M.J. Loss of Tsc2 in Purkinje cells is associated with autistic-like behavior in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *51*, 93–103. [CrossRef]
37. Varghese, M.; Keshav, N.; Jacot-Descombes, S.; Warda, T.; Wicinski, B.; Dickstein, D.L.; Harony-Nicolas, H.; De Rubeis, S.; Drapeau, E.; Buxbaum, J.D.; et al. Autism spectrum disorder: Neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* **2017**, *134*, 537–566. [CrossRef]
38. Al Sagheer, T.; Haida, O.; Balbous, A.; Francheteau, M.; Matas, E.; Fernagut, P.O.; Jaber, M. Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2018**, *21*, 871–882. [CrossRef]
39. Haida, O.; Al Sagheer, T.; Balbous, A.; Francheteau, M.; Matas, E.; Soria, F.; Fernagut, P.O.; Jaber, M. Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Transl. Psychiatry* **2019**, *9*. [CrossRef]
40. Matas, E.; Maisterrena, A.; Thabault, M.; Balado, E.; Francheteau, M.; Balbous, A.; Galvan, L.; Jaber, M. Major motor and gait deficits with sexual dimorphism in a Shank3 mutant mouse model. *Mol. Autism* **2021**, *12*. [CrossRef]
41. Main, S.L.; Kulesza, R.J. Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience* **2017**, *340*, 34–47. [CrossRef]
42. Mejias, R.; Chiu, S.L.; Han, M.; Rose, R.; Gil-Infante, A.; Zhao, Y.; Huganir, R.L.; Wang, T. Purkinje cell-specific Grip1/2 knockout mice show increased repetitive self-grooming and enhanced mGluR5 signaling in cerebellum. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *132*. [CrossRef]
43. Hassan, T.H.; Abdelrahman, H.M.; Abdel Fattah, N.R.; El-Masry, N.M.; Hashim, H.M.; El-Gerby, K.M.; Abdel Fattah, N.R. Blood and brain glutamate levels in children with autistic disorder. *Res. Autism Spectr. Disord.* **2013**, *7*, 541–548. [CrossRef]
44. Ingram, J.L.; Peckham, S.M.; Tisdale, B.; Rodier, P.M. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* **2000**, *22*, 319–324. [CrossRef]
45. Mychasiuk, R.; Richards, S.; Nakahashi, A.; Kolb, B.; Gibb, R. Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy. *Dev. Neurosci.* **2012**, *34*, 268–276. [CrossRef] [PubMed]
46. Servais, L.; Bearzatto, B.; Schwaller, B.; Dumont, M.; De Saedeleer, C.; Dan, B.; Barski, J.J.; Schiffmann, S.N.; Cheron, G. Mono- and dual-frequency fast cerebellar oscillation in mice lacking parvalbumin and/or calbindin D-28k. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *22*, 861–870. [CrossRef] [PubMed]
47. Piochon, C.; Kloth, A.D.; Grasselli, G.; Titley, H.K.; Nakayama, H.; Hashimoto, K.; Wan, V.; Simmons, D.H.; Eissa, T.; Nakatani, J.; et al. Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism. *Nat. Commun.* **2014**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
48. Albus, J.S. A theory of cerebellar function. *Math. Biosci.* **1971**, *10*, 25–61. [CrossRef]
49. Kemper, T.L.; Bauman, M.L. The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurol. Clin.* **1993**, *11*, 175–187. [CrossRef]
50. Ghaziuddin, M.; Butler, E.; Tsai, L.; Ghaziuddin, N. Is clumsiness a marker for Asperger syndrome? *J. Intellect. Disabil. Res.* **2008**, *38*, 519–527. [CrossRef]
51. Gowen, E.; Hamilton, A. Motor abilities in autism: A review using a computational context. *J. Autism Dev. Disord.* **2013**, *43*, 323–344. [CrossRef]
52. Maudsley, H. Reviews and Notices. *BMJ* **1867**, *1*, 540–541. [CrossRef]
53. Limperopoulos, C.; Bassan, H.; Gauvreau, K.; Robertson, R.L.; Sullivan, N.R.; Benson, C.B.; Avery, L.; Stewart, J.; Soul, J.S.; Ringer, S.A.; et al. Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors? *Pediatrics* **2007**, *120*, 584–593. [CrossRef] [PubMed]
54. Courchesne, E. Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1997**, *7*, 269–278. [CrossRef]
55. Bailey, A.; Luthert, P.; Dean, A.; Harding, B.; Janota, I.; Montgomery, M.; Rutter, M.; Lantos, P. A clinicopathological study of autism. In *The Science of Mental Health: Volume 2: Autism*; Routledge: New York, NY, USA, 2013; Volume 121, pp. 141–157, ISBN 9781136800818.
56. Baron-Cohen, S.; Ashwin, E.; Ashwin, C.; Tavassoli, T.; Chakrabarti, B. Talent in autism: Hyper-systemizing, hyper-attention to detail and sensory hypersensitivity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 1377–1383. [CrossRef] [PubMed]

57. Phillips, J.R.; Hewedi, D.H.; Eissa, A.M.; Moustafa, A.A. The Cerebellum and Psychiatric Disorders. *Front. Public Health* **2015**, *3*. [CrossRef]
58. Arnett, A.B.; Wang, T.; Eichler, E.E.; Bernier, R.A. Reflections on the genetics-first approach to advancements in molecular genetic and neurobiological research on neurodevelopmental disorders. *J. Neurodev. Disord.* **2021**, *13*, 24. [CrossRef] [PubMed]
59. Murakami, J.W.; Courchesne, E.; Press, G.A.; Yeung-Courchesne, R.; Hesselink, J.R. Reduced Cerebellar Hemisphere Size and Its Relationship to Vermal Hypoplasia in Autism. *Arch. Neurol.* **1989**, *46*, 689–694. [CrossRef]
60. Allen, G.; Müller, R.A.; Courchesne, E. Cerebellar function in autism: Functional magnetic resonance image activation during a simple motor task. *Biol. Psychiatry* **2004**, *56*, 269–278. [CrossRef]
61. Ellegood, J.; Crawley, J.N. Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 521–533. [CrossRef]
62. Dum, R.P.; Strick, P.L. An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* **2003**, *89*, 634–639. [CrossRef]
63. Peter, S.; De Zeeuw, C.I.; Boeckers, T.M.; Schmeisser, M.J. Cerebellar and striatal pathologies in mouse models of autism spectrum disorder. In *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*; Springer: New York, NY, USA, 2017; Volume 224, pp. 103–119.
64. Belichenko, N.P.; Belichenko, P.V.; Hong, H.L.; Mobley, W.C.; Francke, U. Comparative Study of Brain Morphology in Mecp2 Mutant Mouse Models of Rett Syndrome. *J. Comp. Neurol.* **2008**, *508*, 184–195. [CrossRef]
65. Aldinger, K.A.; Kogan, J.; Kimonis, V.; Fernandez, B.; Horn, D.; Klopocki, E.; Chung, B.; Toutain, A.; Weksberg, R.; Millen, K.J.; et al. Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2013**, *161*, 131–136. [CrossRef] [PubMed]
66. Srivastava, S.; Scherrer, B.; Prohl, A.K.; Filip-Dhima, R.; Kapur, K.; Kolevzon, A.; Buxbaum, J.D.; Berry-Kravis, E.; Soorya, L.; Thurm, A.; et al. Volumetric Analysis of the Basal Ganglia and Cerebellar Structures in Patients with Phelan-McDermid Syndrome. *Pediatr. Neurol.* **2019**, *90*, 37–43. [CrossRef] [PubMed]
67. Jamain, S.; Radyushkin, K.; Hammerschmidt, K.; Granon, S.; Boretius, S.; Varoqueaux, F.; Ramanantsoa, N.; Gallego, J.; Ronnenberg, A.; Winter, D.; et al. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1710–1715. [CrossRef] [PubMed]
68. Akshoomoff, N.; Lord, C.; Lincoln, A.J.; Courchesne, R.Y.; Carper, R.A.; Townsend, J.; Courchesne, E. Outcome classification of preschool children with autism spectrum disorders using MRI brain measures. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **2004**, *43*, 349–357. [CrossRef] [PubMed]
69. Courchesne, E.; Karns, C.M.; Davis, H.R.; Ziccardi, R.; Carper, R.A.; Tigue, Z.D.; Chisum, H.J.; Moses, P.; Pierce, K.; Lord, C.; et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. *Neurology* **2001**, *57*, 245–254. [CrossRef] [PubMed]
70. Brito, A.R.; Vasconcelos, M.M.; Domingues, R.C.; Hygino Da Cruz, L.C.; Rodrigues, L.D.S.; Gasparetto, E.L.; Calçada, C.A.B.P. Diffusion tensor imaging findings in school-aged autistic children. *J. Neuroimaging* **2009**, *19*, 337–343. [CrossRef]
71. Hanaie, R.; Mohri, I.; Kagitani-Shimono, K.; Tachibana, M.; Azuma, J.; Matsuzaki, J.; Watanabe, Y.; Fujita, N.; Taniike, M. Altered Microstructural Connectivity of the Superior Cerebellar Peduncle is Related to Motor Dysfunction in Children with Autistic Spectrum Disorders. *Cerebellum* **2013**, *12*, 645–656. [CrossRef]
72. Noonan, S.K.; Haist, F.; Müller, R.A. Aberrant functional connectivity in autism: Evidence from low-frequency BOLD signal fluctuations. *Brain Res.* **2009**, *1262*, 48–63. [CrossRef]
73. Khan, A.J.; Nair, A.; Keown, C.L.; Datko, M.C.; Lincoln, A.J.; Müller, R.A. Cerebro-cerebellar resting-state functional connectivity in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 625–634. [CrossRef]
74. Pierce, K.; Courchesne, E. Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol. Psychiatry* **2001**, *49*, 655–664. [CrossRef]
75. Stoodley, C.J.; Valera, E.M.; Schmahmann, J.D. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: An fMRI study. *Neuroimage* **2012**, *59*, 1560–1570. [CrossRef] [PubMed]
76. Gilbert, S.J.; Bird, G.; Brindley, R.; Frith, C.D.; Burgess, P.W. Atypical recruitment of medial prefrontal cortex in autism spectrum disorders: An fMRI study of two executive function tasks. *Neuropsychologia* **2008**, *46*. [CrossRef] [PubMed]
77. Kelly, E.; Meng, F.; Fujita, H.; Morgado, F.; Kazemi, Y.; Rice, L.C.; Ren, C.; Escamilla, C.O.; Gibson, J.M.; Sajadi, S.; et al. Regulation of autism-relevant behaviors by cerebellar–prefrontal cortical circuits. *Nat. Neurosci.* **2020**, *23*, 1102–1110. [CrossRef]
78. Stoodley, C.J.; D'Mello, A.M.; Ellegood, J.; Jakkamsetti, V.; Liu, P.; Nebel, M.B.; Gibson, J.M.; Kelly, E.; Meng, F.; Cano, C.A.; et al. Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nat. Neurosci.* **2017**, *20*, 1744–1751. [CrossRef]
79. Vilensky, J.A. Gait Disturbances in Patients with Autistic Behavior. *Arch. Neurol.* **1981**, *38*. [CrossRef] [PubMed]
80. Mosconi, M.W.; Wang, Z.; Schmitt, L.M.; Tsai, P.; Sweeney, J.A. The role of cerebellar circuitry alterations in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 296. [CrossRef] [PubMed]
81. Wegiel, J.; Flory, M.; Kuchna, I.; Nowicki, K.; Ma, S.Y.; Imaki, H.; Wegiel, J.; Cohen, I.L.; London, E.; Wisniewski, T.; et al. Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol. Commun.* **2014**, *2*. [CrossRef]
82. Fatemi, S.H.; Halt, A.R.; Realmuto, G.; Earle, J.; Kist, D.A.; Thuras, P.; Merz, A. Purkinje Cell Size Is Reduced in Cerebellum of Patients with Autism. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2002**, *22*, 171–175. [CrossRef]

83. Bailey, A. A clinicopathological study of autism. *Brain* **1998**, *121*, 889–905. [CrossRef]
84. Jeong, J.-W.; Tiwari, V.N.; Behen, M.E.; Chugani, H.T.; Chugani, D.C. In vivo detection of reduced Purkinje cell fibers with diffusion MRI tractography in children with autistic spectrum disorders. *Front. Hum. Neurosci.* **2014**, *8*, 110. [CrossRef]
85. Skefos, J.; Cummings, C.; Enzer, K.; Holiday, J.; Weed, K.; Levy, E.; Yuce, T.; Kemper, T.; Bauman, M. Regional alterations in Purkinje cell density in patients with autism. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e0081255. [CrossRef] [PubMed]
86. McCarthy, M.M.; Wright, C.L. Convergence of Sex Differences and the Neuroimmune System in Autism Spectrum Disorder. *Biol. Psychiatry* **2017**, *81*, 402–410. [CrossRef] [PubMed]
87. Haraguchi, S.; Sasahara, K.; Shikimi, H.; Honda, S.I.; Harada, N.; Tsutsui, K. Estradiol promotes purkinje dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis during neonatal life by inducing the expression of BDNF. *Cerebellum* **2012**, *11*, 416–417. [CrossRef]
88. Hoffman, J.F.; Wright, C.L.; McCarthy, M.M. A critical period in purkinje cell development is mediated by local estradiol synthesis, disrupted by inflammation, and has enduring consequences only for males. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 10039–10049. [CrossRef] [PubMed]
89. Vecellio, M.; Schwaller, B.; Meyer, M.; Hunziker, W.; Celio, M.R. Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28 k and parvalbumin knock-out mice. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 945–954. [CrossRef]
90. Leblond, C.S.; Nava, C.; Polge, A.; Gauthier, J.; Huguet, G.; Lumbroso, S.; Giuliano, F.; Stordeur, C.; Depienne, C.; Mouzat, K.; et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004580. [CrossRef]
91. Koekkoek, S.K.E.; Yamaguchi, K.; Milojkovic, B.A.; Dortland, B.R.; Ruigrok, T.J.H.; Maex, R.; De Graaf, W.; Smit, A.E.; VanderWerf, F.; Bakker, C.E.; et al. Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron* **2005**, *47*, 339–352. [CrossRef]
92. Tobia, M.J.; Woodruff-Pak, D.S. Delay Eyeblink Classical Conditioning is Impaired in Fragile X Syndrome. *Behav. Neurosci.* **2009**, *123*, 665. [CrossRef]
93. Vargas, D.L.; Nascimbene, C.; Krishnan, C.; Zimmerman, A.W.; Pardo, C.A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* **2005**, *57*, 67–81. [CrossRef]
94. Sobaniec-Lotowska, M.E. Ultrastructure of Purkinje cell perikarya and their dendritic processes in the rat cerebellar cortex in experimental encephalopathy induced by chronic application of valproate. *Int. J. Exp. Pathol.* **2001**, *82*, 337–348. [CrossRef]
95. Whitney, E.R.; Kemper, T.L.; Rosene, D.L.; Bauman, M.L.; Blatt, G.J. Density of cerebellar basket and stellate cells in autism: Evidence for a late developmental loss of Purkinje cells. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 2245–2254. [CrossRef] [PubMed]
96. Rubenstein, J.L.R.; Merzenich, M.M. Model of autism: Increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* **2003**, *2*, 255–267. [CrossRef] [PubMed]
97. Purcell, A.E.; Jeon, O.H.; Zimmerman, A.W.; Blue, M.E.; Pevsner, J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology* **2001**, *57*, 1618–1628. [CrossRef] [PubMed]
98. DeVito, T.J.; Drost, D.J.; Neufeld, R.W.J.; Rajakumar, N.; Pavlosky, W.; Williamson, P.; Nicolson, R. Evidence for Cortical Dysfunction in Autism: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging Study. *Biol. Psychiatry* **2007**, *61*, 465–473. [CrossRef]
99. Neill Epperson, C.; Haga, K.; Mason, G.F.; Sellers, E.; Gueorguieva, R.; Zhang, W.; Weiss, E.; Rothman, D.L.; Krystal, J.H. Cortical gamma-aminobutyric acid levels across the menstrual cycle in healthy women and those with premenstrual dysphoric disorder: A proton magnetic resonance spectroscopy study. *Arch. Gen. Psychiatry* **2002**, *59*, 851–858. [CrossRef]
100. Dickinson, A.; Jones, M.; Milne, E. Measuring neural excitation and inhibition in autism: Different approaches, different findings and different interpretations. *Brain Res.* **2016**, *1648*, 277–289. [CrossRef]
101. Peter, S.; Ten Brinke, M.M.; Stedehouder, J.; Reinelt, C.M.; Wu, B.; Zhou, H.; Zhou, K.; Boele, H.J.; Kushner, S.A.; Lee, M.G.; et al. Dysfunctional cerebellar Purkinje cells contribute to autism-like behaviour in Shank2-deficient mice. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. [CrossRef]
102. Ha, S.; Lee, D.; Cho, Y.S.; Chung, C.; Yoo, Y.E.; Kim, J.; Lee, J.; Kim, W.; Kim, H.; Bae, Y.; et al. Cerebellar shank2 regulates excitatory synapse density, motor coordination, and specific repetitive and anxiety-like behaviors. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 12129–12143. [CrossRef]
103. Tsai, P.T.; Hull, C.; Chu, Y.; Greene-Colozzi, E.; Sadowski, A.R.; Leech, J.M.; Steinberg, J.; Crawley, J.N.; Regehr, W.G.; Sahin, M. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* **2012**, *488*, 647–651. [CrossRef]
104. Fatemi, S.H.; Halt, A.R.; Stary, J.M.; Kanodia, R.; Schulz, S.C.; Realmuto, G.R. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol. Psychiatry* **2002**, *52*, 805–810. [CrossRef]
105. Yip, J.; Soghomonian, J.-J.; Blatt, G.J. IncreasedGAD67 mRNA expression in cerebellar interneurons in autism: Implications for Purkinje cell dysfunction. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*. [CrossRef] [PubMed]
106. Dhossche, D.; Applegate, H.; Abraham, A.; Maertens, P.; Bland, L.; Bencsath, A.; Martinez, J. Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: Stimulus for a GABA hypothesis of autism. *Med. Sci. Monit.* **2002**, *8*, PR1–PR6. [PubMed]
107. Pétriz, A.; Reyes-Haro, D.; González-González, M.A.; Miledi, R.; Martínez-Torres, A. GABAρ subunits confer a bicuculline-insensitive component to GFAP + cells of cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 17522–17527. [CrossRef]
108. Varman, D.R.; Soria-Ortíz, M.B.; Martínez-Torres, A.; Reyes-Haro, D. GABAρ3 expression in lobule X of the cerebellum is reduced in the valproate model of autism. *Neurosci. Lett.* **2018**, *687*, 158–163. [CrossRef] [PubMed]

109. Hong, A.; Zhang, A.; Ke, Y.; El Idrissi, A.; Shen, C.H. Downregulation of GABA(A) β subunits is transcriptionally controlled by Fmr1p. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *46*, 272–275. [CrossRef]
110. Heulens, I.; D'Hulst, C.; Van Dam, D.; De Deyn, P.P.; Kooy, R.F. Pharmacological treatment of fragile X syndrome with GABAergic drugs in a knockout mouse model. *Behav. Brain Res.* **2012**, *229*, 244–249. [CrossRef]
111. Henderson, C.; Wijetunge, L.; Kinoshita, M.N.; Shumway, M.; Hammond, R.S.; Postma, F.R.; Brynczka, C.; Rush, R.; Thomas, A.; Paylor, R.; et al. Reversal of disease-related pathologies in the fragile X mouse model by selective activation of GABAB receptors with arbaclofen. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*. [CrossRef]
112. Fatemi, S.H.; Folsom, T.D.; Kneeland, R.E.; Liesch, S.B. Metabotropic glutamate Receptor 5 upregulation in children with autism is associated with underexpression of both fragile X mental retardation protein and GABA A receptor beta 3 in adults with autism. *Anat. Rec.* **2011**, *294*, 1635–1645. [CrossRef]
113. Muddashetty, R.S.; Kelić, S.; Gross, C.; Xu, M.; Bassell, G.J. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 5338–5348. [CrossRef]
114. Bear, M.F.; Huber, K.M.; Warren, S.T. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* **2004**, *27*, 370–377. [CrossRef]
115. Fatemi, S.H.; Aldinger, K.A.; Ashwood, P.; Bauman, M.L.; Blaha, C.D.; Blatt, G.J.; Chauhan, A.; Chauhan, V.; Dager, S.R.; Dickson, P.E.; et al. Consensus paper: Pathological role of the cerebellum in Autism. *Cerebellum* **2012**, *11*, 777–807. [CrossRef] [PubMed]
116. Vicidomini, C.; Ponzoni, L.; Lim, D.; Schmeisser, M.J.; Reim, D.; Morello, N.; Orellana, D.; Tozzi, A.; Durante, V.; Scalmani, P.; et al. Pharmacological enhancement of mGlu5 receptors rescues behavioral deficits in SHANK3 knock-out mice. *Mol. Psychiatry* **2017**, *22*, 689–702. [CrossRef] [PubMed]
117. Blatt, G.J. GABAergic Cerebellar System In Autism: A Neuropathological And Developmental Perspective. *Int. Rev. Neurobiol.* **2005**, *71*, 167–178. [PubMed]
118. Ito, M.; Sakurai, M.; Tongroach, P. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* **1982**, *324*, 113–134. [CrossRef] [PubMed]
119. Kano, M.; Hashimoto, K.; Kurihara, H.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Aiba, A.; Tonegawa, S. Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. *Neuron* **1997**, *18*, 71–79. [CrossRef]
120. Ichise, T.; Kano, M.; Hashimoto, K.; Yanagihara, D.; Nakao, K.; Shigemoto, R.; Katsuki, M.; Aiba, A. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* **2000**, *288*, 1832–1835. [CrossRef]
121. Bannai, H.; Niwa, F.; Sherwood, M.W.; Shrivastava, A.N.; Arizono, M.; Miyamoto, A.; Sugiura, K.; Lévi, S.; Triller, A.; Mikoshiba, K. Bidirectional Control of Synaptic GABAAR Clustering by Glutamate and Calcium. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2768. [CrossRef]
122. Nicolini, C.; Fahnestock, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp. Neurol.* **2018**, *299*, 217–227. [CrossRef]
123. Shi, L.; Smith, S.E.P.; Malkova, N.; Tse, D.; Su, Y.; Patterson, P.H. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 116–123. [CrossRef]
124. Kouser, M.; Speed, H.E.; Dewey, C.M.; Reimers, J.M.; Widman, A.J.; Gupta, N.; Liu, S.; Jaramillo, T.C.; Bangash, M.; Xiao, B.; et al. Loss of predominant shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 18448–18468. [CrossRef]
125. Lanciego, J.L.; Luquin, N.; Obeso, J.A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
126. Kreitzer, A.C. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* **2009**, *32*, 127–147. [CrossRef] [PubMed]
127. Subramanian, K.; Brandenburg, C.; Orsati, F.; Soghomonian, J.J.; Hussman, J.P.; Blatt, G.J. Basal ganglia and autism—A translational perspective. *Autism Res.* **2017**, *10*, 1751–1775. [CrossRef] [PubMed]
128. Creasey, H.; Rumsey, J.M.; Schwartz, M.; Duara, R.; Rapoport, J.L.; Rapoport, S.I. Brain Morphometry in Autistic Men as Measured by Volumetric Computed Tomography. *Arch. Neurol.* **1986**, *43*, 669–672. [CrossRef] [PubMed]
129. Aylward, E.H.; Schwartz, J.; Machlin, S.; Pearl, G. Bicaudate Ratio as a Measure of Caudate Volume on MR Images. *Am. J. Neuroradiol.* **1991**, *12*, 1217–1222.
130. Reiss, A.L.; Faruque, F.; Naidu, S.; Abrams, M.; Beaty, T.; Bryan, R.N.; Moser, H. Neuroanatomy of Rett syndrome: A volumetric imaging study. *Ann. Neurol.* **1993**, *34*, 227–234. [CrossRef]
131. Hollander, E.; Anagnostou, E.; Chaplin, W.; Esposito, K.; Haznedar, M.M.; Licalzi, E.; Wasserman, S.; Soorya, L.; Buchsbaum, M. Striatal volume on magnetic resonance imaging and repetitive behaviors in autism. *Biol. Psychiatry* **2005**, *58*, 226–232. [CrossRef]
132. Langen, M.; Schnack, H.G.; Nederveen, H.; Bos, D.; Lahuis, B.E.; de Jonge, M.V.; van Engeland, H.; Durston, S. Changes in the Developmental Trajectories of Striatum in Autism. *Biol. Psychiatry* **2009**, *66*, 327–333. [CrossRef]
133. Rojas, D.C.; Peterson, E.; Winterrowd, E.; Reite, M.L.; Rogers, S.J.; Tregellas, J.R. Regional gray matter volumetric changes in autism associated with social and repetitive behavior symptoms. *BMC Psychiatry* **2006**, *6*, 56. [CrossRef]
134. Portmann, T.; Yang, M.; Mao, R.; Panagiotakos, G.; Ellegood, J.; Dolen, G.; Bader, P.L.; Grueter, B.A.; Goold, C.; Fisher, E.; et al. Behavioral abnormalities and circuit defects in the basal ganglia of a mouse model of 16p11.2 deletion syndrome. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1077–1092. [CrossRef]
135. Ellegood, J.; Anagnostou, E.; Babineau, B.A.; Crawley, J.N.; Lin, L.; Genestine, M.; Dicicco-Bloom, E.; Lai, J.K.Y.; Foster, J.A.; Peñagarikano, O.; et al. Clustering autism: Using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity. *Mol. Psychiatry* **2015**, *20*, 118–125. [CrossRef]

136. Kuo, H.Y.; Liu, F.C. Valproic acid induces aberrant development of striatal compartments and corticostriatal pathways in a mouse model of autism spectrum disorder. *FASEB J.* **2017**, *31*, 4458–4471. [CrossRef]
137. Ashkenazi, S.L.; Polis, B.; David, O.; Morris, G. Striatal cholinergic interneurons exert inhibition on competing default behaviours controlled by the nucleus accumbens and dorsolateral striatum. *Eur. J. Neurosci.* **2021**, *53*, 2078–2089. [CrossRef] [PubMed]
138. Tu, Z.; Zhao, H.; Li, B.; Sen, Y.; Lu, W.; Yongjin, T.; Zhujun, L.; Dazhang, B.; Caijuan, L.; Yingqi, L.; et al. CRISPR/Cas9-mediated disruption of SHANK3 in monkey leads to drug-treatable autism-like symptoms. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 561–571. [CrossRef] [PubMed]
139. Lingawi, N.W.; Balleine, B.W. Amygdala central nucleus interacts with dorsolateral striatum to regulate the acquisition of habits. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 1073–1081. [CrossRef] [PubMed]
140. Fuccillo, M.V. Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
141. Schiavi, S.; Iezzi, D.; Manduca, A.; Leone, S.; Melancia, F.; Carbone, C.; Petrella, M.; Mannaioni, G.; Masi, A.; Trezza, V. Reward-Related Behavioral, Neurochemical and Electrophysiological Changes in a Rat Model of Autism Based on Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
142. Lauber, E.; Filice, F.; Schwaller, B. Prenatal valproate exposure differentially affects parvalbumin-expressing neurons and related circuits in the cortex and striatum of mice. *Front. Mol. Neurosci.* **2016**, *9*, 1–16. [CrossRef] [PubMed]
143. Lauber, E.; Filice, F.; Schwaller, B. Dysregulation of Parvalbumin Expression in the Cntnap2$^{-/-}$ Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
144. Jaber, M.; Robinson, S.W.; Missale, C.; Caron, M.G. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 1503–1519. [CrossRef]
145. Kreitzer, A.C.; Malenka, R.C. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* **2007**, *445*, 643–647. [CrossRef]
146. Peça, J.; Feliciano, C.; Ting, J.T.; Wang, W.; Wells, M.F.; Venkatraman, T.N.; Lascola, C.D.; Fu, Z.; Feng, G. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* **2011**, *472*, 437–442. [CrossRef] [PubMed]
147. Wang, W.; Li, C.; Chen, Q.; Van Der Goes, M.S.; Hawrot, J.; Yao, A.Y.; Gao, X.; Lu, C.; Zang, Y.; Zhang, Q.; et al. Striatopallidal dysfunction underlies repetitive behavior in Shank3-deficient model of autism. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 1978–1990. [CrossRef] [PubMed]
148. Brandenburg, C.; Soghomonian, J.J.; Zhang, K.; Sulkaj, I.; Randolph, B.; Kachadoorian, M.; Blatt, G.J. Increased Dopamine Type 2 Gene Expression in the Dorsal Striatum in Individuals with Autism Spectrum Disorder Suggests Alterations in Indirect Pathway Signaling and Circuitry. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
149. Filice, F.; Janickova, L.; Henzi, T.; Bilella, A.; Schwaller, B. The Parvalbumin Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 1–24. [CrossRef]
150. Li, W.; Pozzo-Miller, L. Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. *J. Neurosci. Res.* **2020**, *98*, 2130–2147. [CrossRef]
151. Modi, M.E.; Brooks, J.M.; Guilmette, E.R.; Beyna, M.; Graf, R.; Reim, D.; Schmeisser, M.J.; Boeckers, T.M.; O'Donnell, P.; Buhl, D.L. Hyperactivity and hypermotivation associated with increased striatal mglur1 signaling in a Shank2 rat model of autism. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 1–17. [CrossRef]
152. Provenzano, G.; Zunino, G.; Genovesi, S.; Sgadó, P.; Bozzi, Y. Mutant mouse models of autism spectrum disorders. *Dis. Markers* **2012**, *33*, 225–239. [CrossRef]
153. Rothwell, P.E.; Fuccillo, M.V.; Maxeiner, S.; Hayton, S.J.; Gokce, O.; Lim, B.K.; Fowler, S.C.; Malenka, R.C.; Südhof, T.C. Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. *Cell* **2014**, *158*, 198–212. [CrossRef]
154. Espinosa, F.; Xuan, Z.; Liu, S.; Powell, C.M. Neuroligin 1 modulates striatal glutamatergic neurotransmission in a pathway and NMDAR subunit-specific manner. *Front. Synaptic Neurosci.* **2015**, *7*, 1–16. [CrossRef]
155. Rapanelli, M.; Frick, L.R.; Xu, M.; Groman, S.M.; Jindachomthong, K.; Tamamaki, N.; Tanahira, C.; Taylor, J.R.; Pittenger, C. Targeted Interneuron Depletion in the Dorsal Striatum Produces Autism-like Behavioral Abnormalities in Male but Not Female Mice. *Biol. Psychiatry* **2017**, *82*, 194–203. [CrossRef] [PubMed]
156. Poppi, L.A.; Ho-Nguyen, K.T.; Shi, A.; Daut, C.T.; Tischfield, M.A. Recurrent Implication of Striatal Cholinergic Interneurons in a Range of Neurodevelopmental, Neurodegenerative, and Neuropsychiatric Disorders. *Cells* **2021**, *10*, 907. [CrossRef]
157. Aliane, V.; Pérez, S.; Bohren, Y.; Deniau, J.M.; Kemel, M.L. Key role of striatal cholinergic interneurons in processes leading to arrest of motor stereotypies. *Brain* **2011**, *134*, 110–118. [CrossRef] [PubMed]
158. Xu, M.; Kobets, A.; Du, J.C.; Lennington, J.; Li, L.; Banasr, M.; Duman, R.S.; Vaccarino, F.M.; DiLeone, R.J.; Pittenger, C. Targeted ablation of cholinergic interneurons in the dorsolateral striatum produces behavioral manifestations of tourette syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 893–898. [CrossRef] [PubMed]
159. Ito-Ishida, A.; Ure, K.; Chen, H.; Swann, J.W.; Zoghbi, H.Y. Loss of MeCP2 in Parvalbumin-and Somatostatin-Expressing Neurons in Mice Leads to Distinct Rett Syndrome-like Phenotypes. *Neuron* **2015**, *88*, 651–658. [CrossRef]
160. Owen, S.F.; Berke, J.D.; Kreitzer, A.C. Fast-Spiking Interneurons Supply Feedforward Control of Bursting, Calcium, and Plasticity for Efficient Learning. *Cell* **2018**, *172*, 683–695.e15. [CrossRef]

161. Wöhr, M.; Orduz, D.; Gregory, P.; Moreno, H.; Khan, U.; Vörckel, K.J.; Wolfer, D.P.; Welzl, H.; Gall, D.; Schiffmann, S.N.; et al. Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Transl. Psychiatry* **2015**, *5*, e525. [CrossRef]
162. Filice, F.; Vörckel, K.J.; Sungur, A.Ö.; Wöhr, M.; Schwaller, B. Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Mol. Brain* **2016**, *9*, 1–17. [CrossRef]
163. Petrelli, F.; Pucci, L.; Bezzi, P. Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **2016**, *10*, 1–8. [CrossRef]
164. Lioy, D.T.; Garg, S.K.; Monaghan, C.E.; Raber, J.; Foust, K.D.; Kaspar, B.K.; Hirrlinger, P.G.; Kirchhoff, F.; Bissonnette, J.M.; Ballas, N.; et al. A role for glia in the progression of Rett-syndrome. *Nature* **2011**, *475*, 497–500. [CrossRef]
165. Cope, E.C.; Briones, B.A.; Brockett, A.T.; Martinez, S.; Vigneron, P.A.; Opendak, M.; Wang, S.S.H.; Gould, E. Immature neurons and radial glia, but not astrocytes or microglia, are altered in adult Cntnap2 and Shank3 mice, models of autism. *eNeuro* **2016**, *3*. [CrossRef]
166. Xu, Z.X.; Kim, G.H.; Tan, J.W.; Riso, A.E.; Sun, Y.; Xu, E.Y.; Liao, G.Y.; Xu, H.; Lee, S.H.; Do, N.Y.; et al. Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations. *Nat. Commun.* **2020**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
167. Mineur, Y.S.; Huynh, L.X.; Crusio, W.E. Social behavior deficits in the Fmr1 mutant mouse. *Behav. Brain Res.* **2006**, *168*, 172–175. [CrossRef] [PubMed]
168. Clipperton-Allen, A.E.; Page, D.T. Pten haploinsufficient mice show broad brain overgrowth but selective impairments in autism-relevant behavioral tests. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 3490–3505. [CrossRef] [PubMed]
169. Clipperton-Allen, A.E.; Page, D.T. Decreased aggression and increased repetitive behavior in Pten haploinsufficient mice. *Genes Brain Behav.* **2015**, *14*, 145–157. [CrossRef]
170. Kazdoba, T.M.; Leach, P.T.; Silverman, J.L.; Crawley, J.N. Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse. *Intractable Rare Dis. Res.* **2014**, *3*, 118–133. [CrossRef]
171. Ravenscroft, P.; Brotchie, J. NMDA receptors in the basal ganglia. *J. Anat.* **2000**, *196*, 577–585. [CrossRef]
172. Stefani, A.; Chen, Q.; Flores-Hernandez, J.; Jiao, Y.; Reiner, A.; Surmeier, D.J. Physiological and molecular properties of AMPA/kainate receptors expressed by striatal medium spiny neurons. *Dev. Neurosci.* **1998**, *20*, 242–252. [CrossRef]
173. Blundell, J.; Blaiss, C.A.; Etherton, M.R.; Espinosa, F.; Tabuchi, K.; Walz, C.; Bolliger, M.F.; Südhof, T.C.; Powell, C.M. Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 2115–2129. [CrossRef]
174. Benthall, K.N.; Cording, K.R.; Agopyan-Miu, A.H.C.W.; Wong, C.D.; Chen, E.Y.; Bateup, H.S. Loss of Tsc1 from striatal direct pathway neurons impairs endocannabinoid-LTD and enhances motor routine learning. *Cell Rep.* **2021**, *36*. [CrossRef]
175. Jung, K.M.; Sepers, M.; Henstridge, C.M.; Lassalle, O.; Neuhofer, D.; Martin, H.; Ginger, M.; Frick, A.; Dipatrizio, N.V.; MacKie, K.; et al. Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat. Commun.* **2012**, *3*. [CrossRef] [PubMed]
176. Martella, G.; Meringolo, M.; Trobiani, L.; De Jaco, A.; Pisani, A.; Bonsi, P. The R451C-Neuroligin 3 mutation hampers the expression of long-term synaptic depression in the dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* **2017**, *47*, 701–708. [CrossRef] [PubMed]
177. Jaramillo, T.C.; Speed, H.E.; Xuan, Z.; Reimers, J.M.; Liu, S.; Powell, C.M. Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in Shank3 Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Res.* **2016**, *9*, 350–375. [CrossRef] [PubMed]
178. Santini, E.; Huynh, T.N.; MacAskill, A.F.; Carter, A.G.; Pierre, P.; Ruggero, D.; Kaphzan, H.; Klann, E. Exaggerated translation causes synaptic and behavioural aberrations associated with autism. *Nature* **2013**, *493*, 411–415. [CrossRef]
179. Zurek, A.A.; Kemp, S.W.P.; Aga, Z.; Walker, S.; Milenkovic, M.; Ramsey, A.J.; Sibille, E.; Scherer, S.W.; Orser, B.A. α5GABAA receptor deficiency causes autism-like behaviors. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2016**, *3*, 392–398. [CrossRef] [PubMed]
180. DeLorey, T.M. GABRB3 Gene Deficient Mice: A Potential Model of Autism Spectrum Disorder. *Int. Rev. Neurobiol.* **2005**, *71*, 359–382. [CrossRef]
181. Platt, R.J.; Zhou, Y.; Slaymaker, I.M.; Shetty, A.S.; Weisbach, N.R.; Kim, J.A.; Sharma, J.; Desai, M.; Sood, S.; Kempton, H.R.; et al. Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 335–350. [CrossRef]
182. Centonze, D.; Rossi, S.; Mercaldo, V.; Napoli, I.; Ciotti, M.T.; De Chiara, V.; Musella, A.; Prosperetti, C.; Calabresi, P.; Bernardi, G.; et al. Abnormal Striatal GABA Transmission in the Mouse Model for the Fragile X Syndrome. *Biol. Psychiatry* **2008**, *63*, 963–973. [CrossRef]
183. Aman, M.; Rettiganti, M.; Nagaraja, H.N.; Hollway, J.A.; Mccracken, J.; Mcdougle, C.J.; Tierney, E.; Scahill, L.; Arnold, L.E.; Hellings, J.; et al. Tolerability, Safety, and Benefits of Risperidone in Children and Adolescents with Autism: 21-Month Follow-up after 8-Week Placebo-Controlled Trial. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* **2015**, *25*, 482. [CrossRef]
184. Aman, M.G.; Kasper, W.; Manos, G.; Mathew, S.; Marcus, R.; Owen, R.; Mankoski, R. Line-item analysis of the Aberrant Behavior Checklist: Results from two studies of aripiprazole in the treatment of irritability associated with autistic disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* **2010**, *20*, 415–422. [CrossRef]
185. Zürcher, N.R.; Walsh, E.C.; Phillips, R.D.; Cernasov, P.M.; Tseng, C.E.J.; Dharanikota, A.; Smith, E.; Li, Z.; Kinard, J.L.; Bizzell, J.C.; et al. A simultaneous [11C]raclopride positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging investigation of striatal dopamine binding in autism. *Transl. Psychiatry* **2021**, *11*, 33. [CrossRef] [PubMed]
186. Kosillo, P.; Bateup, H.S. Dopaminergic Dysregulation in Syndromic Autism Spectrum Disorders: Insights from Genetic Mouse Models. *Front. Neural Circuits* **2021**, *15*. [CrossRef] [PubMed]

187. Shonesy, B.C.; Parrish, W.P.; Haddad, H.K.; Stephenson, J.R.; Báldi, R.; Bluett, R.J.; Marks, C.R.; Centanni, S.W.; Folkes, O.M.; Spiess, K.; et al. Role of Striatal Direct Pathway 2-Arachidonoylglycerol Signaling in Sociability and Repetitive Behavior. *Biol. Psychiatry* **2018**, *84*, 304–315. [CrossRef] [PubMed]
188. Lee, Y.; Han, P.-L. Early-Life Stress in D2 Heterozygous Mice Promotes Autistic-like Behaviors through the Downregulation of the BDNF-TrkB Pathway in the Dorsal Striatum. *Exp. Neurobiol.* **2019**, *28*, 337–351. [CrossRef] [PubMed]
189. Morel, L.; Higashimori, H.; Tolman, M.; Yang, Y. VGluT1+ Neuronal Glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 10950–10962. [CrossRef] [PubMed]
190. Kim, H.; Lee, Y.; Park, J.Y.; Kim, J.E.; Kim, T.K.; Choi, J.; Lee, J.E.; Lee, E.H.; Kim, D.; Kim, K.S.; et al. Loss of Adenylyl Cyclase Type-5 in the Dorsal Striatum Produces Autistic-Like Behaviors. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 7994–8008. [CrossRef]
191. Herbert, M.R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **2010**, *23*, 103–110. [CrossRef]
192. Perera, F.; Herbstman, J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod. Toxicol.* **2011**, *31*, 363–373. [CrossRef]
193. Wu, X.; Zhang, Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 517–534. [CrossRef]
194. Jiang, Y.; Tsai, T.F.; Bressler, J.; Beaudet, A.L. Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1998**, *8*, 334–342. [CrossRef]
195. Deaton, A.M.; Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1010–1022. [CrossRef] [PubMed]
196. Tremblay, M.W.; Jiang, Y. DNA Methylation and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. *Annu. Rev. Med.* **2019**, *70*, 151–166. [CrossRef] [PubMed]
197. Lister, R.; Mukamel, E.A.; Nery, J.R.; Urich, M.; Puddifoot, C.A.; Johnson, N.D.; Lucero, J.; Huang, Y.; Dwork, A.J.; Matthew, D.; et al. Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science* **2013**, *341*, 1–21. [CrossRef]
198. Nardone, S.; Sharan Sams, D.; Reuveni, E.; Getselter, D.; Oron, O.; Karpuj, M.; Elliott, E. DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e433. [CrossRef] [PubMed]
199. Nardone, S.; Sams, D.S.; Zito, A.; Reuveni, E.; Elliott, E. Dysregulation of cortical neuron DNA methylation profile in autism spectrum disorder. *Cereb. Cortex* **2017**, *27*, 5739–5754. [CrossRef]
200. Sun, W.; Poschmann, J.; Cruz-Herrera del Rosario, R.; Parikshak, N.N.; Hajan, H.S.; Kumar, V.; Ramasamy, R.; Belgard, T.G.; Elanggovan, B.; Wong, C.C.Y.; et al. Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell* **2016**, *167*. [CrossRef] [PubMed]
201. Won, H.; de la Torre-Ubieta, L.; Stein, J.L.; Parikshak, N.N.; Huang, J.; Opland, C.K.; Gandal, M.J.; Sutton, G.J.; Hormozdiari, F.; Lu, D.; et al. Chromosome conformation elucidates regulatory relationships in developing human brain. *Nature* **2016**, *538*. [CrossRef]
202. Steullet, P.; Cabungcal, J.H.; Monin, A.; Dwir, D.; O'Donnell, P.; Cuenod, M.; Do, K.Q. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A "central hub" in schizophrenia pathophysiology? *Schizophr. Res.* **2016**, *176*, 41–51. [CrossRef]
203. Richetto, J.; Massart, R.; Weber-Stadlbauer, U.; Szyf, M.; Riva, M.A.; Meyer, U. Genome-wide DNA Methylation Changes in a Mouse Model of Infection-Mediated Neurodevelopmental Disorders. *Biol. Psychiatry* **2017**, *81*, 265–276. [CrossRef]
204. Basil, P.; Li, Q.; Dempster, E.L.; Mill, J.; Sham, P.C.; Wong, C.C.Y.; McAlonan, G.M. Prenatal maternal immune activation causes epigenetic differences in adolescent mouse brain. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*. [CrossRef]
205. Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Brain–gut–microbiota axis—Mood, metabolism and behaviour. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 69–70. [CrossRef] [PubMed]
206. Sabit, H.; Tombuloglu, H.; Rehman, S.; Almandil, N.B.; Cevik, E.; Abdel-Ghany, S.; Rashwan, S.; Abasiyanik, M.F.; Yee Waye, M.M. Gut microbiota metabolites in autistic children: An epigenetic perspective. *Heliyon* **2021**, *7*, e06105. [CrossRef] [PubMed]

# CHAPITRE 3 : Les acides gras polyinsaturés

## I. Généralités sur les AGPI

### A. Définition

Les AG sont des acides carboxyliques aliphatiques composés d'une chaîne linéaire carbonée hydrophobe de 4 à 36 carbones, d'un groupement méthyle et d'un groupement carboxyle. Les AG peuvent être catégorisés selon leur degré d'insaturation en (i) acides gras saturés (AGS) avec des liaisons simples entre deux atomes de carbone (C-C), (ii) acides gras monoinsaturés (AGMI) avec une seule double liaison (C=C) ou bien (iii) en acides gras polyinsaturés (AGPI) avec au moins deux doubles liaisons systématiquement séparées par trois atomes de carbone (Guesnet et al. 2005) (Figure 18). Les différents types d'AG peuvent également être classés selon la longueur de leur chaîne carbonée ainsi que le nombre, la position et la structure spatiale (*cis*, *trans*) de leurs doubles liaisons. Ils sont notés x : y n-z, où x correspond au nombre de carbones, y au nombre de doubles liaisons et z à la position de la première double liaison après le groupement méthyle terminal. Il existe plusieurs types d'AG insaturés basés sur cette dénomination, notés n-9, n-7, n-6 et n-3. Par exemple, les AGPI de type oméga 3 (n-3) ont leur première double-liaison sur le troisième carbone après le groupement méthyle terminal (van Elst et al. 2014).

Il existe deux familles principales d'AGPI : (i) les omégas 6 (w6 ou AGPI n-6) incluant l'acide linoléique (LA), l'acide arachidonique (AA) et l'acide docosapentaénoïque (DPA n-6) et (ii) les omégas 3 (w3 ou AGPI n-3) incluant l'acide α-linolénique (ALA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosapentaénoïque (DPA n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Figures 18 et 19 ; Tableau III).

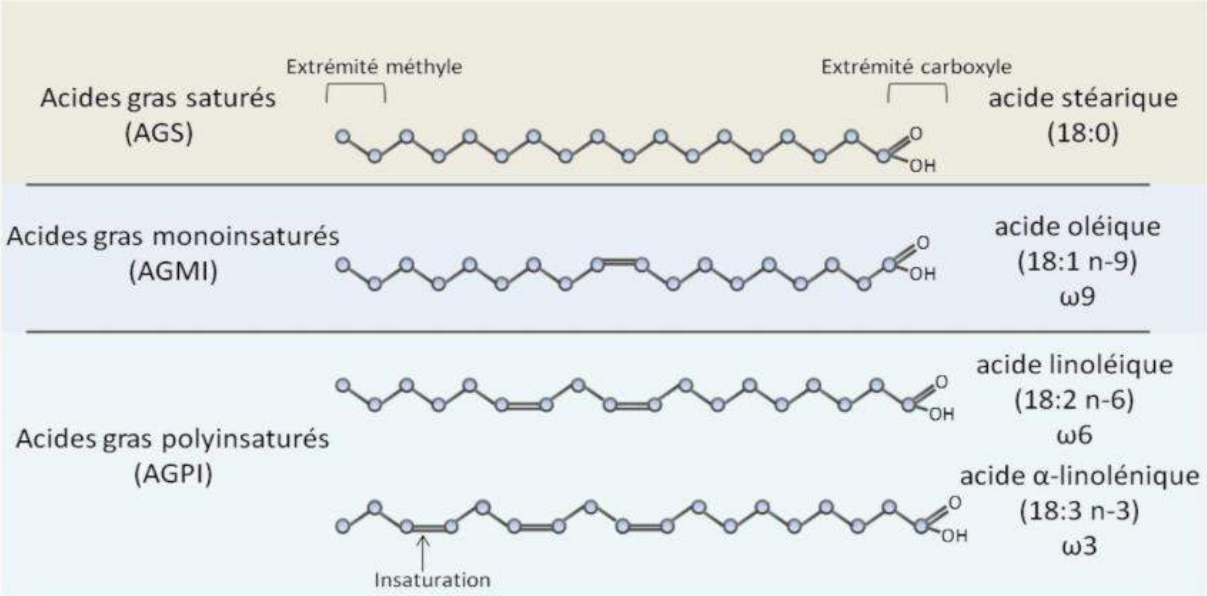



***Figure 19 : Structure, nomenclature et exemples des différentes catégories d'acides gras***
*Les acides gras saturés (AGS) avec l'acide stéarique, les acides gras monoinsaturés (AGMI) avec l'acide oléique et les acides gras polyinsaturés (AGPI) avec l'acide linoléique et l'acide α-linolénique. Adapté de Guesnet et al. 2005*

***Tableau III : Classification des principaux AGPI n-6 et n-3***

| Famille | Nom | Nombre d'atomes de carbone | Nombre de double liaison | Symbole |
|---|---|---|---|---|
| AGPI n-6 | Linoléique (LA) | 18 | 2 | 18:2 n-6 |
| | Arachidonique (AA) | 20 | 4 | 20:4 n-6 |
| AGPI n-3 | α-linoléique (ALA) | 18 | 3 | 18:3 n-3 |
| | Eicosapentaénoïque (EPA) | 20 | 5 | 20:5 n-3 |
| | Docosahexaénoïque (DHA) | 22 | 6 | 22:6 n-3 |

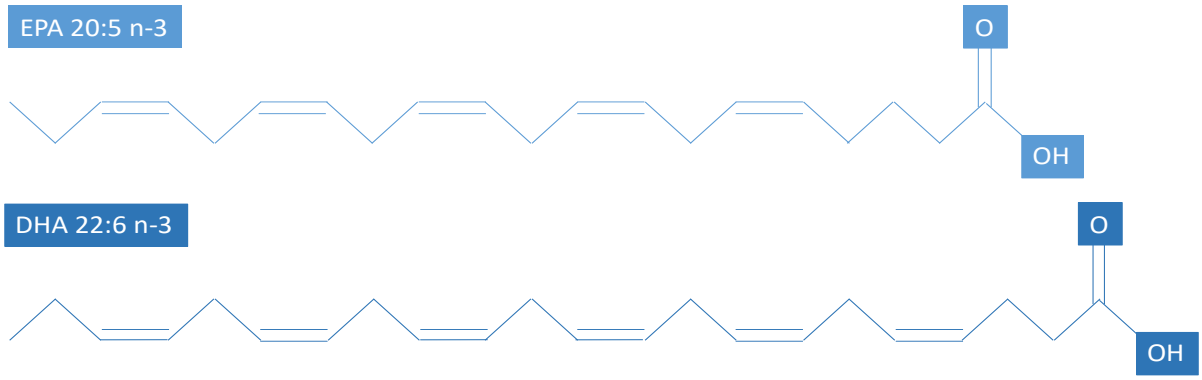



***Figure 20 : Structure des AGPI à longue chaîne : acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA)***

### B. Sources alimentaires et métabolisme des AGPI

Les AGPI sont d'origine animale et végétale. Les AGPI essentiels, comme l'ALA (18 :3 n-3) et le LA (18 :2 n-6) proviennent d'huiles végétales, et ne peuvent pas être synthétisés par le métabolisme des mammifères. En effet, les mammifères ne possèdent pas certaines enzymes désaturases, Δ12 et Δ15, responsables de l'insertion de doubles liaisons *cis* aux positions n-3 et n-6 (Wallis et al. 2002). Les précurseurs ALA et LA peuvent ensuite être allongés et désaturés en AGPI à longue chaîne (AGPI-LC) comme le DHA (22 :6 n-3), l'EPA (20 :5 n-3) et l'AA (20 :4 n-6) grâce à des Δ 9-, Δ6- et Δ5-désaturases et des élongases 2, 4 et 5 (Figure 20), présentes de façon très majoritaire dans le foie par rapport aux autres tissus, dont le cerveau (Cho et al. 1999; Rapoport et al. 2007; Wang et al. 2005b). De façon intéressante, ces désaturases et élongases sont communes aux AG n-3 et n-6, ce qui entraîne une compétition entre ces AG pour ces enzymes (Green et al. 2010). De fait, ALA (n-3) et LA (n-6) sont en compétition pour les mêmes enzymes dans la voie de synthèse des AGPI n-3 et n-6, respectivement.

La synthèse d'AGPI-LC n'est pas suffisante pour combler les besoins énergétiques de l'organisme. D'après l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), chez l'Homme, la conversion d'ALA en EPA et DHA est très faible, inférieure à 1% pour ce dernier (ANSES 2011). La quasi-totalité des AGPI-LC retrouvés dans le corps humain est donc issue de l'alimentation, majoritairement dans la viande, les abats et les œufs. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'activité *in vitro* des désaturases chez le rat est dix fois plus importante que chez l'Homme, ce qui suppose une plus grande conversion des AGCC en AGPI-LC (Descomps 2003).

Le DPA et le DHA ont une place particulière dans cette chaîne métabolique puisque leur conversion est réalisée dans les peroxysomes à la suite d'une β-oxydation partielle de leurs

précurseurs respectifs à 24 carbones. De façon intéressante, le DHA peut notamment être reconverti en EPA dans les peroxysomes (Grønn et al. 1991).

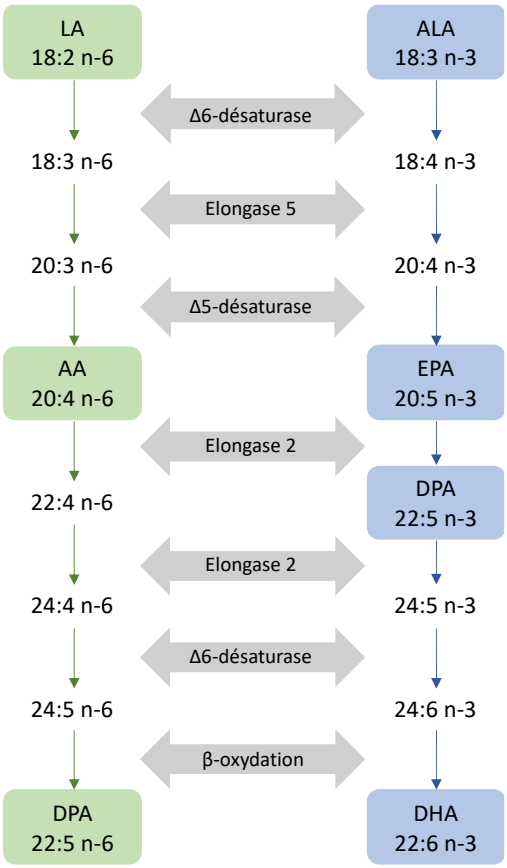



*Figure 21 : Synthèse des AGPI n-3 et n-6*

### C. Apports nutritionnels conseillés et études épidémiologiques de consommation

L'ANSES a actualisé en 2011 ses recommandations sur les apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les AG en France préalablement établis en 2001 (ANSES 2011). Il a été montré qu'un apport lipidique inférieur à 30% de l'apport énergétique (AE) conduit à des apports insuffisants en AGPI, et notamment en DHA, dans le contexte alimentaire occidental. Une valeur de 35-40% de l'AE en AG totaux constitue donc un besoin physiologique minimal recommandé pour un AE de 2000 kcal/jour chez l'adulte. Il est aussi recommandé d'équilibrer ses apports en LA et ALA avec un rapport LA/ALA de 4 et d'apporter au minimum 500 mg/j d'EPA+DHA pour un ratio n-3/n-6 de 1/4 dans ces mêmes conditions (Tableau IV).

***Tableau IV : Apports nutritionnels conseillés en acides gras définis en 2011***
*On remarque que les besoins en AGPI-LC n-3 comme DHA et EPA sont augmentés chez l'adulte comparés aux autres types d'AG qui restent inchangés avec l'âge.*
*Adapté des ANC 2011, ANSES*

| ANC 2011 en mg ou % de l'AESA | Enfants<br>De 3 à 9 ans | Adolescents et adultes<br>A partir de 10 ans |
|---|---|---|
| **Lipides totaux** | 35 à 40% | 35 à 40% |
| **Acides laurique+myristique+palmitique** | ≤ 8% | ≤ 8% |
| **Acide oléique** | 15 à 20% | 15 à 20% |
| **LA** | 4% | 4% |
| **ALA** | 1% | 1% |
| ***Ratio LA/ALA*** | < 5 | < 5 |
| **DHA** | 125 mg | 250 mg |
| **EPA+DHA** | 250 mg | 500 mg |
| ***Ratio n-6/n-3*** | 4 | 4 |

En 2015, l'ANSES a produit un avis concernant ces ANC en les mettant en perspective avec les résultats de l'étude individuelle nationale de consommation alimentaire (INCA 2) (2006-2007). Cet avis permet donc de compléter les recommandations en apport d'AG tout en décrivant la situation d'un pays occidental, la France, au regard de ces ANC. Cette étude met en lumière les différences de consommation en AG en fonction du sexe, de l'âge et des niveaux de contribution énergétique des lipides. Seulement 41% des enfants (3-17 ans) et 36% des adultes (18-79 ans) sont dans la fourchette recommandée des ANC. Néanmoins, leurs apports moyens en lipides totaux sont estimés à 37% de l'AE chez les enfants et 38% de l'AE chez les adultes, ce qui se situe dans la fourchette des 35-40% recommandés de l'AE des ANC en lipides totaux.

Concernant le ratio LA/ALA, il est supérieur au niveau recommandé de 4 chez 99% des enfants et 97% des adultes. Ce ratio a tendance à rester élevé chez les seniors, mais est statistiquement inférieur à celui des jeunes. En effet, 99 % des enfants (3-17 ans) et des adultes sont exposés à un risque d'insuffisance en ALA, ce qui explique ce ratio déséquilibré en faveur

des AGPI n-6 plutôt que des AGPI n-3. De plus, la consommation journalière en EPA et DHA est estimée à 286mg, contrairement aux 500mg recommandés par les ANC.

### D. Mécanismes de transport des AGPI vers le cerveau

Une fois ingérés, les lipides sont hydrolysés en AG libres non estérifiés (Figure 21). Ceux-ci sont ensuite absorbés au niveau de la paroi intestinale par diffusion passive et par le biais de protéines de transport (FATP). Ils sont ensuite transportés dans le cytoplasme des entérocytes par le biais de FABP pour être de nouveau estérifiés afin de former des triglycérides, des phospholipides (PL) et des esters de cholestérol au niveau du réticulum endoplasmique. Une fois absorbés, les lipides sont couplés à des lipoprotéines plasmatiques de faible ou très faible densité (LDL ou VLDL) et les AG libres sont liés à l'albumine afin d'être amenés directement au cerveau ou au foie via la circulation sanguine.

Leur absorption hépatique sous forme de chylomicrons est réalisée par le biais de FATP ou bien de FAT/CD36 (Nguyen et al. 2008). Chaque transporteur possède des affinités spécifiques et il est notamment connu que CD36 par exemple, transporte sélectivement les AGPI n-6 tels que LA et AA tandis que FATP a une affinité pour les AGPI n-3 tels que ALA et DHA (Guo et al. 2013; Melton et al. 2011). Une fois dans les hépatocytes, les AGPI non estérifiés vont être liés à des FABP et à l'*acyl-coenzyme A binding protein* pour interagir avec au niveau du noyau avec des facteurs de transcription tels que les *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR), HFN4, le récepteur X des rétinoïdes (RXR) ou encore les récepteurs hépatiques X (LXR) (Jump et al. 2013). L'interaction des AG avec ces différents facteurs de transcription donne lieu à des modifications d'expression d'une grande variété de gènes liés au métabolisme, à la β-oxydation, à la lipolyse, à la lipogenèse et au transport des AGs dans le foie. L'expression nucléaire d'autres facteurs de transcription tels que le *sterol regulatory element binding protein-1* (SREBP-1), le *carbohydrate regulatory rlement-rinding*

*protein* (ChREBP), le *max-like factor X* (MLX) et le facteur nucléaire kappa B (NF-κB) peut également être diminuée par des actions directes ou indirectes des AG (Jump et al. 2013). Ces facteurs de transcription sont liés au métabolisme des glucides et des lipides mais aussi à l'inflammation. Les AGPI sont ensuite ré-estérifiés pour être absorbés dans les cellules hépatiques, et peuvent ensuite repartir via la circulation sanguine, comme décrit précédemment, pour rejoindre le cerveau.

Au niveau des cellules endothéliales de la BHE, les AG à longue chaîne nécessitent l'utilisation de transporteurs comme CD36 ou MFSD2A, tandis que les lipoprotéines sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase pour être transportées via FABP ou bien par diffusion passive, comme c'est le cas pour les AGCC (Chen & Subbaiah 2013; Goldberg et al. 2009). En effet, des études *in vivo* chez le rongeur ont montré que des AGPI non estérifiés radioactifs injectés dans le plasma pouvaient passer la BHE par diffusion passive (DeGeorge et al. 1989; Nariai et al. 1991; Rapoport et al. 2001; Washizaki et al. 1994). De façon intéressante, la forme estérifiée des AGPI-LC n-3 reste la plus efficace pour le passage de la BHE, et notamment le DHA, dont 55% est associé avec la lysophosphophatidylcholine et transporté spécifiquement par MFSD2A (Lagarde et al. 2001; Nguyen et al. 2014).

Ces lipides vont pouvoir finalement entrer dans le cerveau par diffusion passive ou via FATP. Après leur arrivée dans le cerveau, ils doivent être transportés pour être utilisés dans les différents régions cérébrales. Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus concernant les mécanismes de ce transport intracérébral.

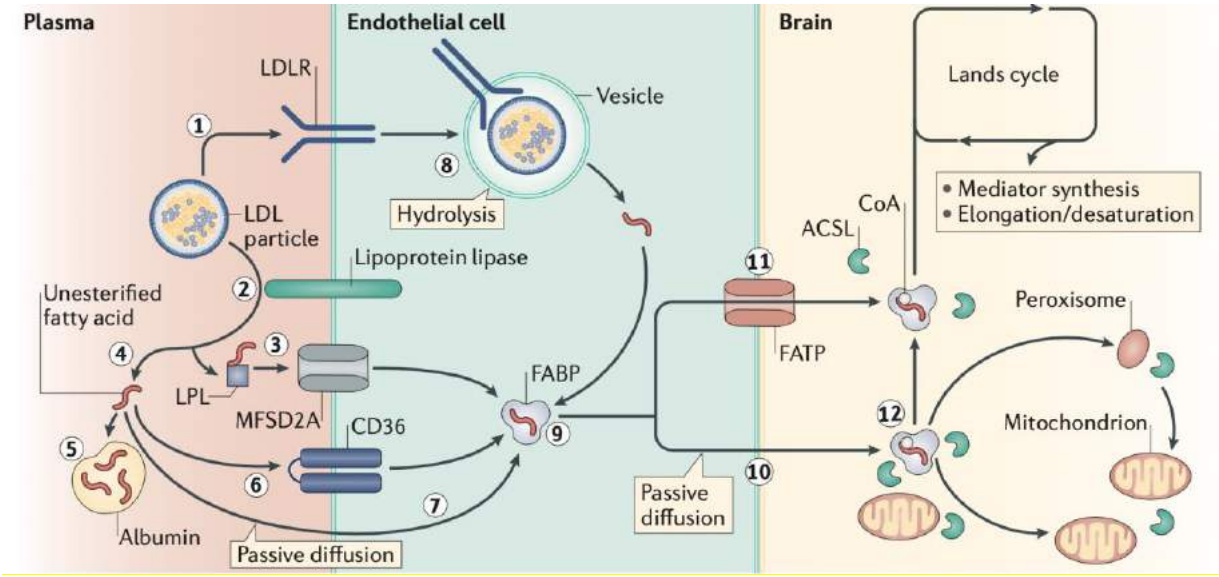



***Figure 22 : Mécanismes de transport des AGPI de la circulation sanguine vers le cerveau***
*Les AGPI provenant de la circulation sanguine peuvent passer la BHE sous plusieurs formes : sous forme estérifiée, c'est-à-dire comme lipoprotéines ou lysophospholipides (LPL) ou bien sous forme non estérifiée. Les lipoprotéines comme les low-density lipoproteins (LDL) peuvent interagir avec le récepteur à LDL (LDR) afin d'entrer dans les cellules endothéliales de la BHE* ***(1)****. Les lipoprotéines peuvent aussi être hydrolysées par la lipoprotéine lipase* ***(2)*** *et produire des LPL qui sont transportés dans les cellules endothéliales par le major facilitator superfamily domain-containing protein 2A (MFSD2A)* ***(3)****, ou bien des acides gras non estérifiés* ***(4)****. Les acides gras non estérifiés peuvent être couplés à l'albumine* ***(5)*** *et être transportés dans les cellules endothéliales via des transporteurs comme CD36* ***(6)****, ou bien via diffusion passive* ***(7)****. Au sein des cellules endothéliales de la BHER, les lipoprotéines peuvent être hydrolysées en acides gras polyinsaturés (AGPI)* ***(8)*** *pour ensuite être associés avec des FABP* ***(9)*** *et entrer dans le cerveau par diffusion passive* ***(10)*** *ou par le biais des FATP* ***(11)****. Les AGPI peuvent ensuite être utilisés pour le métabolisme cérébral* ***(12)****.*
*D'après Bazinet & Layé 2014*

# II. AGPI et cerveau

## A. <u>Composition lipidique du cerveau</u>

Les lipides sont au centre du métabolisme et représentent environ un tiers des apports énergétiques journaliers. Ils représentent entre 50 et 60% du poids sec du cerveau d'un mammifère adulte et y sont présents sous différentes formes. On y retrouve les glycolipides (40%), le cholestérol et le cholestérol ester (10%), de rares triglycérides mais surtout majoritairement des phospholipides (50%) (Sastry 1985). Une étude récente a confirmé, contrairement à ce qui est communément cité, que les AGPI estérifiés sous forme de PL ne représentent que la moitié des lipides totaux dans le cerveau humain ou 60% chez le rongeur

(Choi et al. 2018). En effet, ce serait dans d'autres tissus que les PL constitueraient 90% des lipides, notamment dans le foie, le cœur et les reins des rongeurs (Choi et al. 2018). Les 3 classes majoritaires de PL dans lesquelles sont incorporés des AGPI sont les phosphatidylcholines (PCh, 42-44% des PL totaux), les phosphatidyléthanolamines (PE, 36-40% des PL totaux) et les phosphatidylsérines (PS, 11-13% des PL totaux) (Sastry 1985). Il existe d'autres classes minoritaires comme les phosphatidylinositols (PI, 2-3% des PL totaux) ou les sphingomyélines (SM, 5-6% des PL totaux) (Sastry 1985). Ce sont les PE et les PS qui sont les plus enrichis en AGPI-LC n-3 comme le DHA et le DPA n-3, tandis que l'AA est incorporé majoritairement par les PC et les PI, et l'EPA préférentiellement par les PI (Bazinet & Layé 2014; Chen et al. 2009; Garcia et al. 1998). De façon générale, 25 à 30% des phospholipides sont constitués d'AGPI-LC (Sastry 1985).

De façon intéressante, près de 75% des lipides retrouvés chez les mammifères présentent des profils de concentration spécifiques au cerveau (Bozek et al. 2015). Ces lipides cérébraux peuvent être enrichis ou réduits, et de façon intéressante, leurs niveaux de concentration sont corrélés aux niveaux d'expression des enzymes correspondantes. Par exemple, les diacylglycerophosphocholines voient leur concentration cérébrale réduite, tandis que les enzymes liées à cette famille de lipides, le membre 6 de la famille des phospholipases (PLD6) et le *3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 1* (BDH1), présentent des niveaux d'expression cérébrale plus importants chez l'Homme comparé à d'autres espèces (Bozek et al. 2015). Ces enzymes sont liées à la biosynthèse et au couplage des lipides. Les fonctions cérébrales sont donc largement dépendantes du lipidome cérébral, plutôt conservé entre les espèces mais de plus en plus complexe dans l'évolution avec une plus grande variété et spécificité (Bozek et al. 2015; Crawford et al. 1999). En effet, chez les primates, les niveaux de lipides cérébraux enrichis tendent à évoluer quatre fois plus vite que dans les autres tissus mais cela varie également selon la région cérébrale étudiée. Il existe trois fois plus de changements

d'enrichissement de lipides corticaux chez l'Homme par rapport au chimpanzé, tandis qu'aucune différence n'a été mise en évidence dans le cervelet (Bozek et al. 2015). Cela a entraîné des changements anatomiques au niveau du cortex mais également au niveau moléculaire, notamment par l'apparition d'enzymes spécifiques aux lipides enrichis dans cette région (Bozek et al. 2015). Une étude a par ailleurs montré que la découverte des produits de la mer, enrichis en AGPI-LC n-3, et leur incorporation dans l'alimentation humaine coïncide avec le développement rapide du cortex, caractéristique unique de l'Homme et de ses comportements (Broadhurst et al. 2002).

Malgré quelques différences détaillées plus haut, l'Homme et le rongeur possèdent des profils lipidiques assez similaires pour permettre l'utilisation de rongeurs comme modèles dans des pathologies où le métabolisme des lipides est impacté, comme c'est le cas dans les maladies neurodégénératives ou des lésions cérébrales ischémiques (Chan et al. 2012; Jain et al. 2014).

L'AGPI le plus représenté dans le cerveau humain et celui du rongeur reste le DHA, qui représente plus de 10% des AGPI dans les structures cérébrales (Joffre et al. 2016). L'AA est également fortement présent, puisque le ratio DHA/AA est de 3 pour 2 (Sastry 1985). Néanmoins, les autres AGPI-LC comme le DPA n-3, le DPA n-6 et l'EPA sont présents en très faible quantité dans le cerveau. Les niveaux bas d'EPA seraient maintenus par des mécanismes de β-oxydation, de baisse d'incorporation, d'élongation en DPA n-3 ainsi qu'un taux diminué de recyclage de phospholipides (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2013). Ces AGPI-LC proviennent quasi exclusivement de la circulation sanguine, ce qui explique la faible proportion cérébrale de précurseurs des AGPI-LC n-3 et n-6, ALA et LA respectivement (Qi et al. 2002; Sastry 1985).

## B. Distribution régionale et cellulaire des AGPI dans le cerveau

La distribution cérébrale des AGPI varie d'une région à l'autre, en lien avec un métabolisme cérébral hétérogène entre les régions. Par exemple, les AGPI-LC n-3 et n-6, tels que le DHA et l'AA respectivement, sont présents en grandes quantités dans le cerveau et de manière décroissante dans le cortex préfrontal, l'hippocampe, le cervelet, le reste du cortex, l'hypothalamus et le tronc cérébral chez la souris adulte (Carrié et al. 2000; Joffre et al. 2016; Xiao et al. 2005) (Tableau V).

Le cortex préfrontal et l'hippocampe sont deux structures très sensibles aux changements en apports d'AGPI n-3. En effet, la concentration en AGPI n-3 de ces régions, notamment de DHA et d'EPA, est fortement réduite suite à 3 mois d'alimentation déficiente en AGPI n-3 chez la souris C57BL/6J. On retrouve par exemple une baisse des niveaux de DHA de 43% dans le cortex préfrontal et de 47% dans l'hippocampe (Joffre et al. 2016). Cette même alimentation a mis en évidence que l'hippocampe, région contenant peu d'AGPI n-3 par rapport aux régions cérébrales précédentes, était plus résistant à cette déficience, avec une baisse de 25% des niveaux de DHA. D'autres études chez la souris ont corrélé une déficience en AGPI n-3 dans l'hippocampe et le cortex préfrontal avec des troubles comportementaux comme des troubles de la mémoire spatiale et une augmentation de symptômes dépressifs, associés à une plasticité synaptique dégradée (Fedorova & Salem 2006; Lafourcade et al. 2011; Moranis et al. 2012; Xiao et al. 2005). De plus, un déséquilibre entre les taux cérébraux de DHA et AA cérébraux provoque également une altération des capacités cognitives et d'apprentissage (Joffre et al. 2014). Ces troubles de l'attention et de la mémoire semblent être liés à des modifications de la transmission synaptique monoaminergique et cholinergique (Chalon 2006).

***Tableau V : Composition en acides gras dans différentes régions cérébrales chez la souris C57BL6/J adulte***

*Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux AGPI totaux.*
*AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés, DMA : diméthylacétal, AA : acide arachidonique, DPA n-6 : acide docosapentaénoïque n-6, EPA : acide eicosapentaénoïque, DPA n-3 : acide docosapentaénoïque n-3, DHA : acide docosahexaénoïque.*
*Adapté de Joffre et al. 2016*

| Acides gras | Cortex préfrontal | Hippocampe | Cervelet | Cortex | Hypothalamus | Tronc cérébral |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **AGS** | 45,0 (+0,56) | 45,7 (+0,31) | 40,0 (+0,64) | 42,2 (+0,84) | 46,0 (+1,24) | 36,4 (+0,43) |
| **AGMI** | 19,2 (+0,72) | 18,8 (+0,19) | 27,9 (+0,23) | 24,0 (+1,03) | 22,9 (+0,72) | 33,3 (+0,83) |
| **AGPI** | 27,9 (+1,17) | 27,6 (+0,60) | 21,7 (+0,69) | 23,3 (+0,75) | 22,9 (+1,27) | 17,8 (+0,77) |
| **DMA** | 7,9 (+0,50) | 7,9 (+0,60) | 10,3 (+0,15) | 10,3 (+0,41) | 8,2 (+0,55) | 17,8 (+0,77) |
| **AA** | 9,7 (+0,12) | 10,2 (+0,57) | 6,5 (+0,09) | 7,7 (+0,29) | 8,5 (+0,27) | 5,5 (+0,18) |
| **DPA n-6** | 0,7 (+0,14) | 0,6 (+0,15) | 0,3 (+0,04) | 0,5 (+0,11) | 0,5 (+0,08) | 0,2 (+0,05) |
| **EPA** | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | – |
| **DPA n-3** | 0,1 (+0,06) | 0,1 (+0,03) | 0,1 (+0,01) | 0,1 (+0,01) | 0,1 (+0,01) | 0,1 (+0,01) |
| **DHA** | 14,3 (+1,13) | 13,7 (+0,30) | 12,2 (+0,58) | 11,9 (+0,46) | 10,1 (+0,94) | 8,2 (+0,66) |
| ***Ratio AA/DHA*** | *0,68 (+0,06)* | *0,75 (+0,06)* | *0,54 (+0,02)* | *0,65 (+0,01)* | *0,85 (+0,06)* | *0,67 (+0,04)* |
| ***Ratio n-6/n-3*** | *0,89 (+0,06)* | *0,98 (+0,07)* | *0,69 (+0,03)* | *0,88 (+0,02)* | *1,19 (+0,09)* | *0,93 (+0,05)* |

Ces concentrations d'AGPI différentes peuvent être expliquées par les spécificités cellulaires et structurales de chaque région cérébrale (Bourre et al. 1984) (Tableaux V et VI). De plus, la composition en AG des régimes alimentaires peut également être un facteur de variation des teneurs cérébrales en AGPI. En effet, le taux de renouvellement des AGPI-LC comme le DHA peuvent être différents selon la structure cérébrale. Par exemple, il semblerait que l'hypothalamus ait un taux de renouvellement de DHA plus faible que celui de l'hippocampe ou du cortex préfrontal. De plus, plusieurs mécanismes permettant le passage des AG dans le cerveau ont été étudiés et proposés, mais il n'existe pas aujourd'hui de consensus sur leur probabilité d'évènement ou leur spécificité en fonction des structures cérébrales (Joffre et al. 2016; Liu et al. 2015). Enfin, le genre et l'âge sont susceptibles d'accentuer ces différences

structurelles. En effet, une étude longitudinale a montré qu'une alimentation enrichie en AGPI n-3 administrée à des femelles C57BL/6J deux semaines avant l'étape de reproduction et jusqu'à 16 semaines après le sevrage chez la descendance, voyait ses effets potentialisés avec l'âge (Feltham et al. 2019). La concentration en DHA et en AGMI du cervelet et du tronc cérébral, ainsi que l'expression de facteurs liés à la myélinisation, est augmentée avec l'âge. De plus, les femelles semblent être plus sensibles aux effets de l'alimentation, avec des changements de composition cérébelleuse en acides gras plus prononcés, comparé au tronc cérébral (Feltham et al. 2019).

***Tableau VI : Composition membranaire en AGPI de différents types cellulaires chez des souris âgées de 2 mois soumises à un régime enrichi en huile de soja***
*Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.*
*LA : acide linoléique, AA : acide arachidonique, DHA : acide docosahexaénoïque.*
*Adapté de Bourre et al. 1984*

| AGPI | Neurones | Oligodendrocytes | Astrocytes |
|---|---|---|---|
| **LA** | 6,9 | 2,7 | 1,2 |
| **AA** | 10,3 | 9,3 | 10,3 |
| **DHA** | 8,3 | 5,1 | 12,1 |
| ***Ratio n-3/n-6*** | *0,5* | *0,33* | *0,76* |

Le DHA et l'AA retrouvés dans le cerveau proviennent majoritairement du stock plasmatique (Spector 2001) mais peuvent également, dans une moindre mesure être synthétisés par des cellules gliales telles que les astrocytes mais aussi par les cellules endothéliales (Moore et al. 1990, 1991). Ces AGPI-LC sont incorporés aux membranes des cellules du SNC, qu'elles soient de type neuronal ou bien de type glial englobant les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (Tableau VI).

Ces différences de composition en AGPI selon la structure peuvent entrainer des conséquences sur les processus inflammatoires étant donné que les AGPI sont précurseurs de métabolites lipidiques bioactifs impliqués dans l'inflammation.

### C. Temporalité de l'incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales

L'incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales est plus ou moins importante selon l'âge. En effet, elle s'effectue de façon accrue lors de la période périnatale, c'est-à-dire du dernier trimestre de grossesse jusqu'à l'âge de 18 mois environ (Clandinin et al. 1992; Lauritzen 2001) et de façon similaire chez le rongeur, préférentiellement entre E14 et E17 puis pendant la période d'allaitement (Green & Yavin 1996). Il a par ailleurs été montré dans des études cliniques que la consommation hebdomadaire de poissons pendant la grossesse augmentait les scores développementaux des enfants (Daniels et al. 2004; pour revue, Starling et al. 2015).

Des supplémentations en DHA et EPA pendant la grossesse et l'allaitement à des taux bien supérieurs à ceux recommandés par les ANC donnent lieu à des scores de quotient intellectuel (QI) plus importants chez des enfants de 4 ans comparés à des enfants avec une alimentation basée sur l'huile de maïs depuis la grossesse (Helland et al. 2003), mais également à des améliorations cognitives, sociales et des symptômes de TDAH (pour revue, Janssen & Kiliaan 2014). Néanmoins, les effets bénéfiques de ces AGPI dans les périodes prénatale et périnatale sur la cognition pourraient ne pas persister dans le temps. En effet, dans une étude sur des enfants prématurés nourris avec du lait contenant des AGPI-LC, des capacités cognitives plus importantes étaient retrouvées à 6 mois, mais plus à 9 mois ou à 12 mois (O′Connor et al. 2001). Néanmoins, ces enfants présentaient une amélioration de leur développement moteur à 12 mois.

Il manque à l'heure actuelle des études sur l'impact des AGPI-LC pendant la période neurodéveloppementale sur les capacités cognitives des enfants de plus de 2 ans ainsi qu'une posologie de supplémentation personnalisée en fonction de l'historique alimentaire et médical (Eilander et al. 2007; van der Wurff et al. 2020).

### D. Rôles des AGPI dans la signalisation cérébrale

Les AGPI influencent la fluidité des membranes cellulaires, ce qui modifie la fonctionnalité de récepteurs membranaires et leur recyclage (Pinot et al. 2014). En effet, au niveau des plaquettes mais aussi dans le cerveau, une proportion importante d'AGPI n-3 comme le DHA augmente la fluidité membranaire tandis que les AGPI n-6 comme l'AA la réduisent (20 :4 n-6) (Hashimoto et al. 2006; van Elst et al. 2014; Yang et al. 2011).

Il a été par ailleurs été montré que de grandes quantités membranaires de AA et DHA facilitent la synaptogénèse et la maturation des cônes de croissance (Martin & Bazan 1992). D'après Chalon et collaborateurs, les AGPI n-3 ont un rôle important dans la neurotransmission monoaminergique au niveau des synapses mais également dans d'autres voies de transduction comme les PKC (Chalon et al. 2001; Kim et al. 2004).

Par leur forte présence membranaire et leur implication dans les processus synaptiques, les AGPI n-6 et n-3 ont des fonctions diverses, notamment liées à la différentiation cellulaire, la myélinisation, l'homéostasie lipidique et le développement. Ces AGPI représentent des ligands endogènes aux PPAR. Ces récepteurs agissent comme des facteurs de transcription et sont fortement localisés dans l'hippocampe, impactant l'apprentissage et la mémoire. Il a notamment été montré qu'une déficience en AGPI-LC n-3 pendant la gestation, la lactation et après le sevrage a des conséquences négatives sur la maturation des oligodendrocytes et la myélinisation en général (Decoeur et al. 2022; Leyrolle et al. 2021). Cette baisse de myélinisation diminue la connectivité fonctionnelle entre l'hippocampe et le cortex préfrontal, ce qui est corrélé avec des comportements répétitifs et stéréotypés, une anhédonie et des déficits d'apprentissage (Leyrolle et al. 2021). Une alimentation déficiente en AGPI-LC n-3 pendant la gestation est également liée à une désorganisation de l'ultrastructure et à une baisse de la densité des cellules microgliales situées dans la substance blanche pendant le neurodéveloppement (Decoeur et al. 2022).

Les AGPI agissent donc sur les signaux cellulaires par le biais de ces PPAR mais également au niveau de la transmission synaptique.

### E. Les AGPI et les TSA

Plusieurs études ont montré une diminution des niveaux sanguins de DHA, de EPA et de AA chez les patients avec des TSA avec une augmentation du ratio des AGPI n-6/n-3 (Mazahery et al. 2017; Parletta et al. 2016; Vancassel et al. 2001) mais aussi dans les phospholipides membranaires des érythrocytes (Bell et al. 2004). Ces taux sanguins aberrants, notamment de DHA, ont également été corrélés avec des comportements autistiques (Parletta et al. 2016). Chez l'animal, une alimentation déficiente en AGPI n-3 et enrichie en AGPI n-6 (ratio n-6/n-3 de 53.1 pour 1) chez la souris gestante a donné lieu à une détérioration de certains symptômes de TSA tels qu'une augmentation de l'anxiété et une sociabilité réduite (Jones et al. 2013).

Plusieurs hypothèses sont à l'étude pour expliquer ces taux anormaux d'AGPI. L'une d'entre elles propose qu'un apport nutritionnel insuffisant en AGPI-LC ou en précurseurs n-3 et n-6 en soit à l'origine. De façon intéressante, de faibles taux de DHA et AA ont été retrouvés dans les préparations de lait maternel et ceci a été associé avec un risque plus important de développer des TSA chez les nourrissons, en comparaison avec des nourrissons nourris au sein (Schultz et al. 2006). Des taux importants de LA et ALA durant la grossesse permettent de baisser drastiquement le risque de développer des TSA. En effet, plus la supplémentation en AGPI est faible, plus le risque de développer des TSA augmente (Lyall et al. 2013). Une méta-analyse récente prenant en compte 33 articles avec des supplémentations en EPA et DHA pendant la grossesse et la lactation a d'ailleurs montré des effets bénéfiques de 6 à 11% sur le développement cognitif de l'enfant (Nevins et al. 2021).

Certaines études néanmoins vont à l'encontre de ces résultats et montrent des niveaux d'AGPI anormalement élevés, notamment d'ALA, de LA et de DHA, associés avec un ratio d'AGPI n-6/n-3 bas (Esparham et al. 2015; Sliwinski et al. 2006). Dans une étude où aucune différence dans les apports nutritionnels entre les enfants avec des TSA et les enfants neurotypiques n'a été trouvée, les niveaux sanguins de DHA et de EPA étaient augmentés et ceux de AA diminués (Yui et al. 2016). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse métabolique chez les patients avec des TSA. Ces derniers présentent des déficiences mitochondriales qui pourraient expliquer des difficultés de synthèse des AGPI (Clark-Taylor & Clark-Taylor 2004). Il a par ailleurs été montré que les femmes ont un taux de conversion métabolique de l'ALA en AGPI-LC n-3 qui est plus important que les hommes (Burdge & Wootton 2002), ce qui pourrait expliquer des différences de susceptibilité nutritionnelle entre les sexes.

D'autres résultats viennent consolider le lien entre AGPI et TSA, avec notamment l'existence de nombreux polymorphismes de gènes liés aux AGPI donnant lieu à la susceptibilité de développer des TSA comme FABP3, 5 et 7, la désaturase des acides gras (FADS) et l'élongase des acides gras (ELOVL) (Shimamoto et al. 2014; Sun et al. 2018). De façon intéressante, transposés dans des modèles animaux, les souris KO pour *Fabp3*, *5* ou *7* ne montrent pas le même phénotype. Tandis que les souris Fabp5 ne présentent aucun phénotype délétère, les souris Fabp3$^{-/-}$ disposent d'une mémoire spatiale et d'un comportement de recherche de la nouveauté réduites et les souris Fabp7$^{-/-}$ montrent de l'hyperactivité et un phénotype anxieux (Shimamoto et al. 2014).

Une autre hypothèse est celle d'une mauvaise capacité de conversion des précurseurs LA et ALA liée à une déficience des désaturases et élongases. Le gène de la delta-6 désaturase par exemple, se trouve sur le chromosome 11q22-23 lié à l'autisme (Hérault et al. 1994; Horrobin 1999). L'augmentation du catabolisme des AGPI serait également une piste à étudier. En effet,

l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) est augmentée chez les patients avec des TSA et le gène de la PLA2 (8q24) est situé sur le chromosome 8q22 à proximité de sites génétiques liés à l'autisme (Bell et al. 2004; Bolton et al. 1995). Enfin, la dernière possibilité serait une diminution de l'incorporation des AG dans les membranes des phospholipides.

Les patients avec des TSA présentent également des problèmes reliés à la substance blanche et à la connectivité cérébrale (Won et al. 2013) et la formation de connexions via la substance blanche est très sensible au ratio en AGPI n-6/n-3 (Durand et al. 2013). Une déficience en DHA donne lieu à une altération de l'activité GABAergique, qui n'est pas présente dans le cadre d'une supplémentation en DHA chez l'animal (Takeuchi et al. 2003). Une augmentation des niveaux d'AA augmente l'excitabilité neuronale par l'inhibition de la neurotransmission GABA-A par le biais de l'expression de PLA2 et de l'activation de la phospholipase C (Schwartz & Yu 1992). D'autres systèmes de neurotransmission sont également touchés par une déficience ou une supplémentation en AGPI n-3 et sont dépendants du temps d'exposition et de la structure cérébrale. En effet, le cervelet et le striatum semblent plus sensibles aux changements de niveaux d'AGPI comparé au cortex frontal, notamment dans le cas d'une supplémentation en ALA, le précurseur des AGPI-LC n-3 comme le DHA et l'EPA (Delion et al. 1994, 2002).

Associés à ce déséquilibre des AGPI n-6 et n-3, des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires et de NF-κB sont également retrouvés dans le sang des patients avec des TSA (Mazahery et al. 2017; Simopoulos 2002). Plusieurs études rapportent en effet qu'environ 60% des personnes avec des TSA présentent un dysfonctionnement immunitaire systémique associé à des allergies et à une inflammation générale (Pardo & Eberhart 2007). L'exposition à l'IFN-α, une cytokine pro-inflammatoire, a d'ailleurs pour effet d'augmenter le ratio AA/EPA+DHA plasmatique et l'expression de TNF-α mais aussi la colère et de l'irritabilité (Lotrich et al. 2013).

Les cytokines pro-inflammatoires comme les prostaglandines dérivées de l'AA et autres AGPI n-6, sont associés à un accouchement avant le terme tandis que les prostaglandines dérivées des AGPI n-3 ont l'effet inverse (Olsen et al. 1992). En lien, les personnes diagnostiquées avec des TSA sont souvent des enfants nés prématurément. En effet, une naissance prématurée a des effets délétères sur le développement cérébral et augmente le risque d'apparition de symptômes autistiques (Mahoney et al. 2013). Des taux anormaux d'AGPI n-6 et n-3 sont donc corrélés à des problèmes neurodéveloppementaux et une supplémentation d'AGPI n-3 pour restaurer cet équilibre serait donc une voie pertinente à explorer (Hagberg et al. 2012).

L'inflammation provoque des comorbidités importantes dans les TSA comme les problèmes GI évoqués dans ce manuscrit. Babinska et ses collaborateurs ont montré qu'environ 89% des enfants et adolescents autistes présentaient des GI, avec 97% de filles affectées au moins une fois par semaine contre 88% de garçons, traduisant une sensibilité liée au sexe. Ce phénomène est d'autant plus visible lorsque la fréquence de ces troubles est portée à plusieurs fois par semaine ou par jour (70% de filles contre 44% des garçons) (Babinska et al. 2020). De façon intéressante, les enfants autistes présentent une sélectivité alimentaire (69%) et des difficultés dans la prise des repas (64%) associées à des GI, ce qui restreint et perturbe leur consommation de certaines denrées alimentaires, pouvant causer des déficiences nutritionnelles (Babinska et al. 2020). La fréquence de ces troubles liés à l'alimentation a été corrélée significativement avec la sévérité des symptômes autistiques tandis que des interventions alimentaires, comme une supplémentation en AGPI n-3, n'ont pas été corrélés avec les différents troubles étudiés et le comportement des enfants et adolescents étudiés (Babinska et al. 2020; Ferguson et al. 2019). La piste des supplémentations en AGPI n-3 est pourtant à l'étude depuis plusieurs années. En effet, une méta-analyse récente a montré que les enfants

autistes consomment plus d'AGPI, mais moins d'AGPI n-3 spécifiquement (Esteban-Figuerola et al. 2019).

### F. Les AGPI et le microbiote

Il est désormais connu que le microbiote intestinal joue un rôle central dans le métabolisme des AGPI, et notamment sur l'enrichissement cérébral en AGPI, par l'axe intestin-cerveau (Madore et al. 2020). Dans le cadre de l'inflammation, la composition du microbiote intestinal est capitale, puisqu'un déséquilibre microbien entraîne une dysbiose qui peut être à l'origine de pathologies neurodéveloppementales ou neurodégénératives comme les TSA ou la maladie d'Alzheimer respectivement (Angelucci et al. 2019; Liu et al. 2019). Chez la souris gestante, des évènements stressants ou bien des modifications du régime alimentaire provoquent chez la descendance une dysbiose intestinale associée à des problèmes de sociabilité, qui est un des critères de diagnostic des TSA (Buffington et al. 2016; Vuong et al. 2020).

Des problèmes liés à l'alimentation chez des patients avec des TSA sont également présents, notamment par une sélectivité alimentaire et un comportement agressif à l'heure des repas (Babinska et al. 2020). De ces comportements peuvent découler des carences nutritionnelles importantes et contribuer à la dysbiose intestinale retrouvée chez ces patients.

Cette dysbiose a pour conséquence une augmentation de la perméabilité intestinale et de l'inflammation, résultant en des troubles GI, une des comorbidités associées aux TSA (Thomson et al. 2020). Cette inflammation se traduit par l'augmentation anormale de métabolites inflammatoires, notamment des AGCC comme le butyrate, le propionate et l'acétate, produits en grande quantité par les bactéries lors d'une dysbiose intestinale (Davoli-Ferreira et al. 2021). Les AGCC peuvent traverser la BHE, et sont notamment retrouvés à de fortes concentrations dans le LCR de patients diagnostiqués avec des TSA (Bojović et al. 2020;

Silva et al. 2020). Ces études indiquent un lien entre les lipides, les TSA et le microbiote intestinal.

Par le biais des neurones du nerf et leurs récepteurs aux AGCC, la composition du microbiote intestinal va directement influencer la neuroinflammation (Bonaz et al. 2018; Madore et al. 2020). Le microbiote intestinal peut également influencer de façon indirecte le nerf vague. En effet, les fibres afférentes du nerf vague innervent toutes les couches de la paroi intestinale et expriment des récepteurs à cytokines et chémokines (Bonaz et al. 2018). De ce fait, le nerf vague est sensible à une inflammation intestinale provoquée par une dysbiose. En effet, le nerf vague représente une voie de communication bilatérale entre le tractus intestinal et le SNC. La dysbiose intestinale pourrait donc avoir un effet pro-inflammatoire sur l'activité microgliale et résulter en une transmission synaptique cérébrale altérée ainsi que des comportements de type autistique, comme des difficultés d'interaction sociale (Davoli-Ferreira et al. 2021).

De façon intéressante, Buffington et ses collaborateurs ont montré qu'une alimentation riche en graisse chez la souris gestante résultait en une dysbiose du microbiote intestinal, une réduction des comportements sociaux mais aussi de la production d'ocytocine et de la plasticité synaptique dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) chez la descendance (Buffington et al. 2016). Cette étude a montré une restauration de la totalité de ces paramètres par l'ajout de la bactérie *Lactobacillus reuteri* dans l'eau de boisson. L'alimentation peut donc avoir des conséquences importantes sur les fonctions cognitives, qui pourraient être compensées voire restaurées par la présence de certaines souches de bactéries aux propriétés anti-inflammatoires.

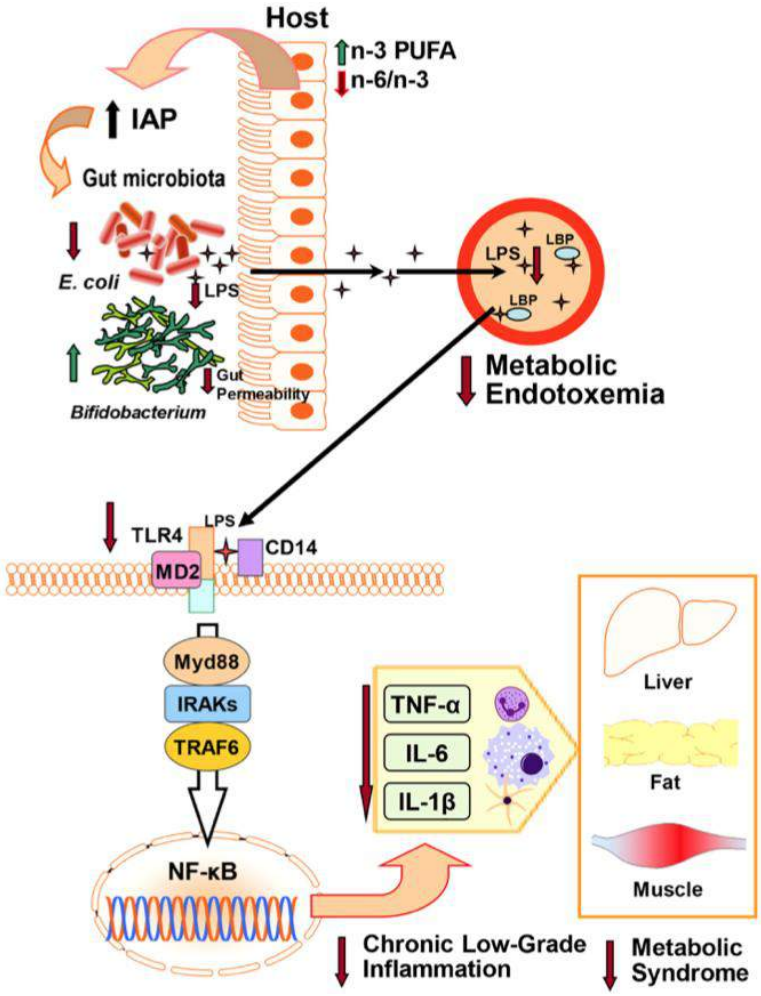



***Figure 23 : Mécanismes liés au déséquilibre en AGPI n-6/n-3 sur la paroi intestinale et l'inflammation***

*LPS : lipopolysaccharide; TLR4 : Toll Like Receptor 4; MD2 : Myeloid Differentiation factor 2; Myd88 : Myeloid Differentiation primary response 88; IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinases; TNF-α : Tumor necrosis factor alpha; TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6; IL-6 : interleukine-6; IL-1β : Interleukine-1-bêta; NF-κB : nuclear factor-kappa B.*

*D'après Kaliannan et al. 2015*

Il a par ailleurs été montré que les AGPI n-6 augmentent l'endotoxémie métabolique et provoquent une inflammation systémique et chronique de faible intensité contrairement aux AGPI n-3 qui réduisent les conditions endotoxémiques et inflammatoires (Kaliannan et al. 2015) (Figure 22). Les AGPI n-3 augmentent la production et la sécrétion de la phosphatase alcaline intestinale (PAI), une enzyme permettant la détoxication du LPS et l'homéostasie inflammatoire intestinale, par les entérocytes de l'épithélium intestinal, ce qui a pour conséquence de promouvoir un profil microbien intestinal anti-inflammatoire de type *Bifidobacterium* avec une proportion réduite de *Proteobacteria* (*Enterobactericaee, E.coli,*

*gamma et delta proteobacteria*) (Kaliannan et al. 2015). Ce changement de composition a pour effet de diminuer la production de LPS ainsi que la perméabilité intestinale. L'implication du microbiote intestinal dans ces processus inflammatoires semble assurée puisque les effets bénéfiques des AGPI n-3 peuvent être inversés par un traitement antibiotique ou la cohabitation d'animaux (Kaliannan et al. 2015). Il a d'ailleurs été démontré qu'une diète enrichie de 5% d'huile de maïs promeut la croissance des *Proteobacteria* (Kaliannan et al. 2015). Une alimentation riche en AGPI n-3 apparaît également bénéfique chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ou de sclérose en plaques (Kremer 2000; Weinstock-Guttman et al. 2005) mais également chez des rongeurs obèses atteints du diabète de type 2, puisqu'il a été montré que la proportion de bactéries productrices de LPS était très importante dans ce modèle (de La Serre et al. 2010; Liu et al. 2013).

# OBJECTIFS

Plusieurs travaux ont montré que la composition de l'alimentation pouvait influencer le comportement social et moteur dans les TSA. Les enfants atteints de TSA présentent des intérêts et comportements restreints, ce qui peut se traduire sous la forme d'une alimentation limitée, souvent riche en glucides et avec des apports déséquilibrés en AG. La nature et la composition de l'alimentation pourraient avoir des effets délétères sur les symptômes associés aux TSA, notamment par le biais de l'axe cerveau-intestin. Les TSA étant une pathologie neurodéveloppementale, des supplémentations alimentaires lors des périodes prénatale et postnatale sont désormais à l'étude.

Mon travail de thèse se base sur des études précliniques et cliniques qui ont montré l'importance des AGPI n-3 pendant le développement prénatal et postnatal. La majorité de ces études ont mis en exergue qu'un déficit en AGPI n-3 chez la femme enceinte et la souris gestante peut augmenter le risque de développer des TSA chez la descendance et qu'à l'inverse, une supplémentation de ces acides gras spécifiques peut, du moins partiellement, compenser certains symptômes caractéristiques des TSA. Néanmoins, ces travaux antérieurs présentent de nombreuses limites puisqu'ils sont souvent réalisés dans un contexte de déficits en AGPI n-3 et qu'ils ne distinguent pas clairement le potentiel des précurseurs AGPI n-3 et des AGPI-LC n-3 ou les conséquences d'un déséquilibre dans le ratio AGPI n-6/n-3.

L'objectif de cette thèse a donc été d'explorer les propriétés préventives des différents types d'AGPI n-3, précurseurs ou à longue chaîne, par le biais de deux alimentations sur le développement de symptômes de type autistique dans un modèle animal de toxicité environnementale au VPA. Le VPA est un agent pharmacologique GABAergique utilisé pour la régulation de l'humeur et contre les crises épileptiques. Il s'agit d'un modèle animal robuste et chez lequel les conséquences comportementales, cellulaires et biochimiques de l'exposition embryonnaire au VPA sur l'apparition de symptômes dans la sphère des TSA ont été très largement documentés.

Les souris femelles, dès leur gestation et jusqu'au sevrage de leur progéniture ont été soumises à deux alimentations équilibrées, partageant le même ratio de précurseurs n-6 et n-3 LA/ALA de 6. La première alimentation ne contient que des AGPI n-3 sous forme de ALA, qui nécessitent une métabolisation en longue chaîne comme le DHA et l'EPA pour être incorporés dans les membranes cérébrales tandis que la deuxième alimentation est enrichie en AGPI-LC n-3, *i.e.* en DHA et EPA. À partir du sevrage, la descendance est ensuite soumise à la même alimentation que leurs mères jusqu'à leur sacrifice en fin d'expérimentation.

Cette étude longitudinale s'est intéressée à identifier les différents effets de l'alimentation et du traitement sur la mère lors de la gestation mais aussi sur la progéniture présentant des symptômes de type autistique. Nous nous sommes intéressés à une région cérébrale fortement impliquée dans les TSA : le cervelet. Plusieurs approches ont permis d'établir d'une manière exhaustive les conséquences d'une telle alimentation différentielle à différents niveaux :

- Au niveau comportemental : le comportement maternel a été étudié ainsi que le développement, le comportement social et moteur chez la progéniture.
- Au niveau moléculaire : les profils d'acides gras dans le cervelet et le foie chez les mères et la descendance ainsi que les marqueurs d'inflammation dans le cervelet ont été analysés.
- Au niveau cellulaire : le nombre de cellules de PC a été quantifié dans le cervelet de la descendance, spécifiquement dans crus I et crus II, deux régions impliquées dans les fonctions cognitives et motrices.
- Au niveau de l'axe cerveau-intestin : les séquences liées au microbiote intestinal ont été étudiées, concernant la composition et la richesse bactérienne ainsi que leur abondance relative.

Dans leur ensemble nos résultats montrent qu'une alimentation équilibrée, correspondant aux besoins en AGPI n-3 et n-6, permet de contrer les effets du traitement au VPA et protège

contre des symptômes de type autistique. Une alimentation enrichie en AGPI-LC n-3 n'apporte que peu de bénéfices additionnels.

Ces travaux sont d'un intérêt particulier car ils démontrent pour la première fois qu'une alimentation équilibrée en AGPI n-3 et n-6 semble suffisante pour prévenir les risques de développement de TSA et que dans ces conditions, une supplémentation en AGPI-LC n-3 ne semble apporter que des bénéfices additionnels. Ces travaux orientent de fait vers une approche personnalisée qui devrait prendre compte de l'histoire nutritionnelle de la mère avant de proposer des potentielles supplémentations. Enfin, nos travaux indiquent également que l'homéostasie lipidique cérébrale est importante et nécessaire dans le cadre du neurodéveloppement.

En perspective, nos travaux ouvrent la voie vers une investigation plus poussée visant à déterminer la ou les périodes critiques durant lesquelles les deux alimentations étudiées permettent de protéger contre un phénotype autistique face à une agression environnementale.

# CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

Afin de réaliser ce projet de thèse longitudinal, nous avons utilisé une grande variété de matériels et méthodes. Nous avons eu recours à un modèle animal murin environnemental de TSA pour nous permettre d'étudier extensivement les aspects comportementaux, cellulaires, moléculaires et métaboliques de la physiopathologie en lien avec une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3.

Tout d'abord, nous avons fait le choix du modèle murin environnemental d'exposition *in utero* au VPA de TSA. Ce modèle a été extensivement caractérisé, notamment au sein de notre laboratoire, et présente une bonne validité de construction, apparente et prédictive (Al Sagheer et al. 2018; Mabunga et al. 2015; Nicolini & Fahnestock 2018). Pour cela, nous avons utilisé des souris femelles C57Bl/6J (Laboratoires Janvier, États-Unis) qui ont reçu du VPA (450mg/kg ; Sigma-Aldrich, P4543) par le biais d'une injection intrapéritonéale (i.p.) à E12.5 afin de générer une descendance aux symptômes autistiques (Al Sagheer et al. 2018).

Nous avons conçu avec l'aide de collaborateurs et de l'entreprise SAFE (SAFE, Augy, France), deux aliments isocaloriques aux différents niveaux et composition d'AGPI n-3 (LNA vs DHA/EPA) et un ratio LA/ALA équilibré de 6 pour répondre aux objectifs énoncés de cette thèse. Ces deux aliments ont été fournis aux souris femelles gestantes dès leur premier jour de gestation, tout au long de la lactation, puis directement à leur descendance après le sevrage, à la quatrième semaine post-natale (P28), jusqu'à leur sacrifice à l'âge adulte. L'aspect longitudinal est au centre de cette étude.

# I. Comportement animal

Nous avons commencé notre étude en explorant le comportement animal chez les mères et la descendance de façon longitudinale. Les mâles et les femelles des différentes portées ont été étudiés de façon séparée.

### A. Test de récupération des souriceaux (P9)

Ce test réalisé au P9, consiste à séparer la mère et sa portée pendant 5 minutes, puis de les remettre dans leur cage d'hébergement et d'enregistrer en vidéo du dessus le comportement maternel pendant 15 minutes. L'analyse a été réalisée sur Solomon Coder (András Péter, Keele, UK) et nous a permis de quantifier des paramètres dirigés et non dirigés vers la portée.

### B. Réflexe de redressement (P9, P11 et P13) et ouverture des yeux (de P12 à P16)

Le réflexe de redressement est réalisé à P9, P11 et P13 pour étudier l'évolution de ce réflexe qui consiste à placer le souriceau sur le dos et à quantifier le temps que prend le souriceau à se remettre sur ses quatre pattes. L'observation de l'ouverture des yeux est quant à elle réalisée tous les jours de P12 à P16, où l'on score l'animal selon le nombre d'yeux ouverts (0, 1 ou 2).

### C. Test des trois chambres (entre P45 et P60)

L'interaction sociale a été évaluée à l'aide du test des trois chambres. L'appareil est constitué d'un caisson en Plexiglas (60×45×22 cm) cloisonné en trois chambres avec des portes escamotables. Une habituation de 5 minutes dans la chambre du milieu est réalisée avec les portes fermées. La première phase consiste à proposer deux stimuli non sociaux identiques (gobelets métalliques inversés) placés dans les deux chambres. La deuxième phase comprend un stimulus non social et un stimulus social (une souris naïve sans contact préalable avec l'animal testé). Chaque phase dure 10 minutes, durant lesquelles le temps passé dans chaque chambre est quantifié.

### D. Test du cylindre (entre P45 et P60)

Le test du cylindre permet de mesure l''activité spontanée de l'animal. Les souris ont été placées dans un cylindre de plexiglas transparent (diamètre : 12 cm) et leur activité a été filmée pendant 10 minutes. La fréquence et la durée cumulée de redressements et d'auto-toilettage ont été quantifiés.

### E. Analyse de la marche (entre P45 et P60)

L'analyse de la marche a été réalisée au cours de trois essais de marche spontanée de l'animal à l'aide d'un système automatisé (GaitLab, Viewpoint). L'appareil est constitué d'un couloir en verre de 1,5 m de long avec une faible lumière verte projetée sur la passerelle en verre. Une caméra placée en dessous capture les paramètres spatiaux et cinétiques des empreintes. Plusieurs paramètres cinétiques, temporaux et spatiaux ont été analysés.

## II. Analyses stéréologiques

Après les tests comportementaux, un maximum de 2 animaux de même sexe et de même portée a été sélectionné au hasard pour l'analyse histopathologique, les profils d'acides gras, les marqueurs d'inflammation ainsi que le séquençage du métagénome du microbiote intestinal.

Pour les analyses stéréologiques, des coupes flottantes du cervelet en série de 50 µm ont été réalisées au cryostat (CryoStar NX70, Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachusetts) et stockées à -20°C jusqu'à utilisation. Une section de cervelet sur quatre a été montée sur des lames recouvertes de gélatine, les PC du cervelet ont été identifiés par coloration au crésyl violet/rouge neutre. Des estimations stéréologiques ont été effectuées à l'aide de la méthode du fractionnement optique et d'un échantillonnage aléatoire systématique pour obtenir le nombre total de PC dans les régions crus I et crus II. Chaque région d'intérêt a été décrite sur la base de l'atlas du cerveau de la souris à un objectif de 2,5× et les neurones ont été comptés à

un objectif de 40 × à l'aide du logiciel Mercator (Explora Nova). Des zones de garde supérieure et inférieure de 1 µm ont été définies en haut et en bas de la section pour exclure les profils perdus et chaque neurone ou noyau visible a été compté.

## III. Analyses des profils d'acides gras

Pour les analyses des profils d'acides gras et les marqueurs d'inflammation, les souris ont été profondément anesthésiées par le biais d'une injection i.p. de pentobarbital sodique dilué dans de la solution saline à 0,9% (120 mg/kg) et perfusées par voie transcardiaque avec un tampon phosphate alcalin (PBS) à 4°C. Le cerveau ainsi que le foie ont ainsi été récupérés et congelés à l'aide d'un dispositif de congélation rapide Snapfrost (Alphelys, Plaisir, France). Les profils d'acides gras cérébelleux et hépatique ont été obtenus par l'équipe du Dr Niyazi Acar (CGSA, Dijon, France) selon la méthode décrite dans l'article inclus dans cette thèse. Nous avons fait le choix de nous focaliser sur les AGPI n-3 et n-6, et de façon plus extensive sur les AGPI-LC n-3 et n-6, le DHA et l'AA respectivement, pour étudier l'impact des deux alimentations différenciées sur ces niveaux.

## IV. Analyses des marqueurs d'inflammation

Ces analyses de marqueurs d'inflammation sont basées sur des travaux antérieurs de l'équipe du Dr Sophie Layé (Chataigner et al. 2021). L'ARN d'un l'hémi-cervelet des mères et des descendants mâles et femelles a été extrait à l'aide du kit d'extraction TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Quentin-Fallavier, France). Des amorces spécifiques TaqMan® ont été utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt : TNF-α (Mm00443258_m1), cytokine pro-inflammatoire, *tumor growth factor bêta 1* (TGF-β1) (Mm01178820_m1), gène microglial et anti-inflammatoire, et arginase 1 (ARG-1), gène microglial et anti-inflammatoire (Mm00475988_m1). Les données ont été analysées à l'aide de la méthode du cycle de seuil

comparatif (Ct) et les résultats ont été exprimés sous forme d'expression relative par rapport au gène de ménage, la β-2-microglobuline (B2m; Mm00437762_m1).

## V. Analyses du microbiote intestinal

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr Maxime Pichon de l'équipe du Dr Christophe Burucoa du CHU de Poitiers (Inserm U 1070). Pour étudier le microbiote intestinal des souris, les fèces ont été recueillis à trois temps : P15, P20 et P22 chez la mère, correspondant à la période de lactation ainsi qu'à P36, P41 et P43, période post-sevrage chez la descendance. Les échantillons ont ensuite été conservés dans un tampon contenant des inhibiteurs de RNAses (RNA Protect, Qiagen, Venlo, Pays-Bas) à + 4°C pendant quelques jours puis à -80°C jusqu'à extraction et la quantification de l'ADN, puis la préparation des librairies et le séquençage. La raréfaction (sous-échantillonnage à 5000 séquences par échantillon) a été effectuée avant la détermination des mesures de diversité alpha (indices de Chao1 et de Shannon) et les mesures de diversité bêta (indices de dissimilarité de Bray-Curtis et de UniFrac pondéré (Lozupone et al. 2007) ont été estimées. L'analyse de la composition microbienne (ANCOM) a été réalisée afin d'identifier les genres différentiellement abondants parmi les groupes (Mandal et al. 2015).

# RÉSULTATS

# CHAPITRE 1 : A balanced omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acid diet suffices to prevent autism spectrum disorder symptoms in an environmental mouse model

## I. Résumé

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés aux effets des AGPI n-3 sur les symptômes des TSA. En effet, il a été montré précédemment qu'une supplémentation en AGPI n-3 par le biais de l'alimentation, et notamment en AGPI-LC n-3, réduisait les symptômes moteurs et sociaux caractéristiques des patients avec des TSA mais aussi des modèles animaux génétiques et environnementaux de TSA.

Nous nous intéressons ici au modèle de TSA reconnu et pertinent dans notre étude : l'exposition *in utero* au VPA chez la souris gestante. Ce modèle environnemental est largement étudié et reconnu pour ses validités de construction, apparente et prédictive. Peu d'études néanmoins s'intéressent aux potentiels effets thérapeutiques des AGPI n-3 sur ce modèle, et de façon encore plus rare aux potentialités liées aux longues chaînes ou précurseurs ou au ratio n-6/n-3 L'objectif de ce projet a donc été d'étudier les effets protecteurs contre les TSA de deux alimentations dès le premier jour embryonnaire jusqu'au sacrifice de l'animal à l'âge adulte. L'une dispose d'un apport d'AGPI n-3 sous la forme du précurseur ALA et un ratio LA/ALA de 6, et l'autre est largement enrichie en AGPI-LC n-3, DHA et EPA, et avec le même ratio LA/ALA de 6. Par leurs ratios LA/ALA égaux et équilibrés par rapport une alimentation industrielle (LA/ALA 15-25), ces deux alimentations sont considérées comme bénéfiques.

Une grande variété de matériels et méthodes a été utilisée dans le cadre de ce projet, présentée dans la section Matériels et Méthodes de ce manuscrit et détaillée dans l'article ci-après et qui est soumis pour publication au moment de l'impression de la thèse.

Nous avons pu montrer tout d'abord que le comportement maternel n'était ni influencé par le traitement au VPA ni par l'alimentation. En effet, aucun des paramètres étudiés lors du test de récupération des souriceaux réalisé à P9 n'a montré de différences entre les groupes expérimentaux maternels. Concernant la descendance, nous avons réalisé une analyse comportementale longitudinale, dont les détails des comparaisons statistiques sont situés en annexe. Nous avons commencé par une observation de l'ouverture des yeux (de P12 à P16) et du réflexe de redressement (P9, P11 et P13), représentant des étapes développementales cruciales chez le souriceau. Ces deux approches qualitatives ont révélé que l'alimentation enrichie en AGPI-LC n-3 donne lieu à un retard développemental chez les mâles et les femelles, dépendamment du traitement. Une analyse comportementale à l'âge adulte a ensuite été réalisée, avec une focalisation sur la sociabilité, la motricité et la marche. De façon intéressante, tous les groupes expérimentaux, indépendamment du sexe, du traitement et de l'alimentation, présentent un comportement social typique et sans stéréotypies motrices. Seules la fréquence et la durée cumulée des évènements de redressements lors du test du cylindre ont montré que l'interaction entre le traitement au VPA et l'alimentation équilibrée avec le précurseur d'AGPI-LC n-3, ALA, donnent lieu à une augmentation de ces paramètres. L'alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3 permet de normaliser ce comportement, et ce, chez les deux sexes. L'étude de la marche, quant à elle, montre que différents types de paramètres sont affectés par le traitement, selon le sexe. Les souris mâles exposées au VPA et à l'alimentation enrichie en AGPI-LC n-3 présentent le plus de différences avec les autres groupes, notamment dans les paramètres morphologiques (largeur, longueur et aire de la patte) et de marche (longueur de la foulée et temps de balancement). Les souris femelles exposées au VPA et à l'alimentation équilibrée déficiente en AGPI-LC n-3 présentent une diminution de paramètres cinématiques. Ces différences restent néanmoins modestes dans leur amplitude, leur nombre et leur variété par

rapport aux troubles moteurs identifiés dans plusieurs modèles animaux de TSA, qu'ils soient génétiques ou environnementaux.

Associées à cette étude comportementale, nous avons réalisé des études cellulaires et moléculaires. Une perte neuronale significative au niveau des PC dans les sous-lobules cérébelleux crus I et crus II avait été documentée dans plusieurs modèles animaux de TSA, y compris dans notre propre équipe (Al Sagheer et al. 2018; Haida et al. 2019; Matas et al. 2021; Thabault et al. 2022). Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons montré que les deux alimentations protègent contre cette perte neuronale induite par le VPA.

Concernant les profils d'acides gras, nous avons montré que les niveaux d'AGPI-LC n-3 et n-6 comme le DHA et l'AA respectivement étaient fortement influencés par le type d'alimentation. En effet, l'alimentation enrichie en AGPI-LC n-3 a augmenté de façon drastique les niveaux de DHA dans le foie et diminué les niveaux de AA dans le foie et dans le cervelet, indépendamment du traitement, chez les deux sexes de la descendance ou chez les mères. Néanmoins, les niveaux de DHA dans le cervelet étaient équivalents chez les mâles et chez les mères. Ceci indique qu'un apport direct et conséquent en DHA par l'alimentation ne permet pas une augmentation drastique des niveaux de DHA cérébelleux, et qu'une alimentation avec ALA comme seule source d'AGPI n-3 est suffisante pour atteindre des niveaux de DHA importants.

Les AGPI n-3 et n-6 étant reliés aux processus pro- et anti-inflammatoires respectivement, nous avons étudié l'expression des marqueurs inflammatoires dans le cervelet. De légères différences ont été retrouvées mais exclusivement chez les femelles et dans un seul paramètre (TNF-α), ne permettant pas de conclure à une augmentation majeure de l'inflammation. Le microbiote intestinal est également relié aux processus inflammatoires et de ce fait, les diversités alpha et bêta ainsi que l'abondance des phyla bactériens ont été étudiés. Nous n'avons pas observé de différences majeures entre les groupes expérimentaux chez la

descendance, que cela soit chez les mâles et femelles. Chez les mères néanmoins, le traitement VPA a augmenté la dissimilarité quelle que soit l'alimentation, avec le groupe exposé au VPA et supplémenté avec des AGPI-LC n-3 le plus dissimilaire. De plus, l'abondance relative des *Bacteroidetes* et des *Actinobacteria* a également été augmentée dans ce groupe.

Les résultats que nous avons obtenus mettent en exergue différents effets des AGPI-LC n-3, selon le sexe, l'âge de l'animal et l'état physiologique. En effet, malgré le retard développemental dû aux AGPI-LC n-3, les animaux adultes avec cette alimentation ne montrent pas de déficits comportementaux majeurs. Ils présentent une sociabilité normale sans stéréotypies motrices, avec quelques paramètres de marche modérément impactés avec une prévalence plus importante chez les mâles. Nous avons pu montrer ici qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3 était suffisante pour normaliser les niveaux d'activité globale de l'animal exposé *in utero* au VPA. L'activité globale est communément un paramètre observé dans des modèles d'anxiété et de dépression, des comorbidités retrouvées chez les patients et les modèles animaux avec des TSA.

De plus, l'analyse de la marche a permis de mettre en évidence des différences entre mâles et femelles, les femelles étant davantage protégées du traitement VPA avec l'alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3. Ceci pourrait être lié à des différences métaboliques relatives aux estrogènes entre les deux sexes. De façon intéressante, les résultats de comptage stéréologique cellulaire dans les régions cérébelleuses crus I et crus II sont en phase avec les résultats comportementaux et notre hypothèse principale. En effet, il n'y a pas de différences entre les groupes expérimentaux dans ces deux analyses, que nous interprétons comme une suffisance de l'alimentation équilibrée mais déficiente en AGPI-LC n-3 pour protéger contre les symptômes comportementaux et corrélats cellulaires de TSA. Les résultats des profils d'AG cérébelleux confirment également cette hypothèse. En effet, les niveaux de DHA cérébelleux sont équivalents, quel que soit le traitement ou l'alimentation, avec l'exception des femelles

VPA où l'alimentation équilibrée n'est pas suffisante pour atteindre les niveaux de DHA des autres groupes expérimentaux ; cependant cette différence reste modérée en amplitude. Ceci indique qu'au-delà d'un régime alimentaire équilibré en n-6/n-3, la supplémentation en AGPI-LC n-3 n'est pas gage de niveaux élevés cérébelleux et qu'une alimentation avec ALA comme seule source d'AGPI n-3, permet à elle seule d'augmenter les niveaux de DHA cérébelleux. Les AGPI-LC n-3 et n-6 jouant un rôle crucial dans les processus inflammatoires, nous avons cherché à savoir si le profil inflammatoire du cervelet était altéré par nos régimes alimentaires. Chez les femelles exclusivement, les niveaux de TNF-α augmentent légèrement en relation avec le traitement et l'alimentation, ce qui n'indique pas obligatoirement une augmentation notable de l'inflammation. Dans leur ensemble, ces résultats sur les profils d'acides gras et inflammatoire mettent en évidence quelques différences entre mâles et femelles et une relative sensibilisation des femelles à la supplémentation en AGPI-LC n-3.

Les patients atteints de TSA souffrent de problèmes GI qui seraient liés à une dysbiose intestinale, c'est-à-dire d'un déséquilibre de la composition microbienne. Des différences de diversité alpha et bêta ainsi qu'un déséquilibre entre les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* ont été systématiquement retrouvés dans le modèle de souris VPA de TSA. Il a été démontré que la supplémentation en AGPI-LC n-3 contribue à la diversité et à l'homéostasie du microbiote. Ici, nous n'avons trouvé aucune différence dans la diversité alpha, la diversité bêta ou l'abondance des phyla chez les descendants mâles ou femelles, quels que soient le sexe, le traitement ou le régime alimentaire. Cela renforce encore notre hypothèse selon laquelle la supplémentation en AGPI-LC n-3 avec du DHA et de l'EPA n'apporte que des bénéfices limités par rapport à une alimentation équilibrée en AGPI n-6/n-3, et que l'ALA suffit à protéger des symptômes de TSA induits par le VPA et des effets cellulaires, biochimiques, et les conséquences métaboliques.

En conclusion, nous avons pu montrer que les deux alimentations suffisaient pour protéger la descendance de la majorité des symptômes des TSA engendrés par l'exposition *in utero* au VPA. Les femelles, comparées aux mâles, semblent bénéficier d'un effet protecteur modéré de l'alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3. Cette étude révèle aussi que les mères semblent être les plus touchées par le VPA, notamment au niveau de leur microbiote intestinal et des profils d'acides gras au niveau du cervelet. Seule l'alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3 serait bénéfique dans ces conditions.

# II. Tiré à part

*Translational Psychiatry*
*Article*

## A balanced omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acid diet suffices to prevent autism spectrum disorder symptoms in an environmental mouse model

Valentine Turpin[1], Maud Schaffhauser[1], Mathieu Thabault[1], Agnès Aubert[4], Corinne Joffre[4], Eric Balado[1], Jean-Emmanuel Longueville[1], Maureen Francheteau[1], Christophe Burucoa[2,3], Maxime Pichon[2,3], Sophie Layé[4] and Mohamed Jaber[1,3, #]

1 Université de Poitiers, Inserm, Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Poitiers, France

2 Université de Poitiers, Inserm, PHAR2, Poitiers, France

3 CHU de Poitiers, Poitiers, France

4 Université de Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeurO, UMR 1286, F-33000 Bordeaux, France

**#: Corresponding author.**

Email: mohamed.jaber@univ-poitiers.fr.

Phone: 33-(0) 549 453 985

ORCID #: 0000-0003-2536-1913

**Running title:** n-3 PUFAs protect against VPA-induced autism symptoms

**Keywords:** social and motor behavior, cerebellum, Purkinje cells, valproic acid, DHA, microbiota.

**Word count** (not including abstract and reference list): 4447 (limit is 5000)

**Number of Figures**: 6 (limit is 6).

**Supplementary materials:** Suppl. Table I and Suppl. Figures 1-8.

**Abstract** (293 words, limit is 300)

Exploration of potential nutritional therapies in autism spectrum disorder (ASD), notably through omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) supplementation, have been explored but remain elusive as to their specific contribution to the phenotype and their potential in ameliorating cardinal symptoms of the disease. Here, we compared the effects of two diets that differ in their n-3 PUFA species on ASD symptoms in the valproic acid (VPA) mouse model. For this, pregnant C57BL/6J females were i.p. injected with VPA at embryonic day 12.5 (E12.5; 450mg/kg) and fed with either a balanced diet (n-3 bal) with alpha-linolenic acid (ALA) as the only n-3 PUFA source or a n-3 long-chain PUFA (LCPUFA) supplemented diet (n-3 supp) with docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) as the major n-3 PUFA species. Diets were provided starting E0, throughout lactation and on to the offspring after weaning through adulthood. Maternal and pup behaviors were investigated followed by social, motor and gait behavior in young adult offspring. Post-mortem investigations included cerebellar Purkinje cell (PC) count, liver and cerebellar fatty acid (FA) composition, inflammation markers' levels and microbiota composition. All experiments were performed separately on male and female offspring. Developmental milestones were delayed in the n-3 LCPUFA groups, whatever the treatment. VPA-exposed offspring did not show social deficits, stereotypies, or PC loss. Global activity and gait were altered by diet and treatment with sex differences. TNF-alpha cerebellar levels were slightly increased by n-3 LCPUFA supplementation, only in females. With both diets, VPA did not alter microbiota composition in male and female offspring nor cerebellar n-3 LCPUFA levels, except in females. Our results indicate that a balanced n-3/n-6 PUFA diet may suffice to protect from ASD symptoms and physiopathology, and that n-3 LCPUFA supplementation brings limited benefits in the VPA mouse model.

## Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by persistent deficits in communication and social interactions, and restricted repetitive behaviors, interests, or activities [1]. Imaging and post-mortem studies in ASD patients have identified the cerebellum as one of the major affected brain regions with reduction of its volume and decreased Purkinje cell (PC) number [2]. Similar findings were observed in both genetic and environmental animal models, where the cerebellar regions crus I and crus II involved in motor and cognitive functions were shown to be the most affected by PC loss, with sex differences [3–5]. Many comorbidities are also associated with ASD including inflammation, gastrointestinal and eating disorders [6,7]. There is currently no cure or preventive strategies for this disease other than symptomatologic.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from the omega-6 and omega-3 (n-6 and n-3) families are found in large quantities in brain cell membranes and are crucial for brain function and development [8,9]. Linoleic acid (LA, n-6) and alpha-linolenic acid (ALA, n-3) are essential fatty acids (FA) that cannot be synthetized by mammals and need to be provided through diet. Consumed LA and ALA are metabolized into long-chain (LC) PUFA, arachidonic acid (AA, n-6) and eicosapentaenoic acid (EPA, n-3)-docosahexaenoic acid (DHA, n-3), respectively. Additional dietary supply from fatty fish is necessary to reach the recommended DHA and EPA brain levels [10].

PUFAs from the mother are crucial for the developing fetus brain during the perinatal period [9]. Studies showed that high n-6/n-3 ratio in this critical period may lead to aberrant brain lipid composition, metabolism, and signaling pathways [11,12]. This in turn may be associated with neurodevelopmental and psychiatric disorders [8,13,14]. Thus, n-3 PUFA supplementation during the perinatal period for prevention and at adulthood for correction of ASD have been studied in clinical and animal settings.

While several studies point to potential benefits of PUFA supplementation during the perinatal period, the exact contribution of n-6 and n-3 PUFAs species (i.e precursor *versus* long-chain) and the contribution of the n-6/n-3 ratio on neurodevelopmental disorders are not well defined. This, along with the conflicting results obtained in clinical ASD studies, prompt us to perform a large scale and a side-by-side comparison of two diets. The first is a balanced diet (n-3 bal) with linolenic acid (ALA) as the only n-3 PUFA source and the second is a n-3 long-chain PUFA (LCPUFA) supplemented diet (n-3 supp) with docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) as the major sources of n-3 PUFA species. This was performed in the valproic acid (VPA) mouse model of ASD, in males and females analyzed separately. Prior to this study, we had recently performed a full-scale analysis

of this ASD mouse model on a wide range of behaviors with molecular and cellular correlates from early postnatal age to adulthood with special focus on motor behavior and cerebellar implications under a regular animal facility diet [3]. We showed major social deficits, stereotypies and cerebellar motor and gait disorders in the VPA ASD mouse model which were correlated with cerebellar regional PC loss in crus I and crus II. This allowed us to obtain a solid starting point to investigate n-3 LCPUFA supplementation effects on the ASD phenotype. Here, we extend our analysis to inflammation and FA parameters with microbiome, to determine their implication in dam and in male and female offspring behavioral, cellular and metabolic responses to differential diets.

## Methods and Materials

### Animals and treatment

Animal housing and experimental procedures were performed in accordance with the European Union directive (2010/63/EU) and validated by the ethics committee (Approval # 202002051628899). C57BL/6J mice (Charles River Laboratories) were housed in ventilated cages with access to food and water *ad libitum*. Room temperature was maintained at 23°C on a 12-h-light/-dark cycle (08:00-20:00).

A total of 337 mice were used in this study: 55 females and 44 males were used for mating, resulting in 120 female and 118 male offspring. From the first gestational day (E0) and throughout gestation and nursing, pregnant females were fed with a balanced isocaloric diet supplemented with n-3 LCPUFA (DHA and EPA) (n-3 supp) or not (n-3 bal) until weaning of their litter (SAFE, Augy, France). Both diets had a LA/ALA ratio of 6, meaning that they share the same amount of n-3 and n-6 precursors but not of n-3 LCPUFA (detailed description of diets are provided in Suppl. Table I). Pregnant females received a single i.p. injection of either VPA (450mg/kg, Sigma-Aldrich, P4543) or saline solution (NaCl 0.9%) at gestational day E12.5 as previously described [3,15]. After giving birth, dams were allocated to four experimental groups depending on prenatal treatment and diet: SAL without n-3 LCPUFA (SAL/n-3 bal), VPA n-3 without LCPUFA (VPA/n-3 bal), SAL n-3 LCPUFA-supplemented (SAL/n-3 supp) and VPA n-3 LCPUFA-supplemented (VPA/n-3 supp) (timeline and experimental procedures are detailed in Suppl. Fig. 1). Male and female offspring were separated at weaning (postnatal day 28, P28) into one of the following 8 groups for behavior analysis: 29 males and 39 females SAL/n-3 bal, 36 males and 27 females SAL/n-3 supp, 27 males and 28 females VPA/n-3 bal, and 26 males and 26 females VPA/n-3 supp. For microbiota, FA profile and

inflammation markers, the same animals were used: 5 randomly selected animals per group, with a maximum of 2 animals from the same litter and sex.

**Maternal and offspring behavior procedures**

Maternal behavior experiments were performed on SAL/n-3 bal (n=15), SAL/n-3 supp (n=14), VPA/n-3 bal (n=13), and VPA/n-3 supp (n=12) groups. Dam performances on pup retrieval were assessed at P9. For this test, both the litter and the dam were removed and separated from the home cage for 5 minutes before being placed back. Dam behavior directed towards the pups, or the environment was recorded for 15 minutes and analyzed on Solomon Coder (András Péter, Keele, UK).

Developmental milestones on all offspring were assessed by measuring righting reflex at P9, P11 and P13 as well as eye opening from P12 to P16. Spontaneous activity in the cylinder was recorded at P48 for grooming and rearing scoring using Solomon Coder (András Péter, Keele, UK) as previously described [3,16]. Spatial, temporal, and kinematic gait parameters were analyzed during spontaneous walk at P49 using an automated gait analysis system (Gaitlab, Viewpoint, France) as previously described [3]. Social interaction was assessed between P50 and P60 using the three-chamber test (3-CT) as previously described [3,17].

**Tissue processing, immunohistochemistry and stereology counting**

Animal perfusion, brain retrieval, tissue sectioning and cresyl violet/neutral red staining were performed as previously described [4]. Stereological estimates of Purkinje cell (PC) number within crus I and II cerebellar regions were obtained using the optical fractionator method (Mercator Software, Explora Nova, France) and systematic random sampling as previously described [4] in the following groups: [Crus I: SAL/n-3 bal (males n=11 and females n=13), SAL/n-3 supp (males n=11 and females n=7), VPA/n-3 bal (males n=10 and females n=11) and VPA/n-3 supp (males n=10 and females n=9)] and [Crus II: SAL/n-3 bal (males n=11 and females n= 12), SAL/n-3 supp (males n=12 and females n=9), VPA/n-3 bal (males n=10 and females n=11) and VPA/n-3 supp (males n=10 and females n=9].

**Fecal microbiome analysis**

Fecal samples were collected from both the dam through lactation period (P15, P20 and P22) and the litter after weaning (P36, P41 and P43). Samples were conserved at -80°C in nucleic acid conservative buffer until DNA extraction (RNA Protect, Qiagen, Venlo, The Netherlands). Wet-lab and bioinformatic analysis were performed as previously described [18,19]. After verification on rarefaction

curve, rarefaction (subsampling to 5000 sequences per sample) was performed before determination of alpha diversity metrics (Chao1′s and Shannon's indexes), and beta diversity metrics (Bray-Curtis dissimilarity and weighted UniFrac [20]). ANCOM was used to identify differentially abundant genera among the groups [21]. Raw data are available under the SRA accession numbers (SRR19906240 to SRR19906299).

**Analysis of inflammation makers by qPCR**

RNA expression of major genes implicated in inflammatory process was investigated as previously described [22]. Briefly, RNA from hemi-cerebellum of dams and male and female offspring was extracted using TRIzol extraction kit (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Quentin-Fallavier, France). Purity and concentration of RNA were determined using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Nanodrop technologies, Wilmington, DE, USA) and a bioanalyzer (Agilent, Les Ulis, France). Reverse transcription was performed on one or two micrograms of RNA by Superscript IV (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). TaqMan® specific primers were used to amplify genes of interest as previously described [22] with a focus on tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha, Mm00443258_m1), transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1, Mm01178820_m1) and Arginase 1 (Arg1, Mm00475988_m1). The housekeeping gene was beta-2-microglobulin (B2M, Mm00437762_m1). Fluorescence was determined on a LightCycler® 480 instrument II (Roche, La Rochelle, France). Data were analyzed using the comparative threshold cycle (Ct) method and results were expressed as relative fold change to control target mRNA expression.

**Analysis of fatty acids in cerebellum and liver**

FAs from the liver and the cerebellum were analyzed as previously described [23–25]. Briefly, liver and cerebellum FAs were extracted according to the Folch's method [26], FAs were transmethylated according to Morrison and Smith's method [27] and FA methyl esters (FAMEs) were analyzed on a FOCUS GC gas chromatograph (Thermo Electron Corporation) equipped with a split injector and a flame ionization detector. FAMEs were identified by making a comparison with commercial standards. FA composition is expressed as the percentage of total FAs.

**Statistical analyses**

For experiments related to behavior, data are expressed as mean ± Standard Error of the Mean while cellular and metabolic experiments, data are expressed as median ± min to max and analyzed using GraphPad Prism-9 software (La Jolla, California, USA). Data were analyzed using two-way or three-

way analysis of variance (ANOVAs) followed by Tukey post-hoc multiple comparisons test. For all analyses, a p value < 0.05 was considered significant. Raw data and detailed statistical analysis on all groups are available upon request.

## Results

### Maternal behavior is not affected by either VPA treatment or diet

VPA-exposed juvenile mice produce aberrant patterns of isolation stress-induced ultrasonic vocalizations [28]. This may influence in return maternal behavior, which is key to normal social and motor development of offspring [29]. Here, we assessed various parameters related to maternal behavior following pup separation in relation with treatment and diet (Suppl. Fig. 2). Two-way ANOVA analysis indicated no differences between experimental groups, whatever the treatment or diet in maternal care, nesting and stress related behaviors. In summary, our results indicate that VPA treatment did not affect maternal behavior when mothers were fed either n-3 LCPUFA or its precursors only.

### Developmental milestones of offspring are delayed by n-3 LCPUFA supplementation

We have recently shown that prenatally VPA-exposed mice exhibit significant early postnatal behavioral impairments [3]. Here, we investigated eye opening time-period and righting reflex from P9 to P16 in relation to treatment and diet (Fig. 1). Eye opening was delayed in both male and female SAL/n-3 supp mice compared to SAL/n-3 bal mice at P13 and only in males at P14. Eye opening was also delayed in VPA/n-3 supp females compared to VPA/n-3 bal females at P13 and P14. In addition, SAL/n-3 supp males showed an aberrant righting reflex at P9 and P13 compared to the SAL/n-3 bal group and compared to the VPA/n-3 supp group at P13 only. Similar differences were found in females at P11 but not at P13.

These results indicate that n-3 supp diet affected sensorimotor development in conjunction with VPA treatment and sex of the animals.

### No major behavioral or cellular alterations following VPA treatment whatever the diet

Among others, we have reported that prenatally VPA-exposed mice consistently show reduced social behavior in the 3-CT test with mice under a regular animal facility diet [3,15,30]. Here, using the same experimental procedures in the same housing conditions, both diets prevented the VPA-induced

sociability impairments in male and female young adult mice (Fig. 2A). Three-way ANOVA showed that all groups have normal social abilities. A treatment effect was found in VPA/n-3 supp males that were slightly more social than the SAL/n-3 supp group.

Stereotyped behavior has often been reported in various genetic and environmental animal models of ASD [2–5]. This behavior is reminiscent of repetitive behaviors in ASD patients and constitutes one of the major symptoms used in the diagnosis of ASD [1]. We have previously shown that prenatal exposure to VPA significantly increases stereotyped behavior in both males and females as compared to controls [3]. Here, we found no differences in grooming parameters between groups, except on grooming duration in females where VPA treatment had a significant effect but no subsequent differences between groups were found (Fig. 2B). However, both VPA/n-3 bal male and female mice showed an increased frequency and duration of rearing behavior compared to both SAL/n-3 bal and VPA/n-3 supp mice (Fig. 2C). No differences in rearing between VPA/n-3 supp *versus* SAL/n-3 supp groups or in SAL/n-3 bal *versus* SAL/n-3 supp groups were found.

Although gait impairments are not yet considered in the diagnosis criteria of ASD, they have often been reported in both ASD patients and animal models [31,32]. We have previously shown significant gait deficits in genetic and environmental ASD animal models, including the VPA model [2–5]. Here we show moderate gait deficits, which were for the most part observed in the VPA/n-3 supp male group as compared to the SAL/n-3 supp group (Fig. 3). For instance, dynamic and temporal parameters such as stride length and swing time were affected. Morphological parameters such as paw width, paw length and paw area were also altered by both treatment and diet. In females, only a few parameters were affected, such as kinematic-related fore and hindlimbs base of support. VPA/n-3 bal females showed a decreased base of support compared to the VPA/n-3 supp group on both forelimbs and hindlimbs, and additionally to SAL/n-3 bal females for forelimbs only.

Taken together, these results indicate that both diets were able to reduce if not compensate for ASD related social, motor and gait symptoms as only moderate to no differences between groups were observed, whatever the treatment, diet, or sex.

We have previously shown significant PC number decreases in the crus I or crus II cerebellar areas in both environmental and genetic ASD animal models [3–5]. Here, we examined PC number in crus I and crus II in all experimental groups (Suppl. Fig. 3). Two-way ANOVA analysis showed no treatment or diet effect in either males or females.

These results indicate that both n-3 bal and n-3 supp diets protected from PC loss induced by VPA in males and females alike.

**Diet, but not VPA treatment, differentially alter n-3 and n-6 LCPUFAs levels in the liver, but not in the cerebellum**

We assessed the FA profile of the liver and the cerebellum, a cerebral region high in terms of DHA content and which is sensitive to changes in FA composition [33]. Analyses were performed longitudinally to compare dam and offspring FA profiles. Given that n-3 LCPUFA supplementation was provided through diet, we analyzed, among others, levels of n-3 and n-6 LCPUFA, DHA and AA (Fig. 4 and Suppl. Fig. 4). In the liver, in all n-3 LCPUFA supplemented groups, whether dams, males or females, a significant increase (up to 3-fold) in DHA levels was found compared to n-3 balanced groups. In the cerebellum, DHA levels also increased in the VPA/n-3 supp compared to VPA/n-3 bal, but only moderately (+25% approximately) and only in female offspring. Interestingly, no group differences in DHA cerebellar levels were found in dams and male offspring. The AA levels decreased in SAL/n-3 supp and VPA/n-3 supp groups compared to SAL/n-3 bal and VPA/n-3 bal groups respectively both in the liver and the cerebellum and in males and females. However, dam AA levels in the liver increased in the VPA/n-3 bal compared to both SAL/n-3 bal and VPA/n-3 supp.

These results indicate a major effect of n-3 LCPUFA supplementation on DHA and AA levels within the liver but not within the cerebellum where DHA levels were equivalent, whatever the treatment and diet.

**Moderate to no alterations in inflammatory markers in conjunction with diet and treatment**

N-3 PUFAs are associated with anti-inflammatory processes and could influence behavior output [9]. Here, we investigated several inflammation markers in the offspring cerebellum: TNF-alpha, TGF-beta, and ARG. No differences were found between groups for TGF-beta and ARG, whatever the sex. However, TNF-alpha expression increased slightly in SAL/n-3 supp females compared to SAL/n-3 bal females. While VPA treatment increased TNF-alpha levels in males, no subsequent differences between groups were found (Fig. 5).

In brief, moderate to no effects of diet or treatment on inflammation markers were observed.

**Microbiota inter- and intra-diversity and bacteria relative abundance are not affected by diet**

Microbiota has been shown to be influenced by *in utero* VPA treatment on offspring and by n-3 PUFA supplementation or deficiency [34–36]. Using a n-3 balanced or n-3 LCPUFA supplemented diet, we found no differences in alpha-diversity in either dams or offspring. Interestingly, offspring beta-diversity was not different across groups, whereas dam beta-diversity increased by VPA treatment, whatever the diet, with VPA n-3 suppl dams being the most dissimilar (Fig. 6A and Suppl. Fig. 5-7).

Additionally, in dams, but not in offspring, relative abundance of *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* was increased in VPA/n-3 supp group compared to SAL/n-3 supp and VPA/n-3 bal group (Fig. 6B and Suppl. Fig. 8). No differences were found in offspring's microbial composition, except in males, where Bray-Curtis dissimilarity analysis showed that the VPA/n-3 supp group has a higher microbial composition compared to SAL/n-3 supp group (Suppl. Fig. 6). These results show no major differences between diets on the offspring microbiota, whatever the treatment.

## Discussion

In this study, we investigated the potential benefits of adding n-3 LCPUFA to a balanced diet starting from the perinatal period to adulthood on a multiplicity of social, motor and gait behaviors as well as on cerebellar cellular, molecular, and metabolic correlates in both male and female VPA mouse model of ASD. We found that adult VPA-exposed animals, whatever the diet, were not showing social deficits, stereotypies or cerebellar PC loss, all major hallmark of ASD. Developmental milestones, gait and inflammatory profiles were only slightly affected by diet in conjunction with VPA prenatal exposure. Microbiota composition was not altered in relation with diet and treatment. Additionally, cerebellar DHA levels were somewhat equivalent, whatever the diet, while liver DHA levels dramatically increased with a n-3 LCPUFA supplementation. Using dams and their offspring, we were also able to perform longitudinal studies on several parameters. We found that while maternal behavior was not altered by either treatment or diet, dams exhibited a change in their microbiota composition and increased n-6 LCPUFA liver levels in conjunction with VPA treatment.

The n-3 LCPUFA supplemented groups exhibited a slight delay in both righting reflex and eye opening, in accordance with previous studies reporting adverse consequences in postnatal development after maternal dietary n-3 LCPUFA supplementation or deficiency during gestation and lactation [37–40]. Contrary to the common misconception that elevated levels of n-3 LCPUFAs are necessary beneficial, a change in the n-6/n-3 PUFA ratio, irrespective of its direction, was reported to be deleterious during development, without major consequences at adulthood, although this also depends on the animal model [41,42]. Indeed, in both the BTBR and C57BL/6J mouse strains, body weight was decreased following perinatal diet intervention whereas in the Fmr1 KO mouse, body weight was increased [41,42]. Here, ALA from the n-3 balanced diet did not lead to developmental delays and was even able to normalize both righting reflex and eye-opening scores in VPA-exposed animals. Metabolic studies on this matter may help unravel the mechanisms behind this developmental delay.

Deficits in social preference or social novelty and increased grooming behavior are repeatedly found in several animal models of ASD including the VPA model under a standard diet, as we also reported recently [3–5]. Here, we found that both diets, n-3 balanced with and without n-3 LCPUFA, protected against sociability deficits and stereotypy anomalies, two major ASD-associated symptoms. To our knowledge, this study is the first to investigate n-3 PUFA precursor effects on social behavior since the vast majority of studies compared n-3 LCPUFA supplementation and deficiency, where n-3 LCPUFA supplementation was shown to alleviate stereotypies and social behavior impairments [43].

We have previously shown, in the same experimental settings, that rearing, which represents global activity, decreased in VPA-exposed animals fed with a standard diet [3]. Here, the n-3 balanced diet increased rearing behavior in VPA-exposed animals compared to controls and this was normalized with n-3 LCPUFA supplemented diet. In physiological conditions, high n-3 LCPUFA supplementation for 3 weeks after weaning reduces rearing [44], whereas in depression and anxiety models, which are ASD comorbidities, opposite results are found [45].

Our previous work on several environmental and genetic ASD animal models fed with a regular diet consistently showed motor and gait impairments [3–5]. Gait is seldom explored in these models even though ASD patients exhibit an irregular walk and balance difficulties associated with cerebellar dysfunction [46]. Here, we showed that diet had a differential effect on ASD VPA male and female mice. The n-3 LCPUFA supplementation ameliorated gait parameters in females, with an increased hindlimb base of support, suggesting better stability, whereas VPA-exposed males with n-3 LCPUFA supplementation displayed dynamic, temporal and morphological impairments compared to controls, albeit of a lower magnitude than what we observed with animals under a regular diet [3]. These results suggest moderate sex-dependent gait deficiencies in conjunction with n-3 LCPUFA supplementation, possibly resulting from metabolic differences between males and females hypothesized to be estrogen-related [47].

Crus I and crus II cerebellar regions are involved in both cognitive and motor functions, which make them a target of choice in ASD physiopathology [2,48]. A decrease in PC number has been widely reported in both ASD patients and in animal models, including the VPA mouse model under a regular animal facility diet [3,5,49–52]. Here, we showed that PC cell number in these regions was not altered between groups, whatever the treatment, diet, or sex. These findings fit with our main hypothesis, which is that the n-3 balanced diet is sufficient to protect from ASD behavioral symptoms and cellular correlates and that supplementation with n-3 LCPUFA does not yield additional benefits in these conditions.

Furthermore, to determine whether n-3 PUFA supplementation is associated with higher n-3 PUFA levels in the periphery or in the central nervous system, we investigated FA profiles in the liver and the cerebellum. The n-3 LCPUFA supplemented diet was highly supplemented in DHA, whereas the n-3 balanced diet contained only n-3 and n-6 precursors (ALA and LA), with shared LA/ALA ratio of 6 in the two diets. Thus, our lipid analysis focused on n-3 and n-6 LCPUFA, DHA and AA respectively. As expected, n-3 LCPUFA supplementation resulted in a drastic decrease in liver and cerebellum AA levels in both males and females. However, we found increased DHA levels in the liver in all groups. In the cerebellum, there was a diet effect with increased DHA levels in the VPA female group, but not in males where equivalent DHA levels were found. This indicates that beyond a n-3 balanced diet, a n-3 LCPUFA supplementation does not further increase cerebellar DHA levels, at least in the male groups. This suggests that this diet would bring limited if any benefit to the brain metabolism, translating into limited to no additional beneficial effects on ASD behavioral symptoms. These findings are in line with another study where a n-3 balanced diet with ALA as the only source of n-3 PUFA sufficed to increase DHA and decrease AA levels in the cortex and protected from deficits in emotional behavior in adult and old CD1 mice (2-5 months and 19-23 months) as compared to a n-3 deficient diet [53]. Previous studies have investigated the role of n-3 and n-6 LCPUFA on inflammation and concluded that high DHA brain levels are linked to an anti-inflammatory profile whereas high AA brain levels are correlated with a pro-inflammatory profile [54–56]. We found that TNF-alpha levels increased slightly in SAL/n-3 supp females only. Taken together, these results on FA profiles and inflammation highlighted sex differences and female sensitization to n-3 LCPUFA supplementation.

ASD patients suffer from gastrointestinal issues (GI) hypothesized to result from a microbiota dysbiosis, i.e. a microbial composition imbalance [57,58]. Differences in alpha and beta-diversity and an imbalance in *Bacteroidetes* and *Firmicutes* have been consistently reported in the VPA ASD mouse model [34,59]. The n-3 LCPUFA supplementation was shown to contribute to microbiota diversity and homeostasis [36,60], but studies on ALA effects are lacking. Here, we found no differences in alpha-diversity, beta-diversity, or phyla abundance in either male or female offspring, whatever the sex, treatment, or diet. This further consolidates our hypothesis that n-3 LCPUFA supplementation with DHA and EPA brings only limited benefits compared to a balanced n-3/n-6 diet, and that ALA suffices to protect from VPA-induced ASD symptoms and from cellular, biochemical, and metabolic consequences in our conditions.

One of the strengths of this study is the global and longitudinal approach where, in addition to male and female offspring analyzed separately, we also investigated treatment and diet influences on dams' maternal behavior, liver and cerebellum FA profiles and microbiota composition. Maternal care

received by the pups during the first postnatal weeks can affect their behavior in adulthood [61,62] and in our hands, we did not find any differences on maternal behavior between the dams' groups, whatever the treatment or diet. These findings align with those of another study, where VPA treatment did not affect maternal behavior [63]. However, we found more drastic differences due to treatment and diet interaction in dams than in offspring pertaining to maternal FA profiles and microbiota composition. In fact, VPA-exposed dams with the n-3 balanced diet exhibited increased AA liver levels, which were normalized with the n-3 LCUPFA supplementation diet. In addition, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* proportion in VPA/n-3 supp dams increased, as did the beta-diversity in this experimental group. Dams may be more sensitive to diet changes as they were fed with a regular diet before gestation, whereas offspring were given the same diet from embryonic stage to adulthood.

Taken together, our findings indicate that n-3 LCPUFA supplementation brings only limited benefits to the ASD phenotype in the VPA mouse model when compared with a n-3 balanced diet. These beneficial effects were evidenced at the behavioral, cellular, and molecular levels, in both sexes, although females seem to be somewhat more sensitive to n-3 LCPUFA supplementation. Additional investigations are warranted, aiming at deciphering the underlying mechanisms of dietary effects on ASD brains. They also need to consider sex and age differences, two parameters seldom investigated at least in preclinical settings, where experiments are performed mostly in young adult males under a regular diet.

**Acknowledgments:** This work has benefited from the facilities and expertise of the PREBIOS platform (Université de Poitiers). The research leading to the results detailed in this manuscript received funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (MJ) and the CPER-FEDER program (MJ), FRC CONNECT (SL) and Région Nouvelle Aquitaine (SL and MJ, 2019-1R3M08). VT is a recipient of a joint PhD fellowship from Nouvelle-Aquitaine Region/Fondation pour la Recherche Médicale. MT is a recipient of a joint PhD fellowship from Nouvelle-Aquitaine Region/Inserm. Funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation or writing of the report. Authors are grateful for the research staff at the lipidomic facility INRAe 1324 (Dijon-France). Authors are thankful to Jeffrey Arsham for careful language editing. Some of these results were recently presented in a poster format at the FENS meeting in Paris (July 2022).

**Disclosures:** Authors declare no financial or non-financial interests directly or indirectly related to the work submitted for publication.

## References

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

2 Thabault M, Turpin V, Maisterrena A, Jaber M, Egloff M, Galvan L. Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: From Clinical Observations to Animal Models. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 2294.

3 Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Fernagut P-O *et al.* Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *Int J Neuropsychopharmacol* 2018; **21**: 871–882.

4 Haida O, Al Sagheer T, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Soria F *et al.* Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Transl Psychiatry* 2019; **9**: 124.

5 Matas E, Maisterrena A, Thabault M, Balado E, Francheteau M, Balbous A *et al.* Major motor and gait deficits with sexual dimorphism in a Shank3 mutant mouse model. *Mol Autism* 2021; **12**: 2.

6 Davoli-Ferreira M, Thomson CA, McCoy KD. Microbiota and Microglia Interactions in ASD. *Front Immunol* 2021; **12**: 676255.

7 Baraskewich J, von Ranson KM, McCrimmon A, McMorris CA. Feeding and eating problems in children and adolescents with autism: A scoping review. *Autism* 2021; **25**: 1505–1519.

8 Bazinet RP, Layé S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 2014; **15**: 771–785.

9 Martinat M, Rossitto M, Di Miceli M, Layé S. Perinatal Dietary Polyunsaturated Fatty Acids in Brain Development, Role in Neurodevelopmental Disorders. *Nutrients* 2021; **13**: 1185.

10 Harris, W.S. in *Encyclopedia of Dietary Supplements* 2nd edn (eds Coates PM, Blackman MR,

Betz JM, Cragg GM, Levine M, Moss J, *et al.*) Omega-3 Fatty Acids (Informa Healthcare, London, 2015).

11 Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 2011; **44**: 203–215.

12 Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF, Rawlings RR. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr* 2011; **93**: 950–962.

13 Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol* 2018; **9**: 345–381.

14 Madore C, Leyrolle Q, Morel L, Rossitto M, Greenhalgh AD, Delpech JC *et al.* Essential omega-3 fatty acids tune microglial phagocytosis of synaptic elements in the mouse developing brain. *Nat Commun* 2020; **11**: 6133.

15 Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol* 2018; **299**: 217–227.

16 Fleming SM, Ekhator OR, Ghisays V. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp* 2013; **76**: 50303.

17 Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR *et al.* Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 2004; **3**: 287–302.

18 Langevin S, Pichon M, Smith E, Morrison J, Bent Z, Green R *et al.* Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study. *Journal of General Virology* 2017; **98**: 2425–2437.

19 Gachet C, Prat M, Burucoa C, Grivard P, Pichon M. Spermatic Microbiome Characteristics in

Infertile Patients: Impact on Sperm Count, Mobility, and Morphology. *JCM* 2022; **11**: 1505.

20 Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 1576–1585.

21 Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis* 2015; **26**: 27663.

22 Chataigner M, Mortessagne P, Lucas C, Pallet V, Layé S, Mehaignerie A *et al.* Dietary fish hydrolysate supplementation containing n-3 LC-PUFAs and peptides prevents short-term memory and stress response deficits in aged mice. *Brain Behav Immun* 2021; **91**: 716–730.

23 Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Grégoire S *et al.* Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* 2012; **7**: e36861.

24 Madore C, Nadjar A, Delpech J-C, Sere A, Aubert A, Portal C *et al.* Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behav Immun* 2014; **41**: 22–31.

25 Delpech J-C, Madore C, Joffre C, Aubert A, Kang JX, Nadjar A *et al.* Transgenic Increase in n-3/n-6 Fatty Acid Ratio Protects Against Cognitive Deficits Induced by an Immune Challenge through Decrease of Neuroinflammation. *Neuropsychopharmacol* 2015; **40**: 525–536.

26 Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; **226**: 497–509.

27 Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964; **5**: 600–608.

28 Kuo H-Y, Liu F-C. Valproic acid induces aberrant development of striatal compartments and corticostriatal pathways in a mouse model of autism spectrum disorder. *FASEB J* 2017; **31**: 4458–4471.

29 Zhang TY, Chrétien P, Meaney MJ, Gratton A. Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J Neurosci* 2005; **25**: 1493–1502.

30 Mabunga DFN, Gonzales ELT, Kim J, Kim KC, Shin CY. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol* 2015; **24**: 285–300.

31 Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, Blatt GJ *et al.* Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* 2012; **11**: 777–807.

32 Yirmiya N, Charman T. The prodrome of autism: early behavioral and biological signs, regression, peri- and post-natal development and genetics. *J Child Psychol Psychiatry* 2010; **51**: 432–458.

33 Joffre C, Grégoire S, De Smedt V, Acar N, Bretillon L, Nadjar A *et al.* Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016; **114**: 1–10.

34 de Theije CGM, Wopereis H, Ramadan M, van Eijndthoven T, Lambert J, Knol J *et al.* Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 2014; **37**: 197–206.

35 Leyrolle Q, Decoeur F, Briere G, Amadieu C, Quadros ARAA, Voytyuk I *et al.* Maternal dietary omega-3 deficiency worsens the deleterious effects of prenatal inflammation on the gut-brain axis in the offspring across lifetime. *Neuropsychopharmacol* 2021; **46**: 579–602.

36 Robertson RC, Seira Oriach C, Murphy K, Moloney GM, Cryan JF, Dinan TG *et al.* Omega-3

polyunsaturated fatty acids critically regulate behaviour and gut microbiota development in adolescence and adulthood. *Brain Behav Immun* 2017; **59**: 21–37.

37 Wainwright PE, Jalali E, Mutsaers LM, Bell R, Cvitkovic S. An imbalance of dietary essential fatty acids retards behavioral development in mice. *Physiol Behav* 1999; **66**: 833–839.

38 Church MW, Jen K-LC, Dowhan LM, Adams BR, Hotra JW. Excess and deficient omega-3 fatty acid during pregnancy and lactation cause impaired neural transmission in rat pups. *Neurotoxicol Teratol* 2008; **30**: 107–117.

39 Bianconi S, Santillán ME, Solís M del R, Martini AC, Ponzio MF, Vincenti LM *et al.* Effects of dietary omega-3 PUFAs on growth and development: Somatic, neurobiological and reproductive functions in a murine model. *J Nutr Biochem* 2018; **61**: 82–90.

40 Yang R, Zhang M, Xue Y, Yang R, Tang M, Dang R. Effects of maternal deprivation stress and maternal dietary of n-3 polyunsaturated fatty acids on the neurobehavioral development of male offspring. *Nutr Neurosci* 2021; **24**: 865–872.

41 van Elst K, Brouwers JF, Merkens JE, Broekhoven MH, Birtoli B, Helms JB *et al.* Chronic dietary changes in n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios cause developmental delay and reduce social interest in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2019; **29**: 16–31.

42 Pietropaolo S, Goubran M, Joffre C, Aubert A, Lemaire-Mayo V, Crusio WE *et al.* Dietary supplementation of omega-3 fatty acids rescues fragile X phenotypes in Fmr1-Ko mice. *Psychoneuroendocrinology* 2014; **49**: 119–129.

43 Fortunato JJ, da Rosa N, Martins Laurentino AO, Goulart M, Michalak C, Borges LP *et al.* Effects of ω-3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccarides. *Nutrition* 2017; **35**: 119–127.

44 Rockett BD, Harris M, Raza Shaikh S. High dose of an n-3 polyunsaturated fatty acid diet

lowers activity of C57BL/6 mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012; **86**: 137–140.

45 Wu Y-Q, Dang R-L, Tang M-M, Cai H-L, Li H-D, Liao D-H *et al.* Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Alleviates Doxorubicin-Induced Depressive-Like Behaviors and Neurotoxicity in Rats: Involvement of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Nutrients* 2016; **8**: 243.

46 Mosconi MW, Mohanty S, Greene RK, Cook EH, Vaillancourt DE, Sweeney JA. Feedforward and Feedback Motor Control Abnormalities Implicate Cerebellar Dysfunctions in Autism Spectrum Disorder. *J Neurosci* 2015; **35**: 2015–2025.

47 Giltay EJ, Gooren LJG, Toorians AWFT, Katan MB, Zock PL. Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. *Am J Clin Nutr* 2004; **80**: 1167–1174.

48 D'Mello AM, Stoodley CJ. Cerebro-cerebellar circuits in autism spectrum disorder. *Front Neurosci* 2015; **9**. doi:10.3389/fnins.2015.00408.

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

50 Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 2005; **23**: 183–187.

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

52 Ellegood J, Pacey LK, Hampson DR, Lerch JP, Henkelman RM. Anatomical phenotyping in a mouse model of fragile X syndrome with magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2010; **53**: 1023–1029.

53 Moranis A, Delpech J-C, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Guesnet P, Lavialle M *et al.* Long

term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working memory disruption and brain cytokine expression in aged mice. *Brain Behav Immun* 2012; **26**: 721–731.

54 Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 2002; **61**: 345–358.

55 Wainwright PE, Xing HC, Mutsaers L, McCutcheon D, Kyle D. Arachidonic acid offsets the effects on mouse brain and behavior of a diet with a low (n-6):(n-3) ratio and very high levels of docosahexaenoic acid. *J Nutr* 1997; **127**: 184–193.

56 Palacios-Pelaez R, Lukiw WJ, Bazan NG. Omega-3 essential fatty acids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease. *Mol Neurobiol* 2010; **41**: 367–374.

57 de Theije CGM, Wu J, da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM *et al.* Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol* 2011; **668 Suppl 1**: S70-80.

58 Bolte ER. Autism and Clostridium tetani. *Med Hypotheses* 1998; **51**: 133–144.

59 Lim JS, Lim MY, Choi Y, Ko G. Modeling environmental risk factors of autism in mice induces IBD-related gut microbial dysbiosis and hyperserotonemia. *Mol Brain* 2017; **10**: 14.

60 Kaliannan K, Wang B, Li X-Y, Kim K-J, Kang JX. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep* 2015; **5**: 11276.

61 Weaver ICG, Meaney MJ, Szyf M. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 3480–3485.

62 Lucchina L, Carola V, Pitossi F, Depino AM. Evaluating the interaction between early postnatal inflammation and maternal care in the programming of adult anxiety and depression-related

behaviors. *Behav Brain Res* 2010; **213**: 56–65.

63 Kazlauskas N, Campolongo M, Lucchina L, Zappala C, Depino AM. Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 2016; **72**: 11–21.

## Legends of Figures and Tables

**Figure 1: Developmental milestones of offspring are delayed by n-3 LCPUFA supplementation. (A)** Righting reflex time at P9 (top), P11 (middle) and P13 (bottom) in both males (left) and females (right). n = 27 (SAL/n-3 bal male), 24 (VPA/n-3 bal male), 34 (SAL/n-3 supp male), 24 (VPA/n-3 supp male), 38 (SAL/n-3 bal female), 25 (VPA/n-3 bal female), 26 (SAL/n-3 supp female) and 24 (VPA/n-3 supp female) mice. **(B)** Eye opening score from P12 to P16 in both males (left) and females (right). n = 29 (SAL/n-3 bal male), 27 (VPA/n-3 bal male), 36 (SAL/n-3 supp male), 26 (VPA/n-3 supp male), 39 (SAL/n-3 bal female), 28 (VPA/n-3 bal female), 27 (SAL/n-3 supp female) and 26 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are expressed as mean ± SEM and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p$< .05, **$p$ < .01, ***$p$ < .001.

**Figure 2: Offspring social, and grooming behavior are not altered by VPA following n-3 balanced and n-3 LCPUFA supplemented diets while rearing behavior is affected by a n-3 LCPUFA supplementation. (A)** Phase II from the 3-CT in both males (left) and females (right females). n = 27 (SAL/n-3 bal male), 25 (VPA/n-3 bal male), 35 (SAL/n-3 supp male), 25 (VPA/n-3 supp male), 39 (SAL/n-3 bal female), 27 (VPA/n-3 bal female), 27 (SAL/n-3 supp female) and 26 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are expressed as mean ± SEM and were analyzed through a three-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p$< .05, **$p$ < .01, ***$p$ < .001. SC: social chamber, NSC: non-social chamber. **(B)** Number of grooming episodes and cumulative grooming duration in both males (left) and females (right). **(C)** Number of rearing episodes and cumulative rearing duration in both males (left) and females (right). n = 28 (SAL/n-3 bal male), 27 (VPA/n-3 bal male), 35 (SAL/n-3 supp male), 24 (VPA/n-3 supp male), 37 (SAL/n-3 bal female), 27 (VPA/n-3 bal female), 26 (SAL/n-3 supp female) and 26 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are expressed as mean ± SEM and were analyzed through a three-way ANOVA for 3-CT or two-way ANOVA for grooming and rearing behavior, followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p$< .05, **$p$ < .01, ***$p$ < .001.

**Figure 3: Offspring gait analysis exhibited sex differences in relation with diet**. **(A)** Paw width in males. **(B)** Paw length in males. **(C)** Paw area in males. **(D)** Stride length in males. **(E)** Swing time in males. n = 27 (SAL/n-3 bal male), 26 (VPA/n-3 bal male), 36 (SAL/n-3 supp male), 24 (VPA/n-3 supp male) mice. **(F)** Fore and Hindlimbs Base of Support in females. n=39 (SAL/n-3 bal female), 28 (VPA/n-3 bal female), 27 (SAL/n-3 supp female), 26 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are

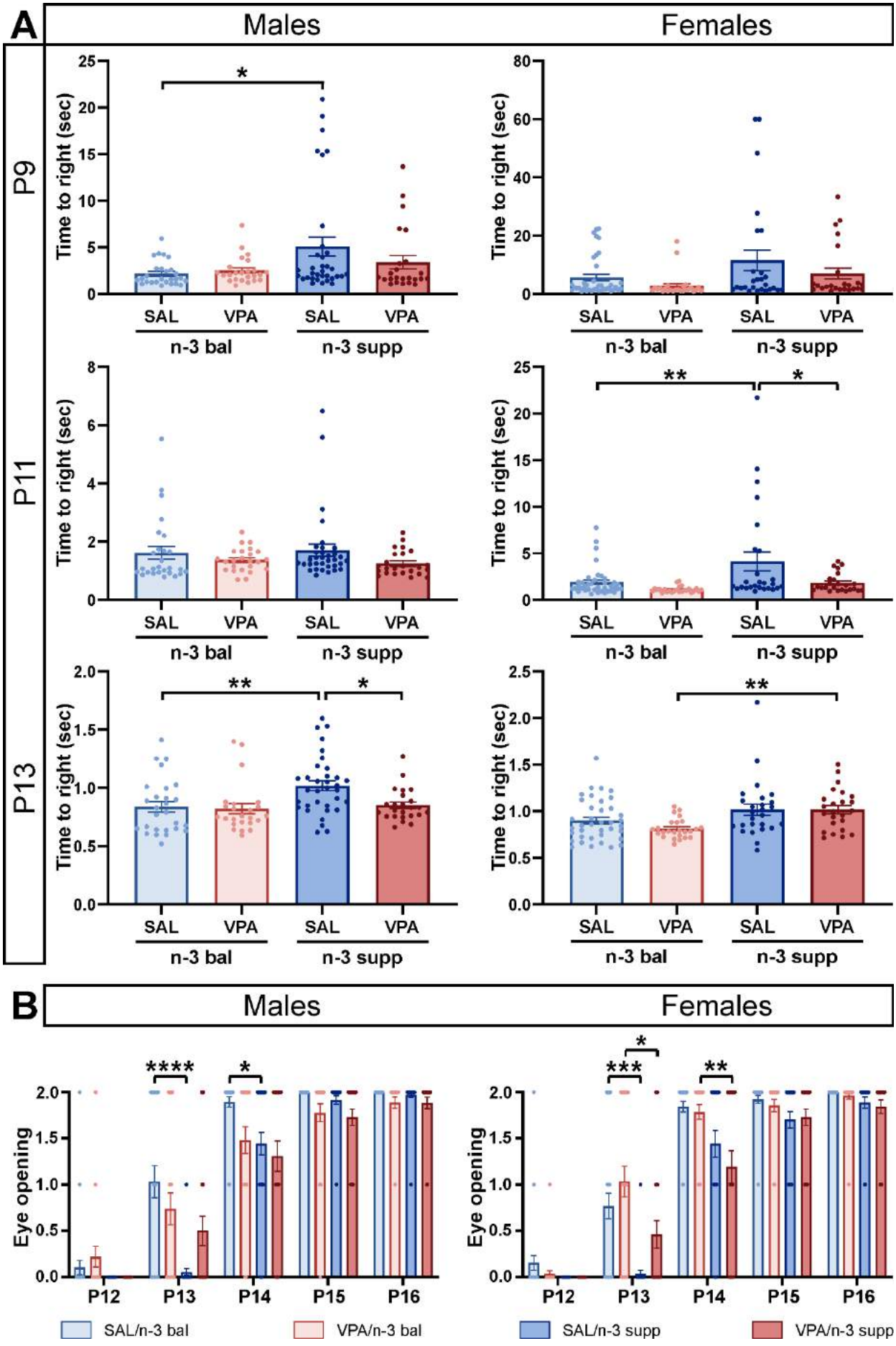
expressed as mean ± SEM and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.

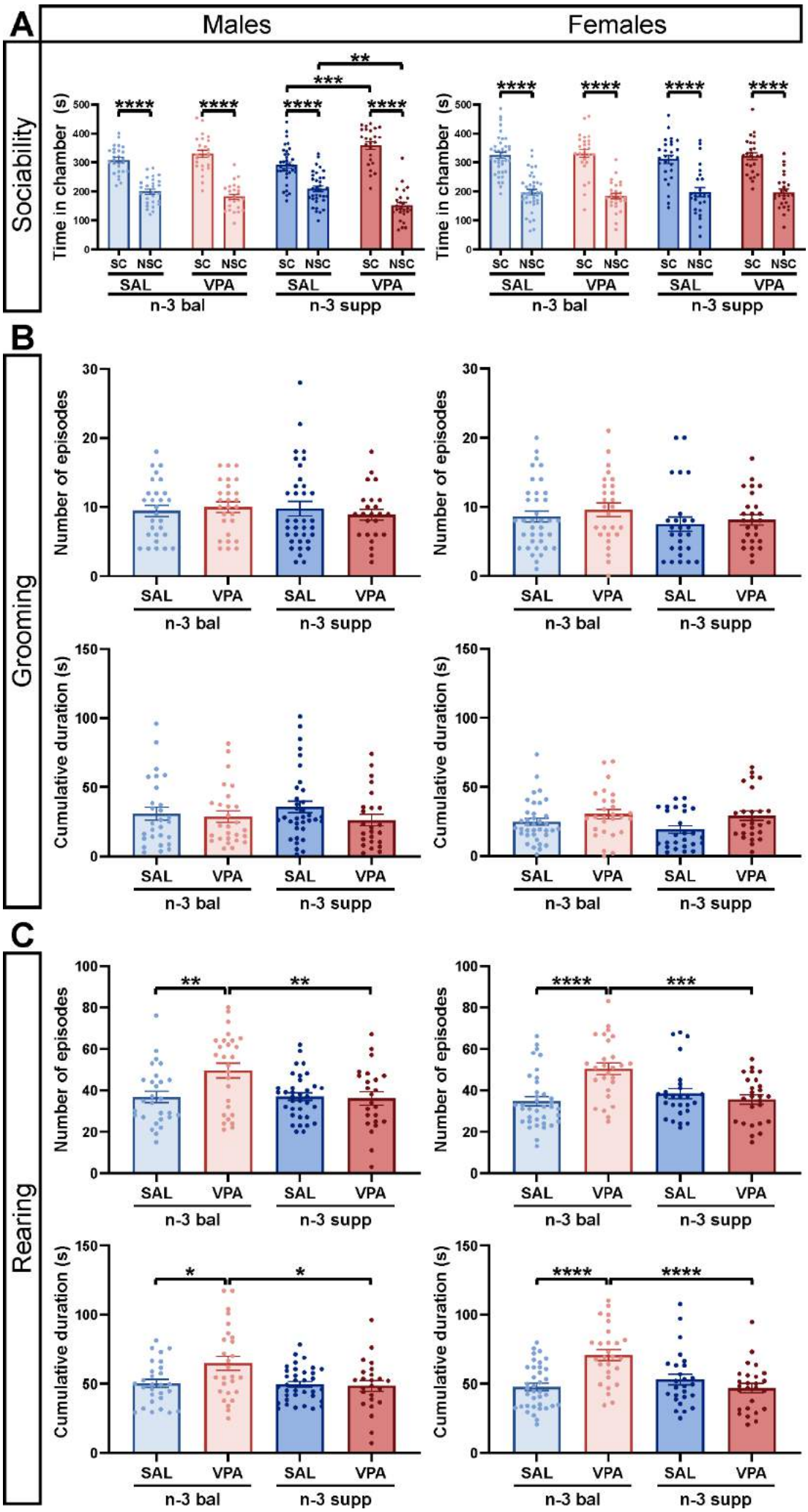
**Figure 4: n-3 and n-6 LCPUFA profiles are modified in the liver, but not in the cerebellum, in relation with diet.** Liver DHA and AA levels (top) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group except 4 on SAL/n-3 supp male AA levels. Cerebellum DHA and AA levels (bottom) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group except 4 on SAL/n-3 bal male and VPA/n-3 supp female AA levels. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.

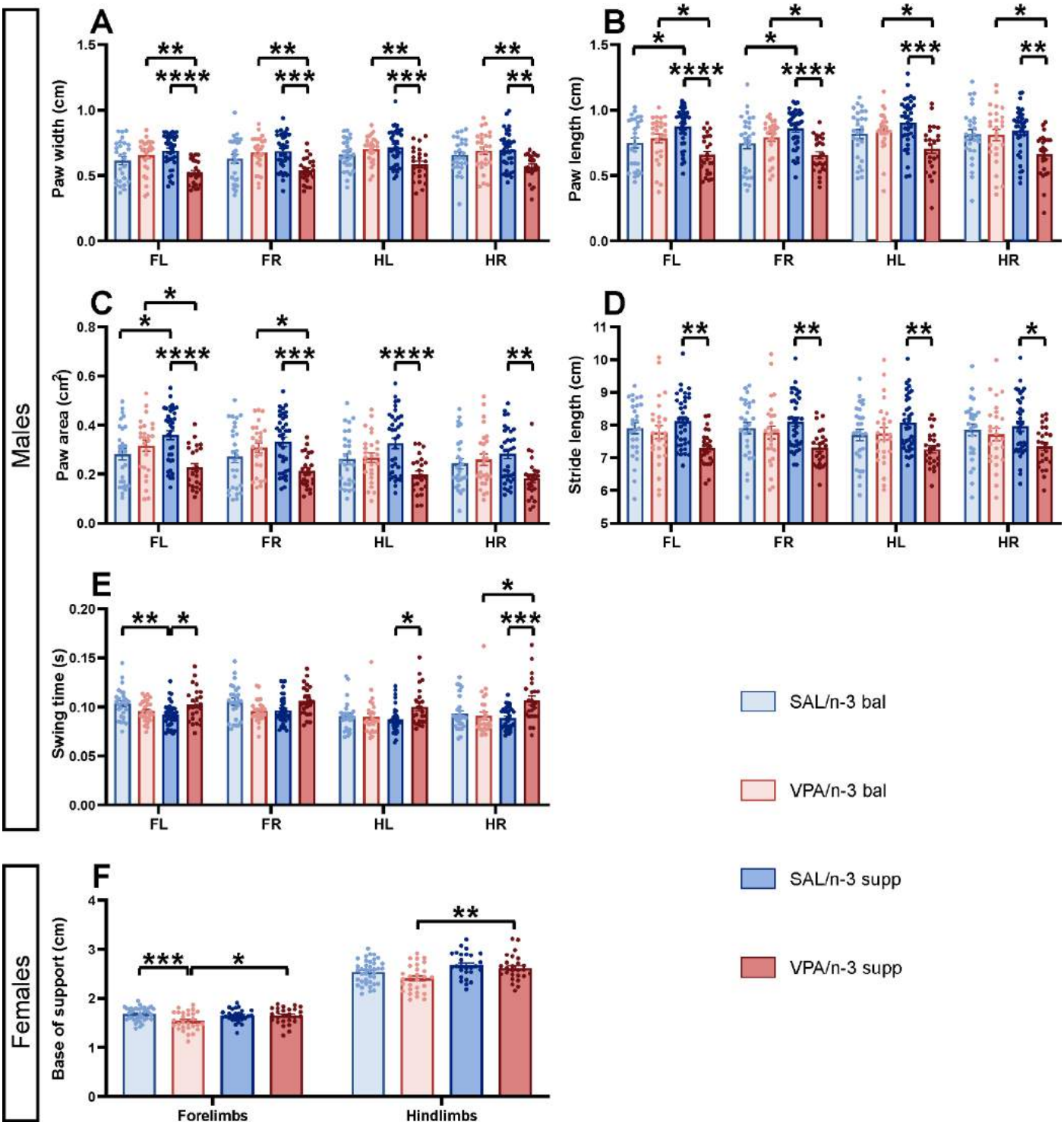
**Figure 5: Moderate to no alteration in inflammatory markers in relation with diet and treatment.** TNF-alpha cerebellar levels (top) in both males and females. n = 5 (SAL/n-3 bal male), 5 (VPA/n-3 bal male), 4 (SAL/n-3 supp male), 4 (VPA/n-3 supp male), 4 (SAL/n-3 bal female), 5 (VPA/n-3 bal female), 5 (SAL/n-3 supp female) and 5 (VPA/n-3 supp female) mice. TGF-beta cerebellar levels (middle) in both males and females. n = 5 (SAL/n-3 bal male), 5 (VPA/n-3 bal male), 5 (SAL/n-3 supp male), 4 (VPA/n-3 supp male), 5 (SAL/n-3 bal female), 5 (VPA/n-3 bal female), 5 (SAL/n-3 supp female), 4 (VPA/n-3 supp female) mice. ARG cerebellar levels (bottom) in both males and females. n = 5 (SAL/n-3 bal male), 5 (VPA/n-3 bal male), 5 (SAL/n-3 supp male), 4 (VPA/n-3 supp male), 5 (SAL/n-3 bal female), 5 (VPA/n-3 bal female), 5 (SAL/n-3 supp female), 4 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.

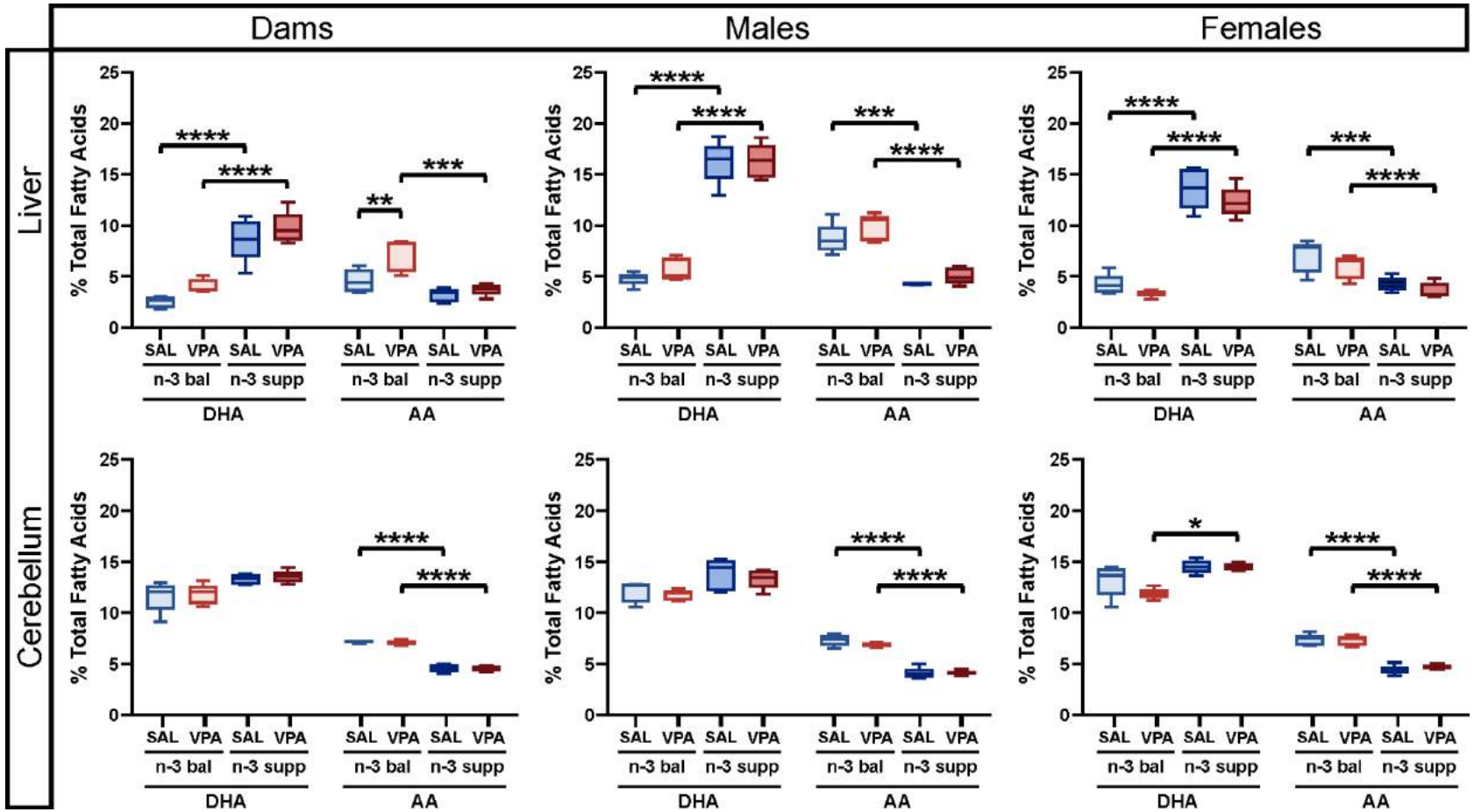
**Figure 6: VPA does not alter offspring microbiota inter- and intra-diversity nor offspring microbiota relative abundance under both n-3 balanced and n-3 LCPUFA supplemented diets.** Microbial diversity: **(A)** Chao1 index (first line) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group. **(B)** Bray-Curtis index (third line) in dams (leftl), offspring males (center) and females (right). n = 10 (SAL/n-3 bal dam), 25 (VPA/n-3 bal dam), 25 (SAL/n-3 supp dam), 25 (VPA/n-3 supp dam), 10 (SAL/n-3 bal male), 25 (VPA/n-3 bal male), 20 (SAL/n-3 supp male), 25 (VPA/n-3 supp male), 10 (SAL/n-3 bal female), 25 (VPA/n-3 bal female), 25 (SAL/n-3 supp female) and 25 (VPA/n-3 supp female) mice. **(C)** Phyla abundance: Bacteroidetes abundance (first line) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group except 4

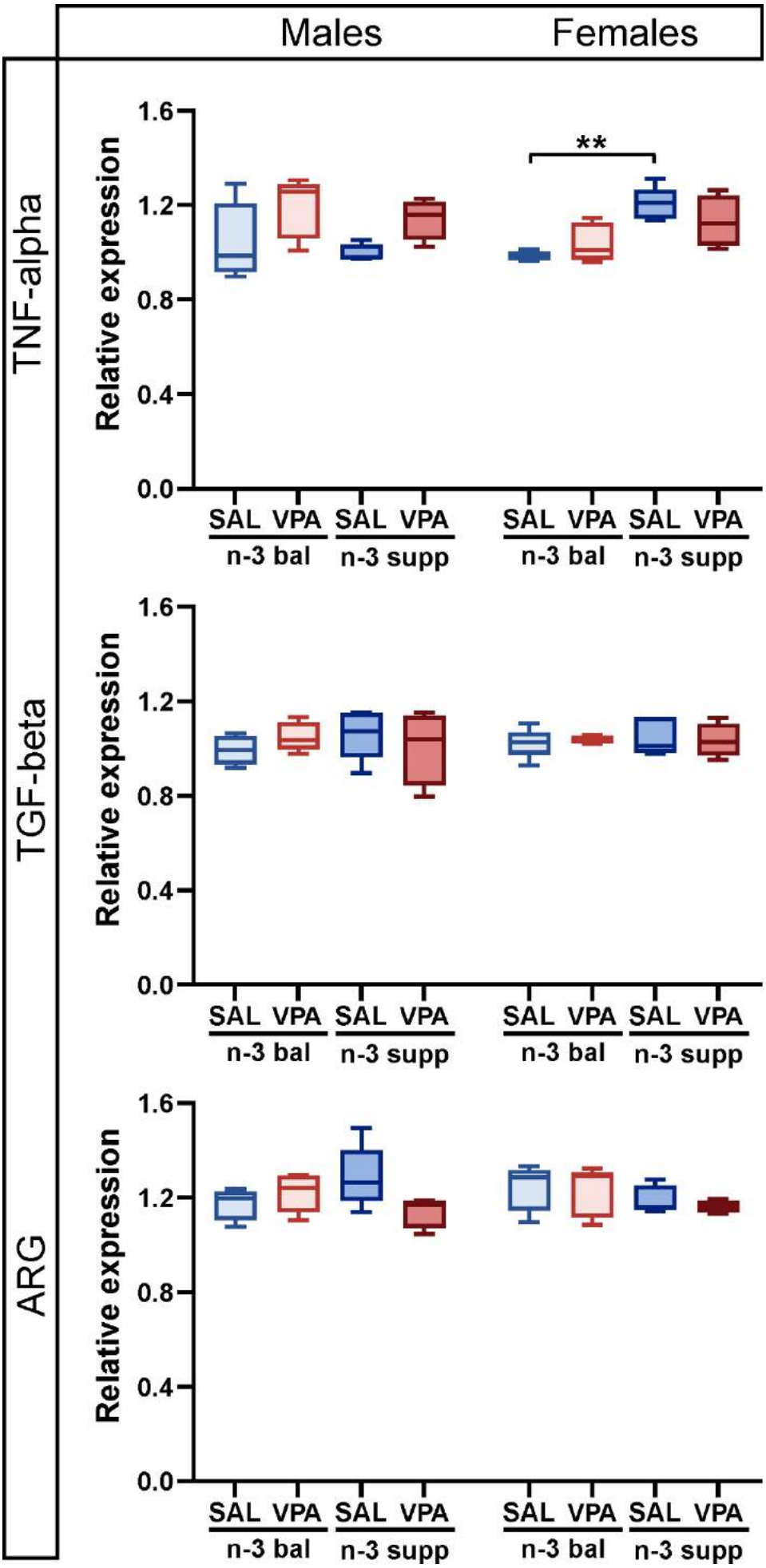
in SAL/n-3 supp and VPA/n-3 supp male. Firmicutes abundance (second line) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group except 4 in SAL/n-3 supp male and SAL/n-3 bal female. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.

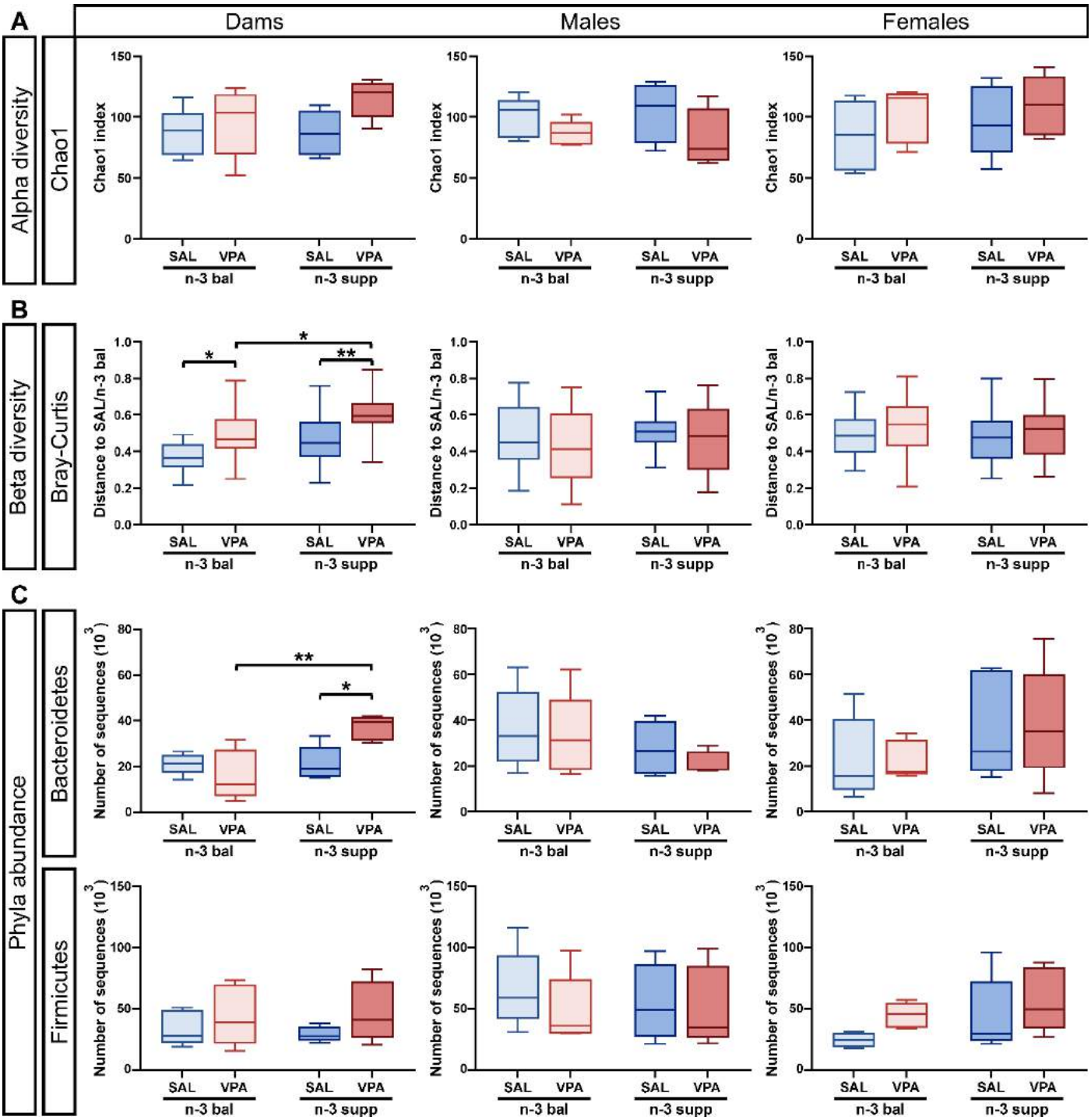

A
Males
Females
P9
P11
P13
Time to right (sec)
SAL
VPA
n-3 bal
n-3 supp
B
Eye opening
P12
P13
P14
P15
P16
SAL/n-3 bal
VPA/n-3 bal
SAL/n-3 supp
VPA/n-3 supp


A
Males
Females
Sociability
Time in chamber (s)
SC
NSC
SAL
VPA
n-3 bal
n-3 supp
B
Grooming
Number of episodes
Cumulative duration (s)
C
Rearing


Males
Females
A
Paw width (cm)
B
Paw length (cm)
C
Paw area (cm²)
D
Stride length (cm)
E
Swing time (s)
F
Base of support (cm)
FL
FR
HL
HR
Forelimbs
Hindlimbs
SAL/n-3 bal
VPA/n-3 bal
SAL/n-3 supp
VPA/n-3 supp

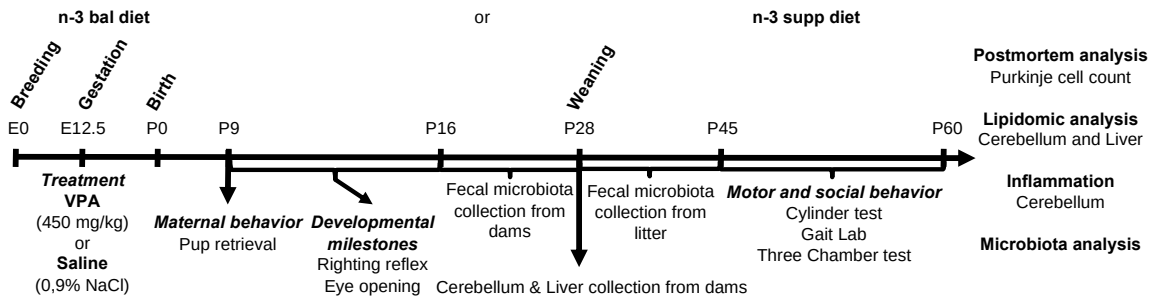

Dams
Males
Females
Liver
Cerebellum
% Total Fatty Acids
SAL VPA SAL VPA
n-3 bal n-3 supp
DHA
AA
****
***
**
*


Males
Females
TNF-alpha
TGF-beta
ARG
Relative expression
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
**
SAL VPA SAL VPA SAL VPA SAL VPA
n-3 bal n-3 supp n-3 bal n-3 supp

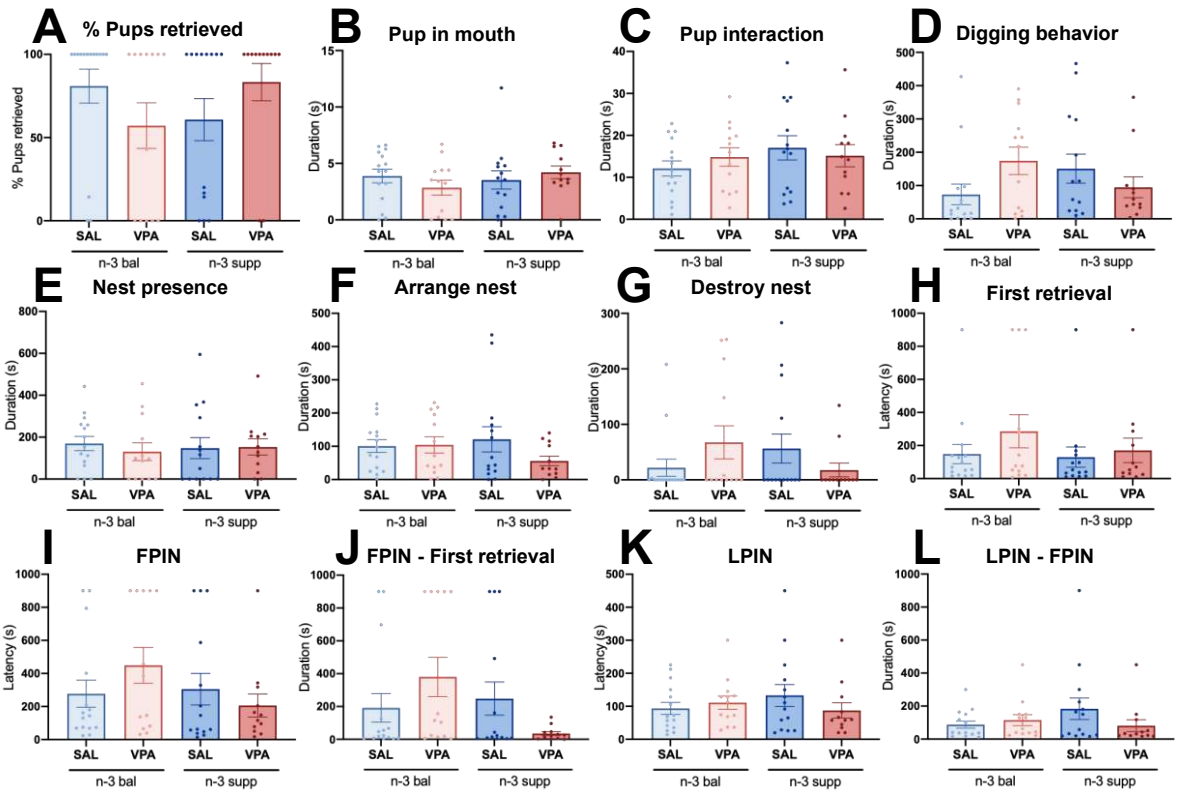

A
Dams
Males
Females
Alpha diversity
Chao1
Chao1 index
SAL
VPA
n-3 bal
n-3 supp
B
Beta diversity
Bray-Curtis
Distance to SAL/n-3 bal
C
Phyla abundance
Bacteroidetes
Firmicutes
Number of sequences (10^3)

**Supplementary Table I: Fatty acid composition of the dietary lipids (% weight of total fatty acids).** FAs: fatty acids; LA: linoleic acid; AA: arachidonic acid; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; ALA: alpha-linolenic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DPA: docosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid.

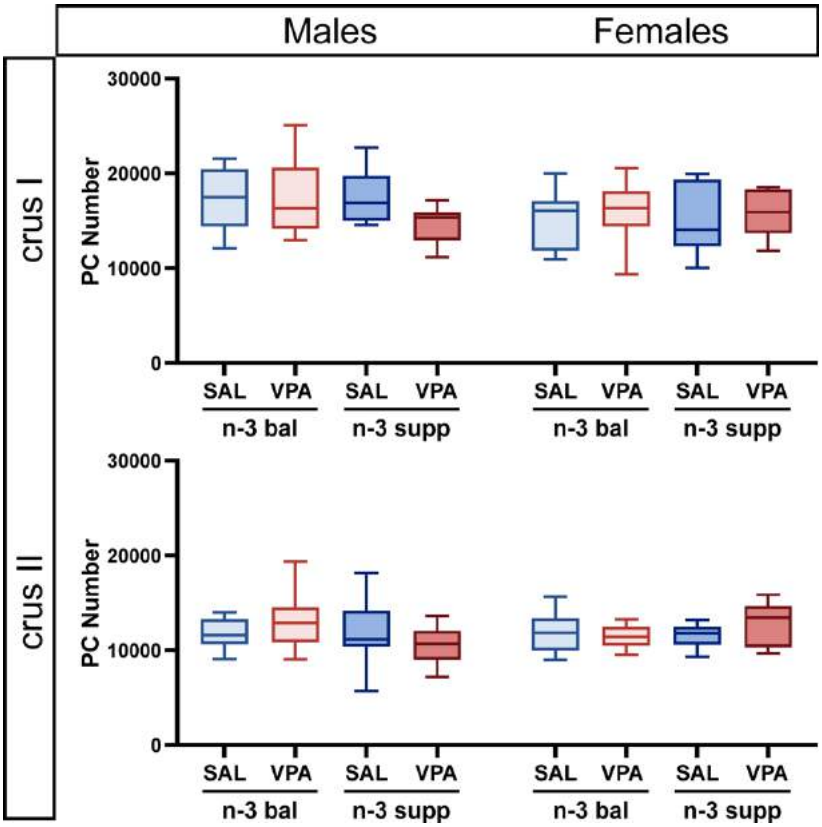
| Diets | n-3 bal | n-3 supp |
|---|---|---|
| 16:0 | 17.8 | 8.1 |
| 18:0 | 4.5 | 2.1 |
| other saturated FAs | 0.8 | 3.7 |
| total saturated FAs | **23.1** | **13.9** |
| 18:1n-9 | 26.7 | 13 |
| other monounsaturated FAs | 0.8 | 5.1 |
| total monounsaturated FAs | **27.5** | **18.1** |
| 18:2 n-6 (LA) | 9.2 | 9.2 |
| 20:4 n-6 (AA) | 0.3 | 0.6 |
| Other n-6 PUFAs | 0 | 0.6 |
| total n-6 PUFAs | **9.5** | **10.4** |
| 18:3 n-3 (ALA) | 1.5 | 1.5 |
| 20:5 n-3 (EPA) | 0 | 6.7 |
| 22:5 n-3 (DPA) | 0 | 0.6 |
| 22:6 n-3 (DHA) | 0 | 4.5 |
| Other n-3 PUFAs | 0 | 1.3 |
| total n-3 PUFAs | **1.5** | **14.6** |
| total PUFAs | **11** | **25** |



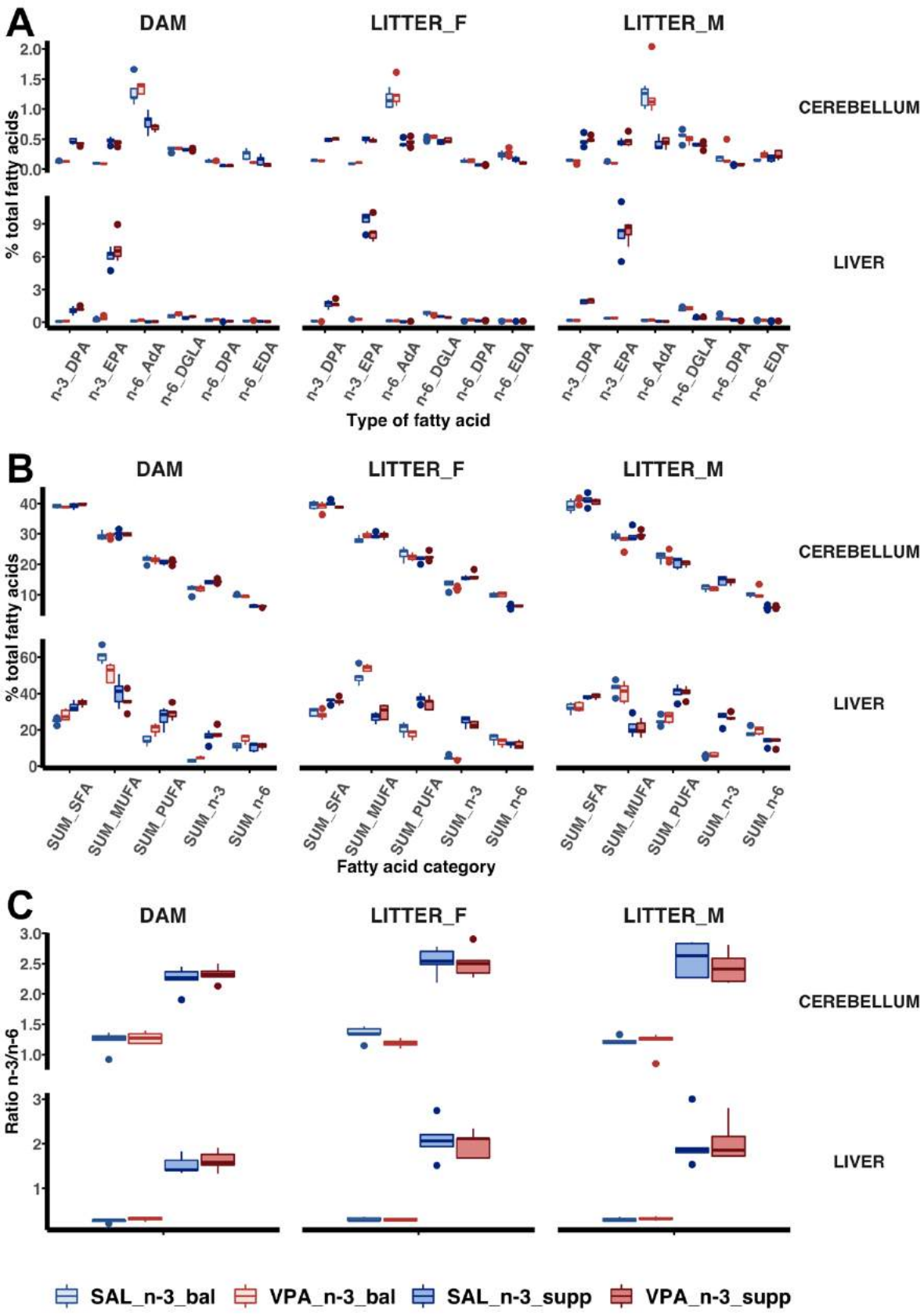

**Supplementary Figure 1: Experimental timeline and procedures.** C57BL/6J pregnant female mice were fed with a diet enriched with n-3 LCPUFA or with a diet deficient in n-3 LCPUFA from the first gestational day (E0) until weaning of their litter. They received a single intraperitoneal injection of either VPA (450mg/kg) or NaCl 0.9% at gestational day E12.5. Fecal samples were collected both from dams at P15, P20 and P22 and offspring after weaning at P36, P41 and P43. Behavioral investigations on offspring were performed between P9 and P16 (juveniles) and then from P45 to P60 (young adults). This was followed by post-mortem analysis of PC number within the crus I and II cerebellar regions and cerebellar inflammation markers, and for both dams and offspring fatty acid profile in liver and cerebellum and microbiota composition were investigated.



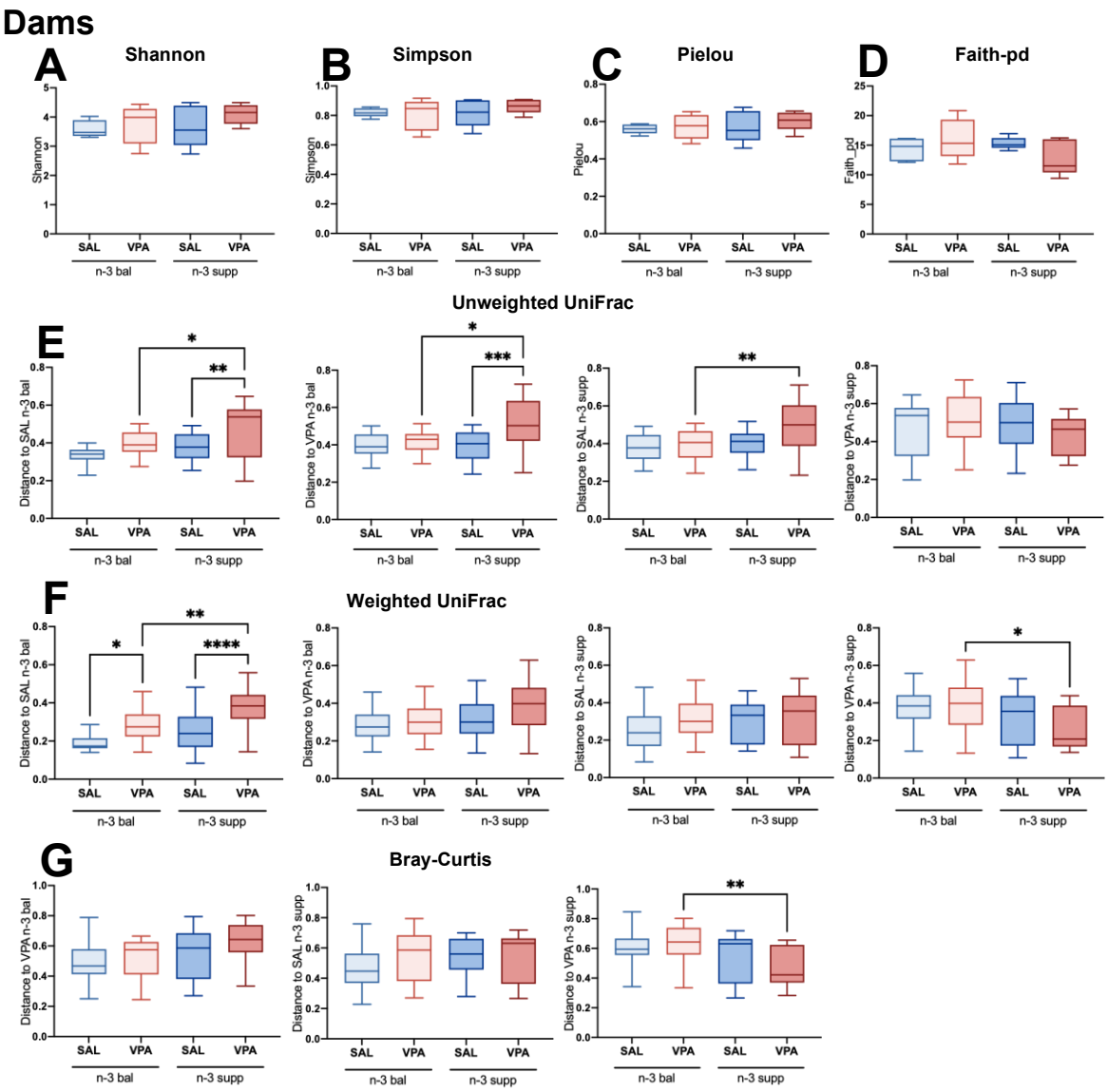

**Supplementary Figure 2: Maternal behavior is not affected by VPA treatment or diet.** Several parameters were analyzed during the pup retrieval test at P9: **(A)** percentage of pups retrieved, **(B)** time spent with a pup in mouth, **(C)** time spent interacting with pups (i.e. sniffing, touching), **(D)** time spent digging, **(E)** duration of nest presence, **(F)** time spent arranging nest, **(G)** time spent destroying nest, **(H)** latency to first retrieval (pup in mouth), **(I)** latency to first pup in nest (FPIN), **(J)** time spent for the dam from taking the first pup in the mouth to putting it in the nest, **(K)** latency to last pup in nest (LPIN), **(L)** time spent for the dam to retrieve all pups (LPIN-FPIN). n = 15 (SAL/n-3 bal), 13 (VPA/n-3 bal), 14 (SAL/n-3 supp), 12 (VPA/n-3 supp) mice. Data are expressed as mean ± SEM and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.



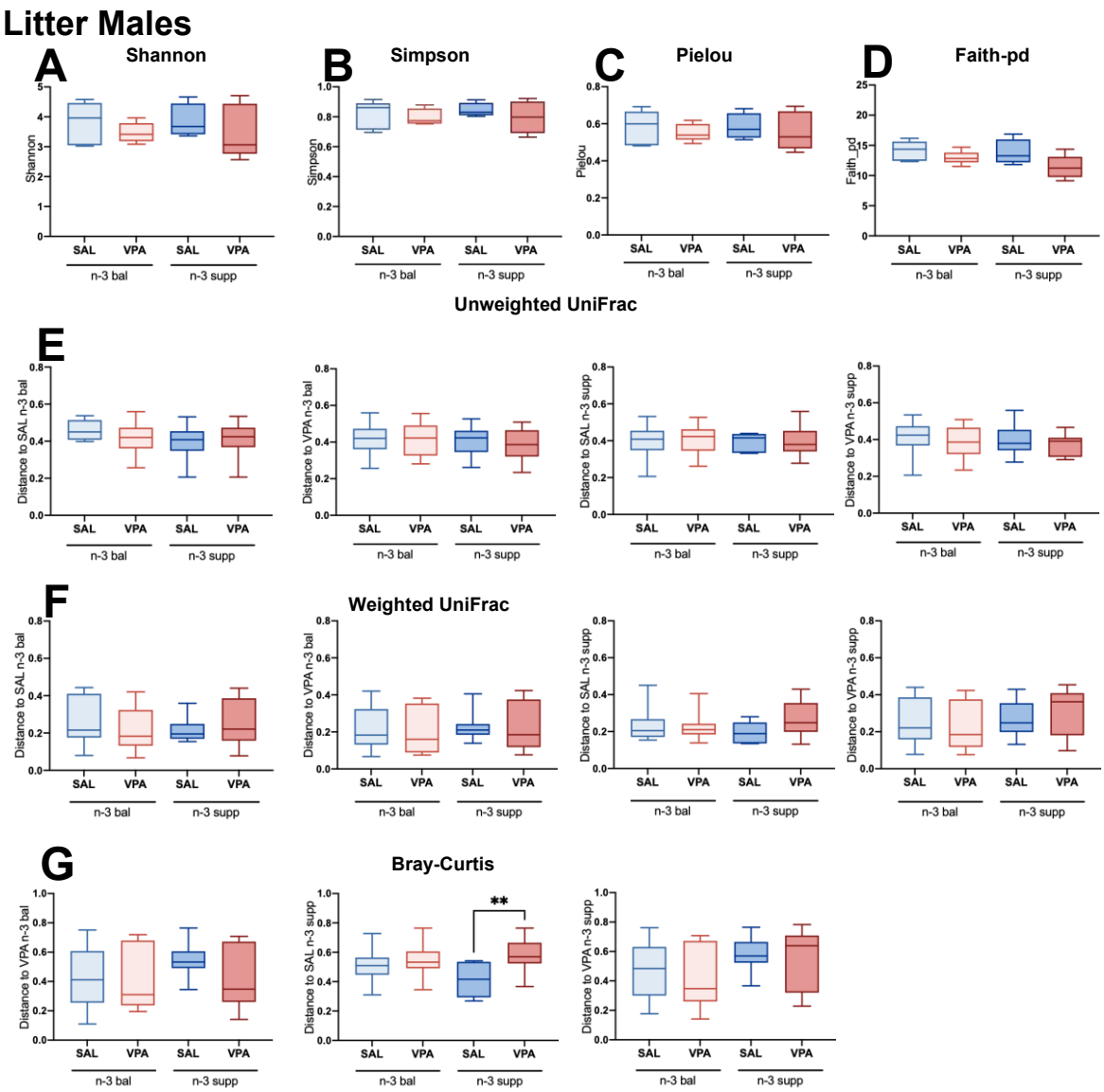

**Supplementary Figure 3: VPA does not alter Purkinje cell number in both n-3 balanced and n-3 LCPUFA supplemented diets.** PC number in crus I (top) in both males (left) and females (right). n = 11 (SAL/n-3 bal male), 10 (VPA/n-3 bal male), 11 (SAL/n-3 supp male), 9 (VPA/n-3 supp male), 13 (SAL/n-3 bal female), 11 (VPA/n-3 bal female), 7 (SAL/n-3 supp female) and 9 (VPA/n-3 supp female) mice. PC number in crus II (bottom) in both males (left) and females (right). n = 11 (SAL/n-3 bal male), 10 (VPA/n-3 bal male), 12 (SAL/n-3 supp male), 10 (VPA/n-3 supp male), 12 (SAL/n-3 bal female), 11 (VPA/n-3 bal female), 9 (SAL/n-3 supp female) and 9 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.


A
DAM
LITTER_F
LITTER_M
CEREBELLUM
LIVER
% total fatty acids
n-3_DPA
n-3_EPA
n-6_AdA
n-6_DGLA
n-6_DPA
n-6_EDA
Type of fatty acid
B
SUM_SFA
SUM_MUFA
SUM_PUFA
SUM_n-3
SUM_n-6
Fatty acid category
C
Ratio n-3/n-6
SAL_n-3_bal
VPA_n-3_bal
SAL_n-3_supp
VPA_n-3_supp

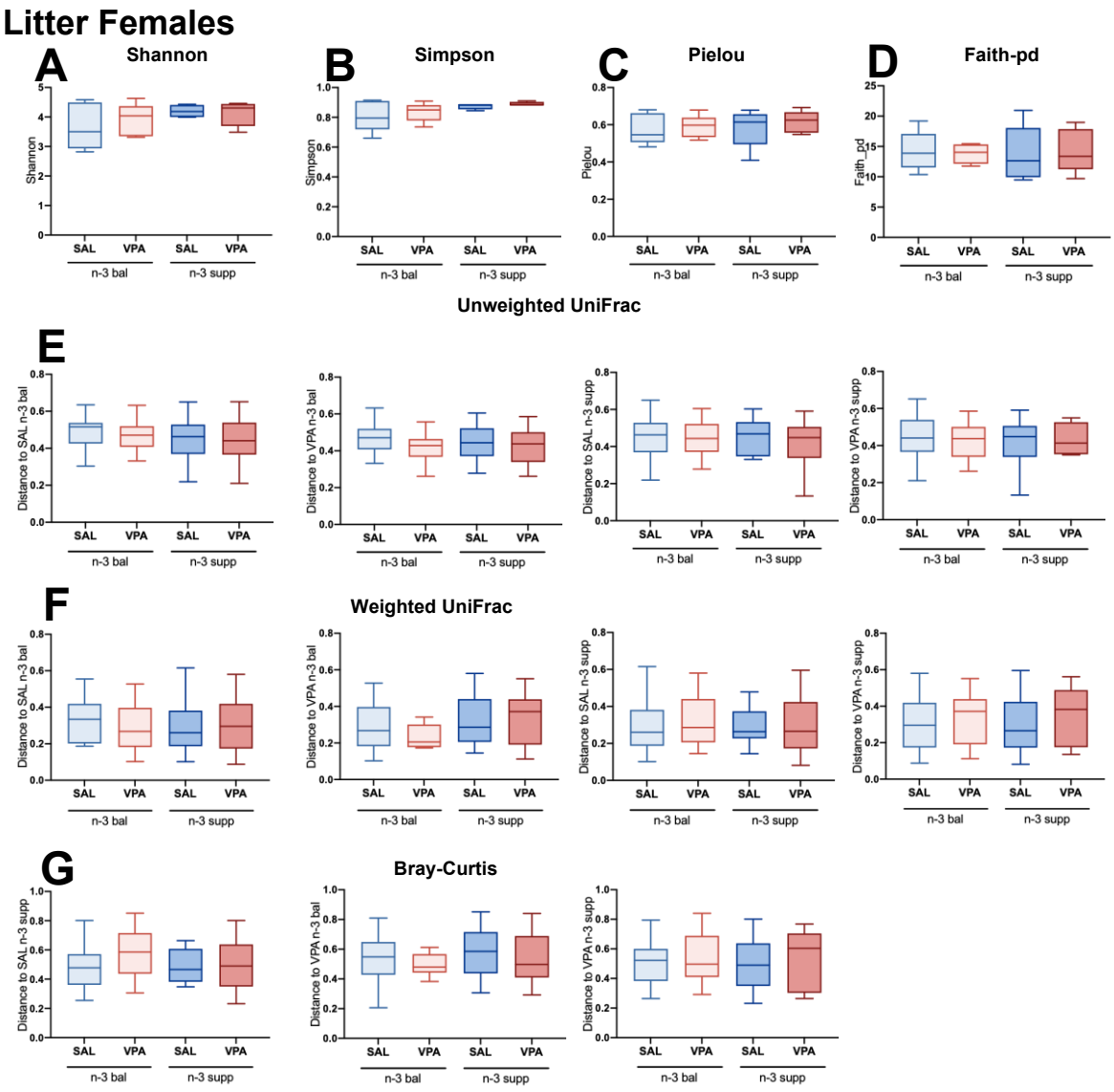
**Supplementary Figure 4: Fatty acid composition is different in relation with diet, but not treatment. (A)** Different types of fatty acids in the cerebellum and the liver of dams, male and female offspring. **(B)** Different categories of fatty acids in the cerebellum and the liver of dams, male and female offspring. **(C)** n-3/n-6 ratio in the cerebellum and the liver of dams, male and female offspring. n=5 mice per group. DPA: docosapentaenoic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; AdA: adrenic acid; DGLA: dihomo-gamma-linolenic acid; EDA: eicosadienoic acid; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.



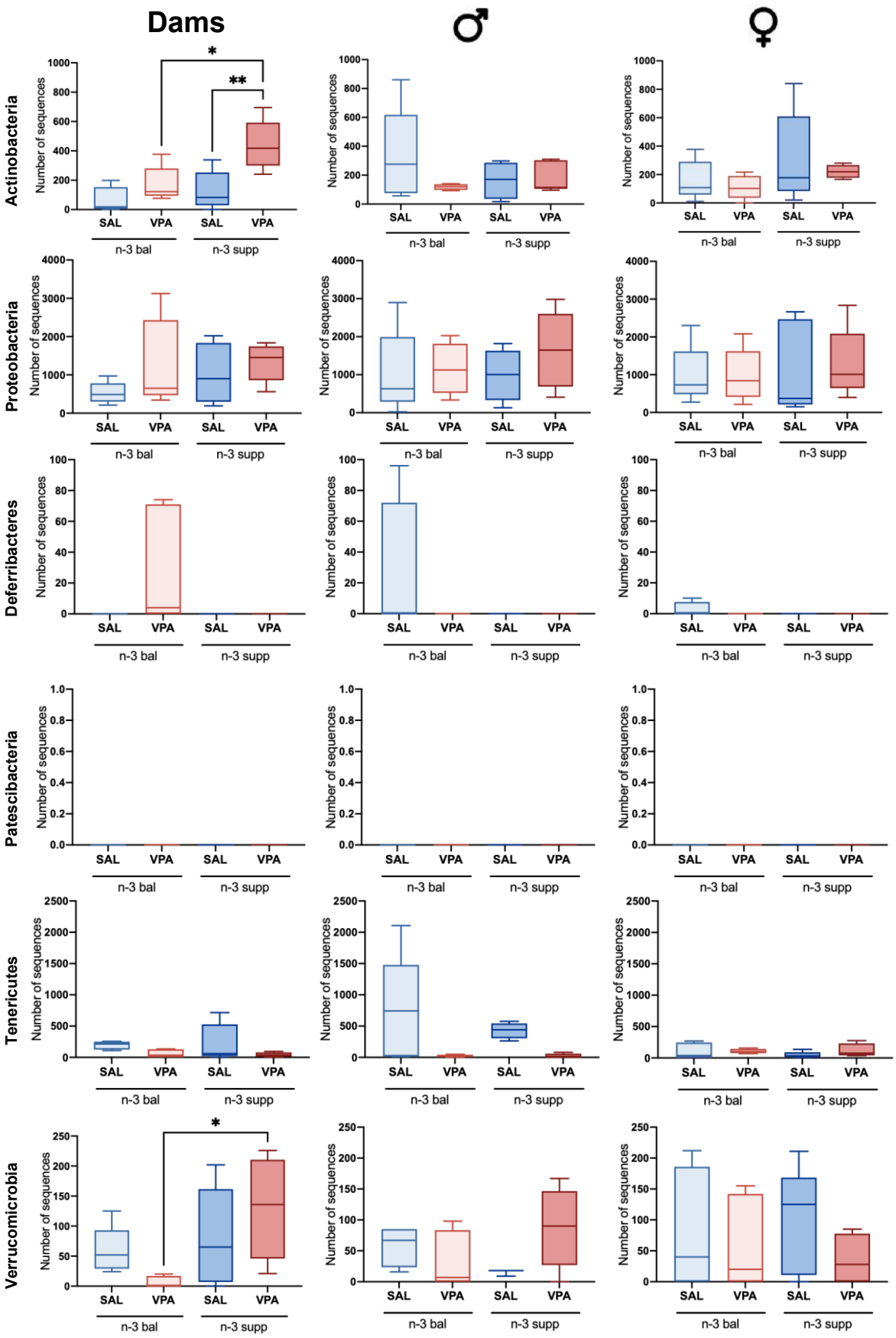

**Supplementary Figure 5: Detailed dam microbiota inter- and intra-diversity indexes. (A-C)** Alpha diversity indexes: **(A)** Shannon, **(B)** Simpson, **(C)** Pielou and **(D)** Faith-pd **(E-G)** Beta-diverstity indexes: **(E)** Unweighted UniFrac, **(F)** Weighted UniFrac and **(G)** Bray-Curtis. n = 5 mice per group. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.




**Supplementary Figure 6: Detailed male offspring microbiota inter- and intra-diversity indexes. (A-C)** Alpha diversity indexes: **(A)** Shannon, **(B)** Simpson, **(C)** Pielou and **(D)** Faith-pd. **(E-G)** Beta-diverstity indexes: **(E)** Unweighted UniFrac, **(F)** Weighted UniFrac and **(G)** Bray-Curtis. n = 5 mice per group. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.




**Supplementary Figure 7: Detailed female offspring microbiota inter- and intra-diversity indexes. (A-C)** Alpha diversity indexes: **(A)** Shannon, **(B)** Simpson, **(C)** Pielou and **(D)** Faith-pd. **(E-G)** Beta-diverstity indexes: **(E)** Unweighted UniFrac, **(F)** Weighted UniFrac and **(G)** Bray-Curtis. n = 5 mice per group. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.


Dams
♂
♀
Actinobacteria
Proteobacteria
Deferribacteres
Patescibacteria
Tenericutes
Verrucomicrobia
Number of sequences
SAL
VPA
n-3 bal
n-3 supp
*
**

**Supplementary Figure 8: Dam, male and female offspring microbiota relative abundance.** Actinobacteria abundance (first line) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group except 4 in VPA/n-3 bal and SAL/n-3 supp male and VPA/n-3 supp female. Proteobacteria abundance (second line) in dams (left), offspring males (center) and females (right). n = 5 mice per group except 4 in VPA/n-3 bal and SAL/n-3 supp male. Deferribacteres abundance (third line) in dams (top), offspring males (middle) and females (bottom). n = 5 (SAL/n-3 bal dam), 5 (VPA/n-3 bal dam), 5 (SAL/n-3 supp dam), 5 (VPA/n-3 supp dam), 5 (SAL/n-3 bal male), 5 (VPA/n-3 bal male), 4 (SAL/n-3 supp male), 5 (VPA/n-3 supp male), 4 (SAL/n-3 bal female), 5 (VPA/n-3 bal female), 4 (SAL/n-3 supp female) and 4 (VPA/n-3 supp female) mice. Patescibacteria abundance (fourth line) in dams (top), offspring males (middle) and females (bottom). n = 4 (SAL/n-3 bal dam), 4 (VPA/n-3 bal dam), 5 (SAL/n-3 supp dam), 5 (VPA/n-3 supp dam), 4 (SAL/n-3 bal male), 5 (VPA/n-3 bal male), 4 (SAL/n-3 supp male), 5 (VPA/n-3 supp male), 5 (SAL/n-3 bal female), 4 (VPA/n-3 bal female), 5 (SAL/n-3 supp female) and 4 (VPA/n-3 supp female) mice. Tenericutes abundance (fitth line) in dams (top), offspring males (middle) and females (bottom). n = 5 (SAL/n-3 bal dam), 5 (VPA/n-3 bal dam), 5 (SAL/n-3 supp dam), 4 (VPA/n-3 supp dam), 5 (SAL/n-3 bal male), 4 (VPA/n-3 bal male), 4 (SAL/n-3 supp male), 4 (VPA/n-3 supp male), 5 (SAL/n-3 bal female), 4 (VPA/n-3 bal female), 5 (SAL/n-3 supp female) and 4 (VPA/n-3 supp female) mice. Verrucomicrobia abundance (sixth line) in dams (top), offspring males (middle) and females (bottom). n = 5 (SAL/n-3 bal dam), 5 (VPA/n-3 bal dam), 5 (SAL/n-3 supp dam), 5 (VPA/n-3 supp dam), 5 (SAL/n-3 bal male), 5 (VPA/n-3 bal male), 3 (SAL/n-3 supp male), 5 (VPA/n-3 supp male), 5 (SAL/n-3 bal female), 5 (VPA/n-3 bal female), 5 (SAL/n-3 supp female) and 4 (VPA/n-3 supp female) mice. Data are expressed as median and min to max and were analyzed through a two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc multiple analysis. *$p < .05$, **$p < .01$, ***$p < .001$.

# CHAPITRE 2 : Age-related behavioral and striatal dysfunctions in Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ mouse model of autism spectrum disorder

## I. Résumé

Au cours de cette thèse, j'ai également participé à d'autres projets portant sur les TSA. J'ai notamment contribué à l'étude comportementale des stéréotypies motrices et de l'activité globale de la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$, un modèle murin génétique de TSA, qui fait l'objet d'un article actuellement soumis. Chez la souris, la plupart des études se sont concentrées sur les aspects développementaux des TSA. Dans cet article sont décrites l'évolution des stéréotypies motrices à l'âge adulte dans le modèle murin de TSA Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$, et leurs altérations striatales sous-jacentes, à 10 semaines, 20 semaines et 40 semaines. Cet article a mis en évidence que les stéréotypies motrices s'aggravaient à 40 semaines, et que cela serait éventuellement lié à des altérations antérieures morphologiques et dans la transmission GABAergique des neurones épineux moyens striataux. Il semblerait que 20 semaines soit une période critique dans la physiopathologie des TSA liée au striatum, et il est suggéré que les altérations des neurones épineux de taille moyenne (MSN) résulteraient davantage de déficiences survenant entre 10 et 20 semaines plutôt que de conséquences directes de problèmes développementaux.

# II. Tiré à part



**Title**

Age-related behavioral and striatal dysfunctions in Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ mouse model of autism spectrum disorder

**Short running title**

Motor and striatal disorders in old autistic mice

**Authors**

Mathieu Thabault[1], Valentine Turpin[1], Éric Balado[1], Cloé Fernandes-Gomes[1], Anne-Lise Huot[2], Anne Cantereau[4], Pierre-Olivier Fernagut[1], Mohamed Jaber[1,3], Laurie Galvan[1*]

**Author affiliations**

1. Université de Poitiers, Inserm, Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Poitiers, France

2. Université de Poitiers, PREBIOS, Poitiers, France

3. Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France

4. Université de Poitiers, IMAGE-UP, Poitiers, France

*** Corresponding author:**

Laurie Galvan

Mail: laurie.galvan@univ-poitiers.fr

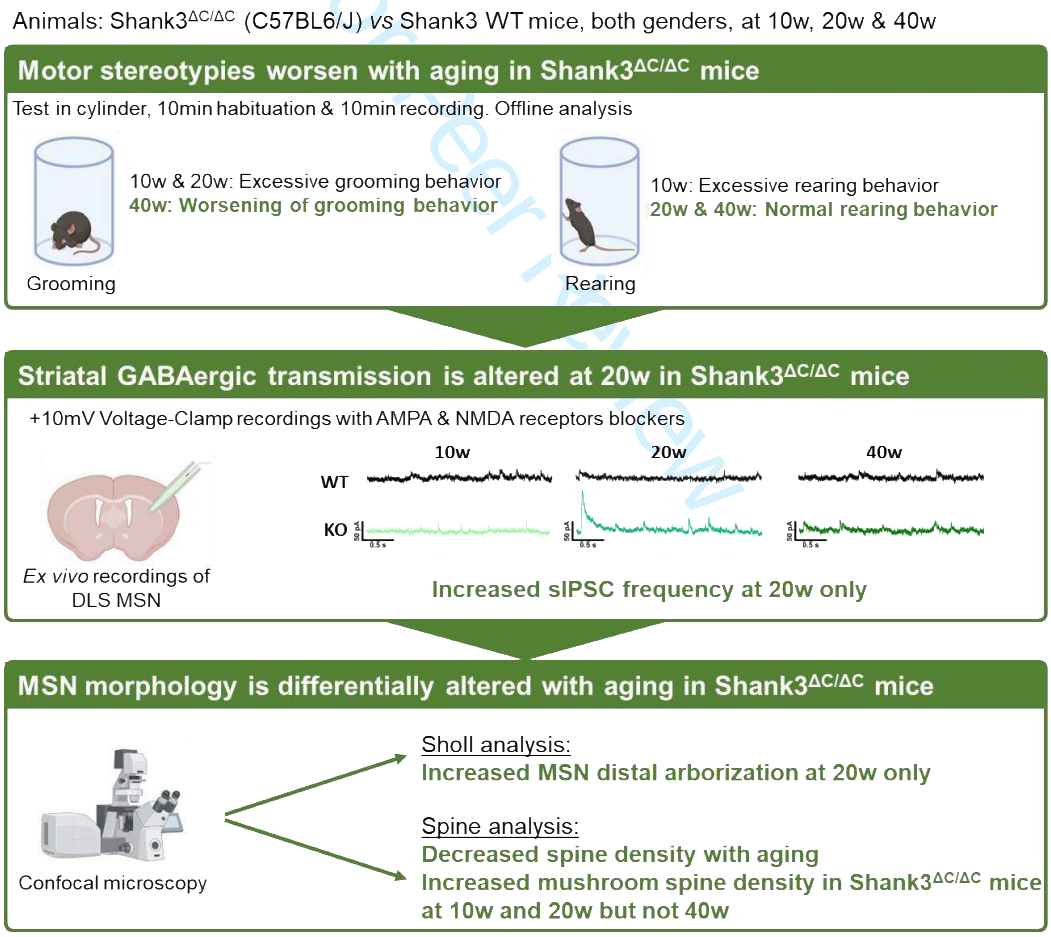
Phone: +33 (0)5 49 36 63 94

For Peer Review

**Acknowledgments**

We thank all the Prebios Animal Facility staff for their help in animal care and the maintenance of the mouse lineage. This work also benefited from the facilities and expertise of ImageUp platform (University of Poitiers). The authors thank Shana Sauzeau and Élisa Audouard for their implication in this project and their help in morphological analysis. We thank our financial supports: the Fondamental Foundation and the CPER-FEDER program of the Région Nouvelle Aquitaine.

**Graphical abstract**




For Peer Review

**Abstract**

Autism spectrum disorders (ASD) are defined as a set of neurodevelopmental disorders and a lifelong condition. In mice, most of the studies focused on the developmental aspects of these diseases. In this paper, we examined the evolution of motor stereotypies through adulthood in the Shank3ΔC/ΔC mouse model of ASD, and their underlying striatal alterations, at 10 weeks, 20 weeks, and 40 weeks. We highlighted that motor stereotypies worsened at 40 weeks possibly carried by earlier striatal medium spiny neurons (MSN) alterations in GABAergic transmission and morphology. Moreover, we report that 20 weeks could be a critical time-point in the striatal-related ASD physiopathology, and we suggest that MSN alterations may not be the direct consequence of developmental issues, but rather be a consequence of other impairments occurring earlier.

For Peer Review

**Lay Summary**

Shank3ΔC/ΔC mice display motor stereotypies, but little is known about their evolution with aging. We investigated motor stereotypies at 10 weeks, 20 weeks, and 40 weeks, as well as their possible underlying striatal dysfunctions. Motor stereotypies are found to be worsened at 40 weeks, but the functional and morphological striatal alterations occur at 20 weeks, which could be a critical time-point in the striatal-related physiopathology.

**Keywords**

ASD, Shank3ΔC/ΔC, Aging, Striatum, MSN

**Main text**

## Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) represent chronic neurodevelopmental disorders characterized by the DSM-V by persistent deficits in communication and social interactions, and restricted repetitive behaviors, interests, or activities (American Psychiatric Association, 2013). Even though motor symptoms are not considered as core symptoms, 88.2% of ASD patients undergo motor disabilities, and the risk factor of developing motor dysfunctions is fold by 22.2 between ASD patients and heathy population (Bhat, 2021). Thus, ASD-related motor disabilities severity seems to be proportionate to ASD core symptoms severity (for review: (Zampella et al., 2021)). As motor stereotypies are at the crossroads of stereotyped and motor behavior, they represent a robust index of ASD symptom severity (Varghese et al., 2017).

Motor networks involve many brain structures, including motor cortex and striatum. Motor cortex has been extensively studied for its implication in motor disturbances in many ASD models (for review: (Li & Pozzo-Miller, 2020)). In Shank3 rodent models of ASD, cortico-striatal pathway has been shown to be altered, notably by impaired function of AMPAR and NMDAR or mGluR5 signaling (Jaramillo et al., 2016; Peça et al., 2011). Even if the striatum plays a central role in sensorimotor coordination, gait, balance, and posture (Lanciego et al., 2012; Obeso et al., 2008), little is known about its involvement in ASD physiopathology. For instance, first evidence of striatal alterations in ASD emerged from two imaging studies, that have revealed that the putamen and caudate nucleus volumes are increased in ASD patients compared to age-matched control subjects (Hollander et al., 2005; Wiegel et al., 2014), with one of them reporting that the right caudate volume correlates with the magnitude of repetitive and stereotyped behaviors (Hollander et al., 2005). These neuroanatomical alterations are also recapitulated in some animal models of ASD with a larger striatum described in Neuroligin3 Knock-In mice (15 weeks), in Cntnap2 Knock-Out (8–9 weeks) and Shank3 Knock-Out mice (22–23 weeks) (for review: (Ellegood & Crawley, 2015)). However, deeper understanding of striatal involvement in ASD symptoms and dysfunctions is needed, as ASD-related striatal data in patients and animal models are sparse (for review: (Thabault et al., 2022)).

Even though ASD have clearly a neurodevelopmental onset, these are lifelong conditions and are carried during adulthood and elderhood (Happé & Charlton, 2011). Life

For Peer Review

expectancy of ASD patients is reduced by nearly 17 years compared to the general population, partially due to their worsening comorbidities regardless of gender and level of functioning (Hirvikoski et al., 2016). Furthermore, aging ASD patients develop more neurological diseases and psychiatric disorders than neurotypical individuals (Hirvikoski et al., 2016; Jokiranta-Olkoniemi et al., 2021). In mice, most studies focus on neurodevelopmental states or juvenile periods (6 and 12 weeks), only a few explored the ASD pathophysiology in mature adults (20 to 30 weeks) (Kouser et al., 2013; Peñagarikano et al., 2011) and none in aged animals. This leaves a gap in knowledge of age-related ASD symptoms and in the evolution of ASD symptoms.

*Shank3* is a gene coding for a synaptic scaffolding protein and several mutations have been linked to ASD cases, making it a high confidence susceptibility ASD gene (SFARI database, https://www.sfari.org/resource/sfari-gene/). The Shank3ΔC/ΔC mouse model correspond to the deletion of exon 21 resulting in the truncation of the C-terminal tail of the protein making it non-functional (Kouser et al., 2013) and leading to the absence of SHANK3 protein in the brain (Matas et al., 2021). Several studies have shown that young adult Shank3+/ΔC and Shank3ΔC/ΔC mice exhibit core symptoms of ASD, such as impaired social recognition and communication, and stereotypies (Bidinosti et al., 2016; Duffney et al., 2015; Kouser et al., 2013; Matas et al., 2021). These mice also display ASD-like behaviors such as inflexibility, fear of novelty, without showing anxiety disorders (Bidinosti et al., 2016; Kouser et al., 2013). Interestingly, Shank3 is highly expressed in the striatum and *Shank3* knock-out (KO) leads to a decrease of striatal post synaptic proteins (SAPAP3, Homer, PSD-95, PSD-93), an increase in neuronal arborization complexity but also, a decrease in the cortico-striatal neurotransmission in 5-6 weeks old mice (Peça et al., 2011). Although an increasing number of alterations in young Shank3 mice are described, how these alterations evolve over time remain unknown. This is highly relevant for the pathophysiology of ASD as the disease is maintained with aging (Noone et al., 2006).

In this study, we investigated repetitive and exploratory motor behavior and striatal dysfunctions in Shank3 KO and control littermate at 10 weeks (10w, young adult), 20 weeks (20w, mature adult) and 40 weeks (40w, aged adult) in both genders.

## Methods

### *Animals*

For Peer Review

All experimental procedures were performed according to the Helsinki declaration and the guidelines of the European Union directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. A local Ethics Committee approved all planned experiments (authorization n° 2018071316534636 & 2022021616096740). All experiments have been performed on both males and females, aged between 10 and 40 weeks, with the Genetically Modified Organism (GMO) authorization #4231 from the French government. Shank3+/ΔC mice with a C-terminal deletion of Shank3 at exon 21 (Shank3tm1.1Pfw/J) were obtained from Jackson laboratories and are on a C57BL/6J genetic background (Jackson Laboratories, USA). Shank3+/ΔC mice were mated to generate mice of all three genotypes: Shank3+/+ (WT), Shank3+/ΔC, and Shank3ΔC/ΔC (KO). Sex and age-matched pups were separated from the dams on postnatal day 28 (P28) and were raised by groups of 3 to 5. Mice were genotyped by PCR using the following primers: common forward 5' GTG TCC CCT CAT TGA TGT TG 3', WT reverse 5' ATG TCC TGT TGCAGG TAG GG 3' and mutant reverse 5' GTC TGC CAC CTT CTG CCT AC 3'. All littermates were hosted with an appropriate dark/light cycle, 12 hours of each and had access to food and water *ad libitum*. Mice from the three genotypes were segregated in three groups: young adult (10 weeks), mature adult (20 weeks) and aged adult (40 weeks).

For Peer Review

*Behavioral analysis*

Mice were acclimated for 10 minutes before filming to transparent Plexiglas cylinders (12cm diameter) with minimal bedding to avoid digging. Each cylinder was separated by opaque sheets to isolate each mouse. Mice were then videotaped using VideoTrack® (ViewPoint™, Lyon, France) and data were analyzed with Solomon Coder© (András Péter, Keele, UK) by experimenters blind to both age and genotype. Grooming and rearing episodes were quantified for both number of episodes and total duration. 100% behavioral output was defined as the sum of total time spent grooming and total time spent rearing in each group.

*Brain slice electrophysiology*

Mice were deeply anesthetized with diluted pentobarbital (120mg/kg, Vetoquinol, Lure, France) and perfused transcardially with a high sucrose slicing solution containing (in mM): 208 sucrose, 10 glucose, 1.25 NaH2PO4*H20 monobasic, 26 NaHCO3, 2.5 KCl, 1.3 MgCl2

and 8 MgSO4 (pH 7.2-7.35, osmolality 290-310 mOsm/L). Mice were then decapitated, and brains were taken out of the skull and immediately placed in oxygenated (95%/5% O2/CO2) high sucrose slicing solution. Coronal slices (300µm) were cut using a vibratome (Leica VT1200S, Leica camera AG, Wetzlar, Germany) and transferred into an incubating chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 130 NaCl, 10 glucose, 1.25 NaH2PO4*H2O monobasic, 26 NaHCO3, 3 KCl, 2 MgCl2 and 2 CaCl2, oxygenated with 95%/5% O2/CO2 (pH 7.2-7.35, osmolality 290-310 mOsm/L). Slices were let to recover in ASCF for 1h at room temperature before recordings.

Medium spiny neurons (MSN) were identified using an upright microscope (Eclipse FN1, Nikon, Tokyo, Japan) at 40x magnification (40x Apochromat, Nikon, Tokyo, Japan) with infrared filter and monochromatic camera with Q-CapturePro® software (QImaging™, Surrey, Canada). Whole-cell patch clamp recordings were performed at room temperature and were obtained using a MultiClamp 700B Amplifier, the Digidata 1440A digitizer and the Clampex acquisition software (pCLAMP, Axon Instruments Inc. Molecular Devices, San José, CA). A maximum of 2 neurons per mouse per group were recorded.

Borosilicate patch pipettes (Harvard Apparatus, Holliston, MA), with resistance from 4 to 6 MΩ were pulled using a micropipette puller system (Flaming/Brown™, Sutter Instrument Company, Novato, CA). Voltage-clamp experiments were performed with pipettes containing a cesium-based internal solution containing (in mM): 8 HEPES, 9 EGTA, 125 Cesium-methanesulfonate, 4 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl2, 10 phosphocreatine-disodium, 0.1 Leupeptin, 5 Mg ATP and 1 GTP Tris (pH 7.2, osmolarity 270-280 mOsm/L). Membrane capacitance, resistance and time constant were measured prior any recording. Inhibitory post-synaptic currents were recorded at +10mV for 4 minutes, in presence of 10µM CNQX and 50µM AP-V (Tocris Bioscience™, Bristol, UK). Finally, 10µM bicuculline (Tocris Bioscience™, Bristol, UK) was added to the flowing ACSF to block GABA-A receptors. Signal were pre-analyzed with Clampfit software (v10.2, Axon Instruments Inc. Molecular Devices, San José, CA) and analyzed with Minianalysis (Synaptosoft Inc., Fort Lee, NJ). Current-clamp recordings were performed using pipettes containing a potassium gluconate-based solution containing (in mM): 112.5 Potassium-D-Gluconate, 10 HEPES, 5 EGTA, 4 NaCl, 17.5 KCl, 0.5 CaCl2, 1 MgCl2, 5 ATP-dipotassium and 1 GTP sodium salt (pH 7.19-7.24, osmolality 270-280 mOsm/L). All internal electrode solutions contained 0.2% biocytin for subsequent detection of recorded cells.

For Peer Review

*Drugs*

For electrophysiological recordings, drugs (Tocris Bioscience™, Bristol, UK) were dissolved in H2O and stock solutions were as following: 50mM D-2-amino-5-phosphonovalerate (AP-V, Ref 0106), 10mM Cyanquixaline (CNQX, Ref 1045) and 20mM Bicuculline Methiodide (Bic, Ref 2503). AP-V was used at a working concentration of 50µM and CNQX and Bic were used at a working concentration of 10µM.

*Neuronal morphology analysis*

All patched slices were incubated in 4% paraformaldehyde (PFA) solution overnight for tissue fixation and transferred in a cryoprotective 20% sucrose solution, prior to use for fluorescence detection of recorded cells. All steps were performed at room temperature, except streptavidin incubation times that was completed at 4°C. Tissue sections were washed twice for 5min using 1X Phosphate Buffer Saline (PBS). 1h bath in 1X PBS + 1% Bovine Serum Albumin (BSA) + 0.2% Triton allowed then to permeabilize the slices and to block non-specific fixation sites. Slices were left to incubate overnight at 4°C with Alexa 488 conjugated streptavidin (1:1000) in blocking solution and covered to avoid photobleaching. Slices were washed with 3 baths of 5min in 1X PBS and then set on glass slides and left to dry. Slides were briefly immersed in toluene and then mounted using DePeX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) prior to storage at 4°C. Images were acquired with the confocal microscope OLYMPUS FV3000 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Germany) and analyzed using IMARIS software suite (IMARIS v9.8.2, Oxford Instruments, Abington, Oxon, UK). Dendritic spines were sorted using specific criteria (See table 1) and analyzed according to the level of dendritic branch to which they are connected.

For Peer Review

*Statistical analysis*

Data in boxplots are expressed as median & min-max and '+' stands for the mean. All other data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistics were performed with Prism® (v9.0.0, GraphPad™ Software Inc., La Jolla, CA) and graphs were made with Prism®. Appropriate statistical tests are mentioned under each figure and results

were considered as significantly different for $p<0.05$. All figures were made with Corel Draw X7® (v17.2.0.688, Corel™ Corporation, Ottawa, Canada).

## Results

*Grooming behavior worsens with aging in Shank3 KO mice at the expense of rearing behavior*

To determine how motor stereotypies evolve with aging, we quantified grooming behavior in both WT and Shank3 KO mice at 10w, 20w and 40w. As we did not find differences between males and females in each group, data from both genders were pooled. The 10w KO mice displayed excessive grooming behavior ($F_{(2,59)} = 10.72$, p=0.0001, Tukey $WT_{10w}$ vs $KO_{10w}$ p=0.0495, Fig 1A) compared to WT littermate. This phenotype was maintained at 20w ($WT_{20w}$ vs $KO_{20w}$ p=0.0224) and worsened at 40w. Indeed, the 40w KO mice drastically displayed more grooming episodes with aging ($KO_{10w}$ vs $KO_{40w}$ p=0.0001, $KO_{20w}$ vs $KO_{40w}$ p<0.0001). Also, the cumulative grooming duration increased at this stage ($F_{(2,59)} = 5.386$, p=0.0071, Tukey $KO_{10w}$ vs $KO_{40w}$ p=0.0035, $KO_{20w}$ vs $KO_{40w}$ p=0.0005). Rearing behavior, reflecting exploratory behavior, was also assessed during this test. As early as 10weeks, the KO mice displayed excessive rearing behavior ($F_{(2,59)} = 12.51$, p<0.0001, Tukey $WT_{10w}$ vs $KO_{10w}$ p=0.0003) compared to WT mice, suggesting that they experienced stress-induced hyperactivity. The rearing behavior was then no longer excessive at 20w, while the grooming behavior was still excessive. Interestingly, the 40w KO mice undergo behavioral changes as they spent significantly more time grooming than rearing ($F_{(1,118)} = 45.04$, p<0.0001, Sidak Grooming *vs* Rearing $KO_{40w}$ p<0.0001).

*The 20 weeks old Shank3 KO MSN displayed neurotransmission changes*

As motor stereotypies and more generally motor behavior are linked with the dorsolateral striatum (DLS), we aimed at recording DLS MSN *ex vivo* to assess whether behavioral modifications with aging were linked to MSN dysfunctions. We first measured MSN intrinsic passive membrane properties (Table 2). Although neither membrane capacitance nor membrane resistance exhibited a difference with aging in both groups, the time constant was decreased in an age-related manner in both groups ($F_{(2,40)} = 8.230$, p=0.0010). However, changes occurred at different stages: in WT mice, the time constant decreased with aging between 10w and 40w (-34.78%, p=0.0213), while in KO mice, it

For Peer Review

decreased between 20w and 40w (-31.82%, p=0.0069) suggesting a difference in the aging process. No modifications in resting membrane potential nor in action potential (AP) parameters (number of AP, amplitude, rheobase, kinetics, threshold, and hyperpolarization duration and amplitude) were observed among groups.

As intrinsic MSN properties and excitability did not show drastic changes, we next explored GABAergic inputs onto the DLS MSN, by recording spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSC) in presence of glutamatergic blockers, an index of striatal GABAergic environment. At 10w, neither of the measured parameters were altered in KO mice compared to WT. Interestingly, at 20w we observed an increase of small amplitude events (10-15pA) (Age-effect: $F_{(10,400)} = 14.76$, $p<0.0001$, Tukey $WT_{20w}$ vs $KO_{20w}$ p=0.0002) and an increase in GABA release probability ($F_{(50,2000)} = 529.8$, $p<0.0001$) in KO mice compared to WT (Figure 2B). The IPSC frequency was significantly increased in KO 20w MSN (U=14, p=0.0268) compared WT MSN suggesting an increase at the presynaptic level. Interestingly, that difference was not observed by 40w, suggesting that 20w could be a critical time for striatal dysfunction implementation in this ASD model.

For Peer Review

*Shank3 KO MSN morphology is altered in aged animals*

To understand whether the observed neurotransmission dysfunctions were linked to neuronal morphological changes, we assessed MSN dendritic arborization using Sholl analysis (Figure 3). Their distal arborization was significantly denser in KO mice than in WT mice at 20w only ($F_{(12,324)} = 69.59$, $p<0.0001$), at 110µm (p=0.0146), 120µm (p=0.0173), 130µm (p=0.0154) and 140µm (p=0.0138), suggesting that morphological adaptative mechanisms could occur at this stage.

As MSN receive the main part of their inputs onto dendritic spines, we next examined the dendritic spine density on third, fourth and fifth level dendrites (Figure 4A), highlighting effects of age for each of them (Level 3 $F_{(2,193)} = 14.86$, $p<0.0001$, Tukey $WT_{10w}$ vs $WT_{20w}$ p=0.0029, $KO_{10w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$, $KO_{20w}$ vs $KO_{40w}$ p=0.0206. Level 4 $F_{(2,201)}=18.63$, $p<0.0001$, Tukey $WT_{10w}$ vs $WT_{20w}$ $p<0.0001$, $WT_{20w}$ vs $WT_{40w}$ p=0.0272, $KO_{10w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$. Level 5 $F_{(2,150)}=5.046$, p=0.0076, Tukey $WT_{10w}$ vs $WT_{20w}$ p=0.0209, $WT_{20w}$ vs $WT_{40w}$ p=0.0003). Spine density was also significantly decreased between WT and KO mice at 40w for fourth and fifth dendritic levels (Level 4 $F_{(1,201)}=8.135$, p=0.0048, Tukey $WT_{40w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$. Level 5 $F_{(1,150)}=7.278$, p=0.0078, Tukey $WT_{40w}$ vs $KO_{40w}$ p=0.0002). These

data suggest again that aging processes could be different between WT and KO mice. To identify whether these changes in spine density were supported by changes in density of shape-specific spines, we sorted spines into three groups: thin, mushroom, and stubby spines as described in table 1. We highlighted that age-related decreases of spine density onto third level dendrites are mainly due to decreases of thin and mushroom spine density (Figure 4B-D) (Thin $F(2,198)=15.54$, $p<0.0001$, Tukey $WT_{10w}$ vs $WT_{20w}$ $p<0.0001$, $KO_{10w}$ vs $KO_{40w}$ $p=0.0021$, $KO_{20w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$. Mushroom $F(2,198)=78.38$, $p<0.0001$, Tukey $WT_{10w}$ vs $WT_{20w}$ $p<0.0001$, $KO_{10w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$, $KO_{20w}$ vs $KO_{40w}$ $p=0.0007$) suggesting that these modifications are independent of the spine maturity stages. For fourth and fifth level dendrites, we highlighted that changes in density of all three spine types seem to account for global spine density variations with aging (Level 4 Thin $F_{(2,247)}=49.64$, $p<0.0001$. Mushroom $F_{(2,247)}=109.2$, $p<0.0001$. Stubby $F_{(2,247)}=24.7$, $p<0.0001$. Level 5 Thin $F_{(2,156)}=32.04$, $p<0.0001$. Mushroom $F_{(2,156)}=144.6$, $p<0.0001$. Stubby $F_{(2,156)}=14.5$, $p<0.0001$). However, the fall of spine density between WT and KO mice at 40w seems to be due to the fall of thin and stubby spines only, suggesting here that mature spines are preserved on fourth and fifth level dendrites (Level 4 Thin $F_{(1,247)}=28.31$, $p<0.0001$ Tukey $WT_{40w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$. Stubby $F_{(1,247)}=47.49$, $p<0.0001$ Tukey $WT_{40w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$. Level 5 Thin $F_{(1,156)}=20.17$, $p<0.0001$ Tukey $WT_{40w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$. Stubby $F_{(1,156)}=45.23$, $p<0.0001$ Tukey $WT_{40w}$ vs $KO_{40w}$ $p<0.0001$).

For Peer Review

## Discussion

In this paper we analyzed the effects of aging on motor stereotypies and rearing behavior, along with functionality and morphology of striatal medium spiny neurons, in the Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (KO) mouse model of ASD. We were interested in studying aging as ASD are a lifelong condition and a large part of clinical and animal studies focused on developmental stages. Thus, while social and associative symptoms are subject to interpretation and are often different from a context to another in humans (Nestler & Hyman, 2010), the motor stereotypies constitute a robust index of autistic spectrum (Varghese et al., 2017). In this study we used KO animals and age-matched WT control littermates at 10w, 20w, and 40w, standing for young adult, adult, and old stages. We used groups gathering males and females as no sex-related differences have been statistically observed for behavioral analysis in our hands.

We demonstrated that motor stereotypies are present at 10w and 20w and worsened with aging at 40w in Shank3 KO mice compared to WT. While previous papers showed excessive grooming behavior in these mice (10w (Matas et al., 2021))(40w (Kouser et al., 2013)), we provide the first evidence of symptom worsening with aging. We also went further in the analysis as we investigated an intermediate time (20w) and we also included rearing behavior as another component of the test. Rearing was excessive at 10w and progressively decreased at 20w and 40w, in parallel with an increase of grooming behavior, leading to behavioral output alterations in KO mice at 40w. Taken together, these findings strongly suggest that in this model, 20w (adult stage) seems to be a turning point for behavioral evolution with aging, leading to global behavioral alteration at latter stages. These findings could partially reflect the symptoms and comorbidities worsening observed in some patients at adulthood including motor stereotypies (Croen et al., 2015; Jokiranta-Olkoniemi et al., 2021; Noone et al., 2006; Schoufour et al., 2013).

The excitation/inhibition imbalance hypothesis of ASD (Nelson & Valakh, 2015; Rubenstein & Merzenich, 2003) has been extensively examined mainly for its excitatory part in the Shank3 models of ASD (Delling & Boeckers, 2021), as Shank3 protein is expressed at glutamatergic synapses in the striatum (Yoo et al., 2018). In this study, we focused on the dorsolateral striatum, which is directly linked to motor stereotypies (Hollander et al., 2005; Rojas et al., 2006). We examined the condition of local GABAergic transmission in this structure by recording (i) MSN intrinsic properties and (ii) spontaneous inhibitory post-synaptic currents on MSN. We first showed that the time constant Tau was reduced between 10w and 40w in WT mice and between 20w and 40w in KO mice, suggesting that there could be a delay in excitability alterations due to the Shank3 mutation and reinforcing the hypothesis that 20w could be a crucial time point in the evolution of the ASD-related impairments in KO mice. However, we were not able to determine whether the recorded neurons expressed the dopaminergic receptor D1 or D2, and so to identify their implication in the striato-nigral or striato-pallidal pathways. Given that the MSN excitability is slightly different between the two populations (Kreitzer & Malenka, 2007), this could be a limitation of our study and would need further exploration.

Our data clearly highlight that frequency and distribution of events are affected in KO mice at 20w only, resulting in a significant increase of the number of small amplitude currents (10-15pA) as well as a trend to increase for high amplitude currents (50pA & more), leading to a significant increase of IPSC frequency and cumulative probability. Interestingly, neither

For Peer Review

the IPSC distribution, the cumulative probability nor the frequency was affected at younger stage (10w) or latter stage (40w), leading to the reinforcement of our 20w-shift hypothesis. These findings are a major step forward in the comprehension of the GABAergic related alterations in ASD models, as little is known about it (Thabault et al., 2022). The first clear GABAergic involvement in ASD physiopathology is that transgenic mice lacking either alpha 5 or beta 3 GABA-A receptor subunit display ASD-like phenotypes (DeLorey, 2005; Zurek et al., 2016). To date, striatal GABAergic impairments are observed only in a few models of ASD, such as Chd8+/- mice (Platt et al., 2017), NL3-cKO mice (Rothwell et al., 2014) and Fmr1-/- mice (Centonze et al., 2008), but were never described in any Shank3 model of ASD. Moreover, our findings provide the first evidence of age-related alterations in a murine model of ASD, as all above-cited studies used 4weeks to 10weeks mice.

It is now well established that dysfunctions in neurotransmission often go with neuronal morphological alterations (for example in ASD: (Peça et al., 2011), or in Huntington's disease: (Holley et al., 2019)). To explore this possibility, we performed a sholl analysis to examine dendritic arborization. We report an increase of the distal dendritic arborization in KO mice at 20w only, with no changes in the proximal arborization. Interestingly, this increase in the MSN morphology has been previously described in another Shank3 mouse model of ASD (Peça et al., 2011) but at younger stages (5-6w).

As morphological disturbances were highlighted on distal arborization, we next measured the dendritic spine density on third, fourth and fifth level dendritic segments. Differences observed here were mainly a result of aging. Indeed, we showed that the global spine density is significantly lower in KO mice than in WT mice at 40w only, on the most distal dendritic segments. Interestingly, in the Shank3B KO mouse model of ASD, the spine density was reported to be decreased as early as 5-6w (Peça et al., 2011). This suggests that the deletion of the C-terminal part of the protein leads to age-dependent alterations of the spine density, but not at young stages. We then sorted the spines into three different groups: thin, stubby, and mushroom spines, according to previous studies (Hering & Sheng, 2001; Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Sebastian et al., 2013). We found that in third level dendrites, the age-related changes in density can be attributed to changes in the density of thin and mushroom spines, which are respectively immature and mature spines (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020). However, although the stubby spine density is supposed to fall with aging (Bloss et al., 2011; Hering & Sheng, 2001), we observed this decrease on fourth and fifth dendritic segments only, where all three spine types are decreased with aging. Finally,

For Peer Review

the decrease of the spine density between WT and KO mice at 40w on most distal dendritic segments is carried by a fall in thin and stubby spine density, but not mushroom spine density, as also shown in aging studies (Bloss et al., 2011). Given that mushroom spine density is higher in KO mice than in WT mice at 10w and 20w, we suggest that maturation but not maintenance of the dendritic spines could be affected in this murine model of ASD.

## Conclusion

Here, we highlighted that motor stereotypies worsen with aging in KO mice, at the expense of other behaviors like rearing behavior. This worsening of ASD symptom at 40w seems to be due to earlier disturbances of the striatal GABAergic transmission and to MSN morphological impairments. Taken together, our findings suggest that MSN alterations in ASD may not constitute the primary consequence of developmental impairments but occur at later stages, possibly as a consequence of other alterations. These could potentially affect interneurons, as previously reported in other ASD models (for review: (Filice et al., 2020)) but the underlying mechanisms remain to be elucidated in this model. In addition, our findings clearly show that 20 weeks could be a critical time-point in the evolution of the ASD physiopathology, opening a way to a better understanding of the aging processes in ASD.

For Peer Review

## References

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596

Bhat, A. N. (2021). Motor Impairment Increases in Children With Autism Spectrum Disorder as a Function of Social Communication, Cognitive and Functional Impairment, Repetitive Behavior Severity, and Comorbid Diagnoses: A SPARK Study Report. *Autism Research*, *14*(1), 202–219. https://doi.org/10.1002/aur.2453

Bidinosti, M., Botta, P., Kröttner, S., Proenca, C. C., Stoehr, N., Bernhard, M., Fruh, I., Mueller, M., Bonenfant, D., Voshol, H., Carbone, W., Neal, S. J., McTighe, S. M., Roma, G., Dolmetsch, R. E., Porter, J. A., Caroni, P., Bouwmeester, T., Löthi, A., & Galimberti, I. (2016). CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. *Science*, *351*(6278), 1199–1203. https://doi.org/10.1126/science.aad5487

Bloss, E. B., Janssen, W. G., Ohm, D. T., Yuk, F. J., Wadsworth, S., Saardi, K. M., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2011). Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, *31*(21), 7831–7839. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0839-11.2011

Centonze, D., Rossi, S., Mercaldo, V., Napoli, I., Ciotti, M. T., de Chiara, V., Musella, A., Prosperetti, C., Calabresi, P., Bernardi, G., & Bagni, C. (2008). Abnormal Striatal GABA Transmission in the Mouse Model for the Fragile X Syndrome. *Biological Psychiatry*, *63*(10), 963–973. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.008

Croen, L. A., Zerbo, O., Qian, Y., Massolo, M. L., Rich, S., Sidney, S., & Kripke, C. (2015). The health status of adults on the autism spectrum. *Autism*, *19*(7), 814–823. https://doi.org/10.1177/1362361315577517

Delling, J. P., & Boeckers, T. M. (2021). Comparison of SHANK3 deficiency in animal models: phenotypes, treatment strategies, and translational implications. In *Journal of Neurodevelopmental Disorders* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s11689-021-09397-8

DeLorey, T. M. (2005). GABRB3 Gene Deficient Mice: A Potential Model of Autism Spectrum Disorder. *International Review of Neurobiology*, *71*(05), 359–382. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)71015-1

Duffney, L. J., Zhong, P., Wei, J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., Ma, K., Dietz, D. M., Kajiwara, Y., Buxbaum, J. D., & Yan, Z. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Reports*, *11*(9), 1400–1413. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.064

Ellegood, J., & Crawley, J. N. (2015). Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. *Neurotherapeutics*, *12*(3), 521–533. https://doi.org/10.1007/s13311-015-0360-z

Filice, F., Janickova, L., Henzi, T., Bilella, A., & Schwaller, B. (2020). The Parvalbumin Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*(December), 1–24. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577525

Happé, F., & Charlton, R. A. (2011). Aging in autism spectrum disorders: A mini-review. *Gerontology*, *58*(1), 70–78. https://doi.org/10.1159/000329720

Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*, 880–888. www.nature.com/reviews/neuro

Hirvikoski, T., Mittendorfer-Rutz, E., Boman, M., Larsson, H., Lichtenstein, P., & Bölte, S. (2016). Premature mortality in autism spectrum disorder. *British Journal of Psychiatry*, *208*(3), 232–238. https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.160192

Hollander, E., Anagnostou, E., Chaplin, W., Esposito, K., Haznedar, M. M., Licalzi, E., Wasserman, S., Soorya, L., & Buchsbaum, M. (2005). Striatal volume on magnetic resonance imaging and repetitive behaviors in autism. *Biological Psychiatry*, *58*(3), 226–232. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.03.040

Holley, S. M., Galvan, L., Kamdjou, T., Cepeda, C., & Levine, M. S. (2019). Striatal GABAergic interneuron dysfunction in the Q175 mouse model of Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, *49*(1), 79–93. https://doi.org/10.1111/ejn.14283

Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Liu, S., & Powell, C. M. (2016). Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in Shank3 Exon4-9

For Peer Review

Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Research*, *9*(3), 350–375. https://doi.org/10.1002/aur.1529

Jokiranta-Olkoniemi, E., Gyllenberg, D., Sucksdorff, D., Suominen, A., Kronström, K., Chudal, R., & Sourander, A. (2021). Risk for Premature Mortality and Intentional Self-harm in Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *51*(9), 3098–3108. https://doi.org/10.1007/s10803-020-04768-x

Kouser, M., Speed, H. E., Dewey, C. M., Reimers, J. M., Widman, A. J., Gupta, N., Liu, S., Jaramillo, T. C., Bangash, M., Xiao, B., Worley, P. F., & Powell, C. M. (2013). Loss of predominant shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*, *33*(47), 18448–18468. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3017-13.2013

Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature*, *445*(7128), 643–647. https://doi.org/10.1038/nature05506

Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Fuctional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*.

Li, W., & Pozzo-Miller, L. (2020). Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 98, Issue 11, pp. 2130–2147). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/jnr.24560

Matas, E., Maisterrena, A., Thabault, M., Balado, E., Francheteau, M., Balbous, A., Galvan, L., & Jaber, M. (2021). Major motor and gait deficits with sexual dimorphism in a Shank3 mutant mouse model. *Molecular Autism*, *12*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s13229-020-00412-8

Nelson, S. B., & Valakh, V. (2015). Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron*, *87*(4), 684–698. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.033

Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. In *Nature Neuroscience* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1161–1169). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nn.2647

Noone, S. J., Jones, R. S. P., & Hastings, R. P. (2006). Care staff attributions about challenging behaviors in adults with intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, *27*(2), 109–120. https://doi.org/10.1016/j.ridd.2004.11.014

Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C., & Rodriguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *23*(SUPPL. 3), 548–559. https://doi.org/10.1002/mds.22062

Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00031

For Peer Review

Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, *472*(7344), 437–442. https://doi.org/10.1038/nature09965

Peñagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L. I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J. T., Peles, E., & Geschwind, D. H. (2011). Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*, *147*(1), 235–246. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.040

Platt, R. J., Zhou, Y., Slaymaker, I. M., Shetty, A. S., Weisbach, N. R., Kim, J. A., Sharma, J., Desai, M., Sood, S., Kempton, H. R., Crabtree, G. R., Feng, G., & Zhang, F. (2017). Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits. *Cell Reports*, *19*(2), 335–350. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.052

Rojas, D. C., Peterson, E., Winterrowd, E., Reite, M. L., Rogers, S. J., & Tregellas, J. R. (2006). Regional gray matter volumetric changes in autism associated with social and repetitive behavior symptoms. *BMC Psychiatry*, *6*, 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-244X-6-56

Rothwell, P. E., Fuccillo, M. v., Maxeiner, S., Hayton, S. J., Gokce, O., Lim, B. K., Fowler, S. C., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2014). Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. *Cell*, *158*(1), 198–212. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.045

Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/ inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, *2*, 255–267. https://doi.org/10.1046/j.1601-183X.2003.00037.x

Schoufour, J. D., Mitnitski, A., Rockwood, K., Evenhuis, H. M., & Echteld, M. A. (2013). Development of a frailty index for older people with intellectual disabilities: Results from the HA-ID study. *Research in Developmental Disabilities*, *34*(5), 1541–1555. https://doi.org/10.1016/j.ridd.2013.01.029

Sebastian, V., Estil, J. B., Chen, D., Schrott, L. M., & Serrano, P. A. (2013). Acute Physiological Stress Promotes Clustering of Synaptic Markers and Alters Spine Morphology in the Hippocampus. *PLoS ONE*, *8*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079077

Thabault, M., Turpin, V., Maisterrena, A., Jaber, M., Egloff, M., & Galvan, L. (2022). Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: From Clinical Observations to Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 2294. https://doi.org/10.3390/ijms23042294

Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., Harony-Nicolas, H., de Rubeis, S., Drapeau, E., Buxbaum, J. D., & Hof, P. R. (2017). Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathologica*, *134*(4), 537–566. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4

Wiegel, J., Flory, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Yong Ma, S., Imaki, H., Wiegel, J., Cohen, I. L., London, E., Wisniewski, T., & Brown, W. T. (2014). Stereological study of the

For Peer Review

neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism ... Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alter. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*(141), 1–18.

Yoo, T., Cho, H., Lee, J., Park, H., Yoo, Y. E., Yang, E., Kim, J. Y., Kim, H., & Kim, E. (2018). GABA neuronal deletion of Shank3 exons 14–16 in mice suppresses striatal excitatory synaptic input and induces social and locomotor abnormalities. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00341

Zampella, C. J., Wang, L. A. L., Haley, M., Hutchinson, A. G., & de Marchena, A. (2021). Motor Skill Differences in Autism Spectrum Disorder: a Clinically Focused Review. In *Current Psychiatry Reports* (Vol. 23, Issue 10). Springer. https://doi.org/10.1007/s11920-021-01280-6

Zurek, A. A., Kemp, S. W. P., Aga, Z., Walker, S., Milenkovic, M., Ramsey, A. J., Sibille, E., Scherer, S. W., & Orser, B. A. (2016). α5GABAA receptor deficiency causes autism-like behaviors. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *3*(5), 392–398. https://doi.org/10.1002/acn3.303

For Peer Review

## Tables

| | | Criterion 1 – Spine length (µm) | |
|---|---|---|---|
| | | **≤ 0.75** | **> 0.75** |
| **Criterion 2 – Ratio diameter head / neck** | **≤ 1** | Stubby | Thin |
| | **> 1** | Mushroom | Mushroom |

***Table 1: Spine sorting criteria.*** Adapted from (Hering & Sheng, 2001; Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Sebastian et al., 2013).

| | | Capacitance (pF) | | | Resistance (MΩ) | | | Time constant (ms) | | | | Resting potential (mV) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Mean* | ± | *SEM* | *Mean* | ± | *SEM* | *Mean* | ± | *SEM* | | *Mean* | ± | *SEM* | |
| **10w** | WT *(n=7)* | 100,7 | ± | 7,2 | 142,7 | ± | 14,2 | ***2,3*** | **±** | ***0,1*** | | -79,6 | ± | 3,5 | ***n=6*** |
| | KO *(n=7)* | 87,9 | ± | 6,5 | 154,4 | ± | 12,3 | 1,9 | ± | 0,1 | | -78,0 | ± | 2,5 | ***n=7*** |
| **20w** | WT *(n=7)* | 78,7 | ± | 11,9 | 125,7 | ± | 16,6 | 1,8 | ± | 0,1 | # | -82,7 | ± | 3,0 | ***n=7*** |
| | KO *(n=11)* | 91,5 | ± | 11,1 | 166,5 | ± | 14,0 | ***2,2*** | **±** | ***0,2*** | | -80,7 | ± | 4,0 | ***n=10*** |
| **40w** | WT *(n=6)* | 79,2 | ± | 5,1 | 146,0 | ± | 13,4 | ## ***1,5*** | **±** | ***0,1*** | | -74,9 | ± | 3,8 | ***n=8*** |
| | KO *(n=8)* | 86,1 | ± | 12,6 | 154,8 | ± | 21,4 | ***1,5*** | **±** | ***0,1*** | | -80,7 | ± | 3,3 | ***n=11*** |

***Table 2: Time constant is differentially altered in an age-dependent manner in WT and KO mice.*** Membrane capacitance and resistance, and time constant were measured with Cs-based internal solution. Resting membrane potential was measured with K-Gluconate based internal solution. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. # = age effect # $p<0.05$ ##$p<0.01$. Number of mice / neurons: N/n=5/7 WT 10w, N/n=6/7 KO 10w, N/n=6/7 WT 20w, N/n=7/11 KO 20w, N/n=6/6 WT 40w, n=8/8 KO 40w neurons

## Figure legends

***Figure 1: Age-related modifications of the behavioral output in Shank3 KO mice.***

(A) Grooming frequency (left) and cumulative time (right). (B) Rearing frequency (left) and cumulative time (right). (C) Global behavioral output measured in Shank3 WT and KO mice. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. * = genotype effect # = age effect. Sidak post-hoc for behavioral output $ = behavioral difference * $p<0.05$ ** $p<0.01$ **** $p<0.0001$. Number of mice: N=10 WT 10w, N=11 KO 10w, N=13 WT 20w, N=11 KO 20w, N=10 WT 40w, N=10 KO 40w.

***Figure 2: IPSC frequency alterations with aging in KO mice.***

(A) Representative traces of IPSCs recording of DLS MSN at 10w (left), 20w (middle) and 40w (right). (B) Distribution of the number of IPSC across the IPSC amplitude (bin = 5pA). (C) Interevent intervals with IPSC frequency in inserts. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. * = genotype effect * $p<0.05$. Number of mice / neurons: N/n=5/7 WT 10w, N/n=6/7 KO 10w, N/n=6/7 WT 20w, N/n=7/11 KO 20w, N/n=6/6 WT 40w, n=8/8 KO 40w.

***Figure 3: MSN dendritic arborization is increased at 20w in KO mice.***

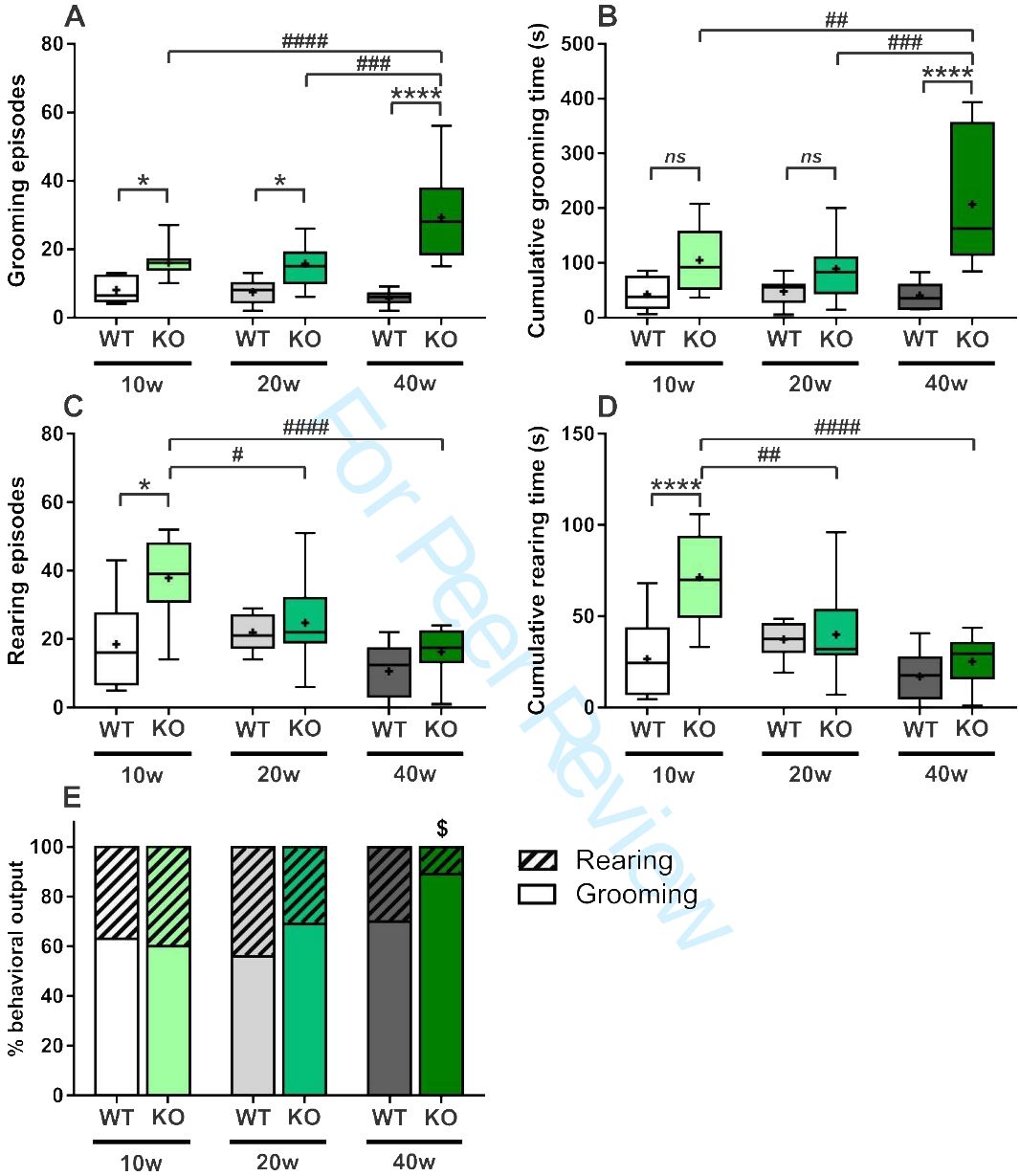
(A) Representative neuronal morphology obtained with IMARIS software. Scale bar 40µm (B) Sholl analysis of the MSN arborization density. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. * = genotype effect * $p<0.05$. Number of mice / neurons: N/n=4/5 WT 10w, N/n=5/5 KO 10w, N/n=2/3 WT 20w, N/n=6/8 KO 20w, N/n=8/8 WT 40w, N/n=5/5 KO 40w.

***Figure 4: Dendritic spine density is altered with aging***

(A) Global spine density, (B) Thin spine density, (C) Mushroom spine density and (D) Stubby spine density on third (left), fourth (middle) and fifth (right) level dendritic segments. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. * = genotype effect # = age effect *$p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ **** $p<0.0001$. Number of labelled neuron / dendritic segments: Level 3 N/n=3/35 WT 10w, N/n=3/28 KO 10w, N/n=3/32 WT 20w, N/n=4/51 KO 20w, N/n=3/27 WT 40w, N/n=3/31 KO 40w segments. Level 4 N/n=3/51 WT 10w, N/n=3/46 KO 10w, N/n=3/53 WT 20w, N/n=4/34 KO 20w, N/n=3/39 WT 40w, N/n=3/30 KO 40w segments. Level 5 N/n=3/22 WT 10w, N/n=3/36 KO 10w, N/n=3/37 WT 20w, N/n=4/16 KO 20w, N/n=3/20 WT 40w, N/n=3/32 KO 40w.

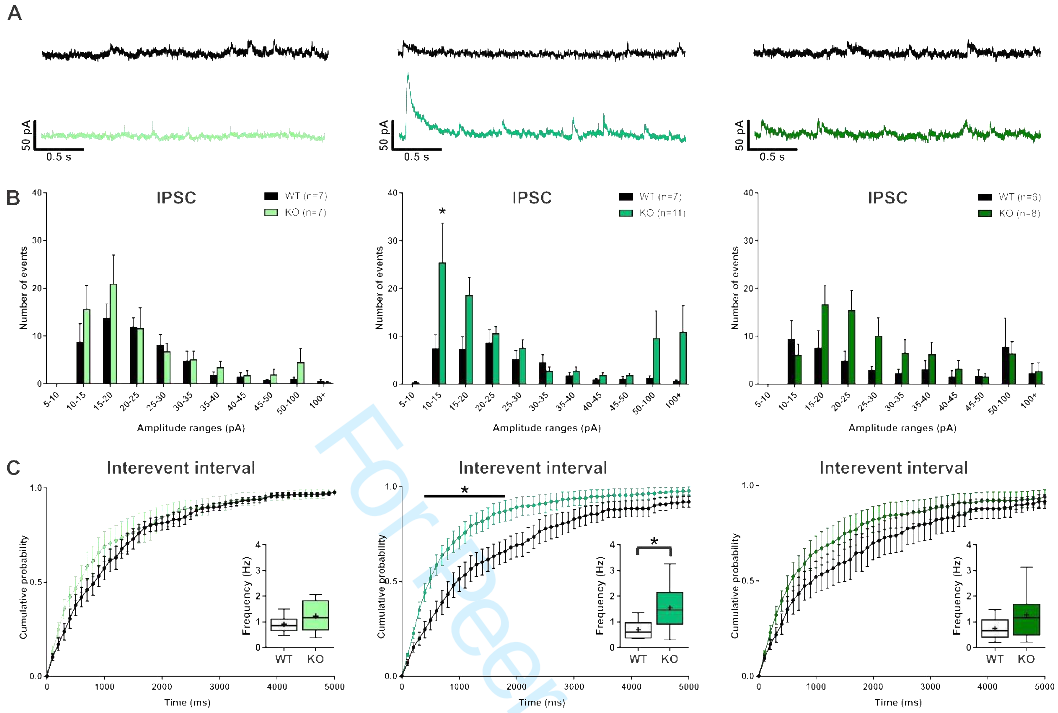
For Peer Review

Figure 1:




For Peer Review

Figure 2:




For Peer Review

Figure 3:

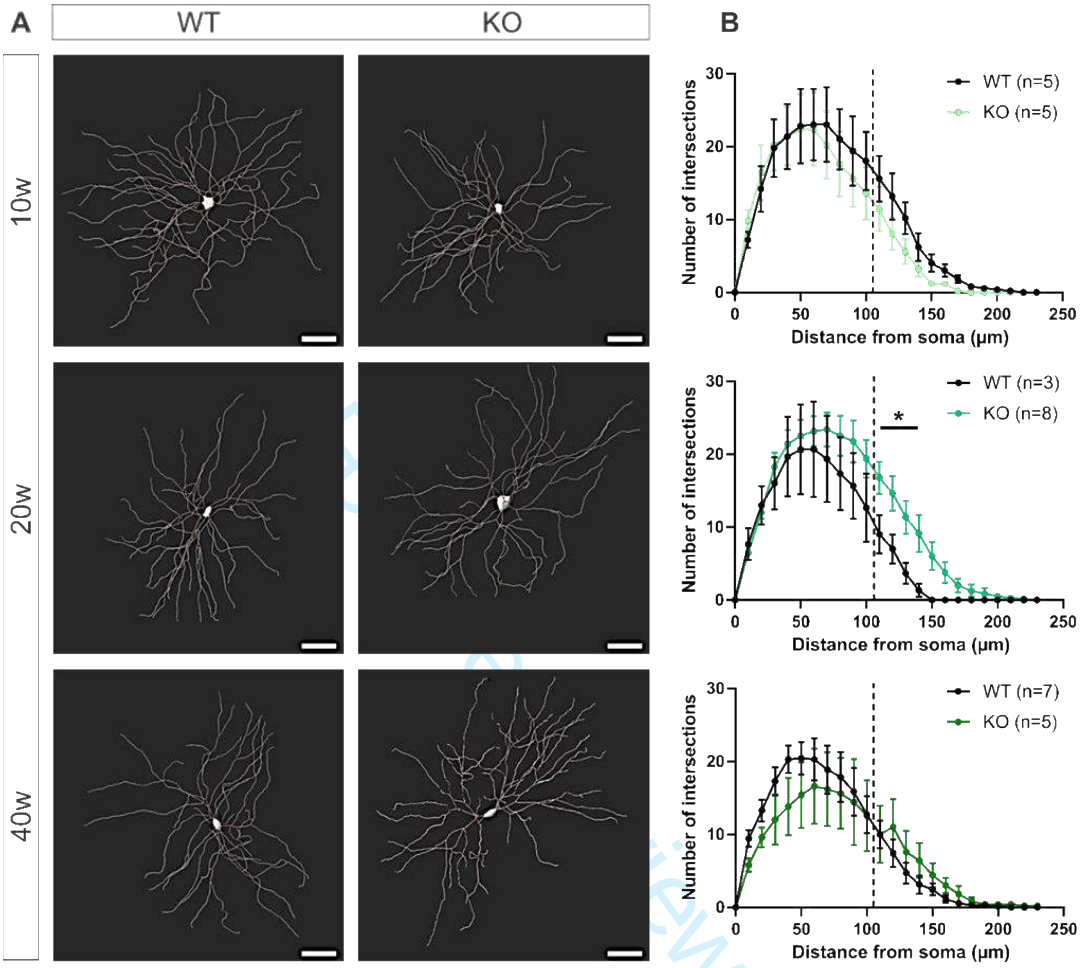
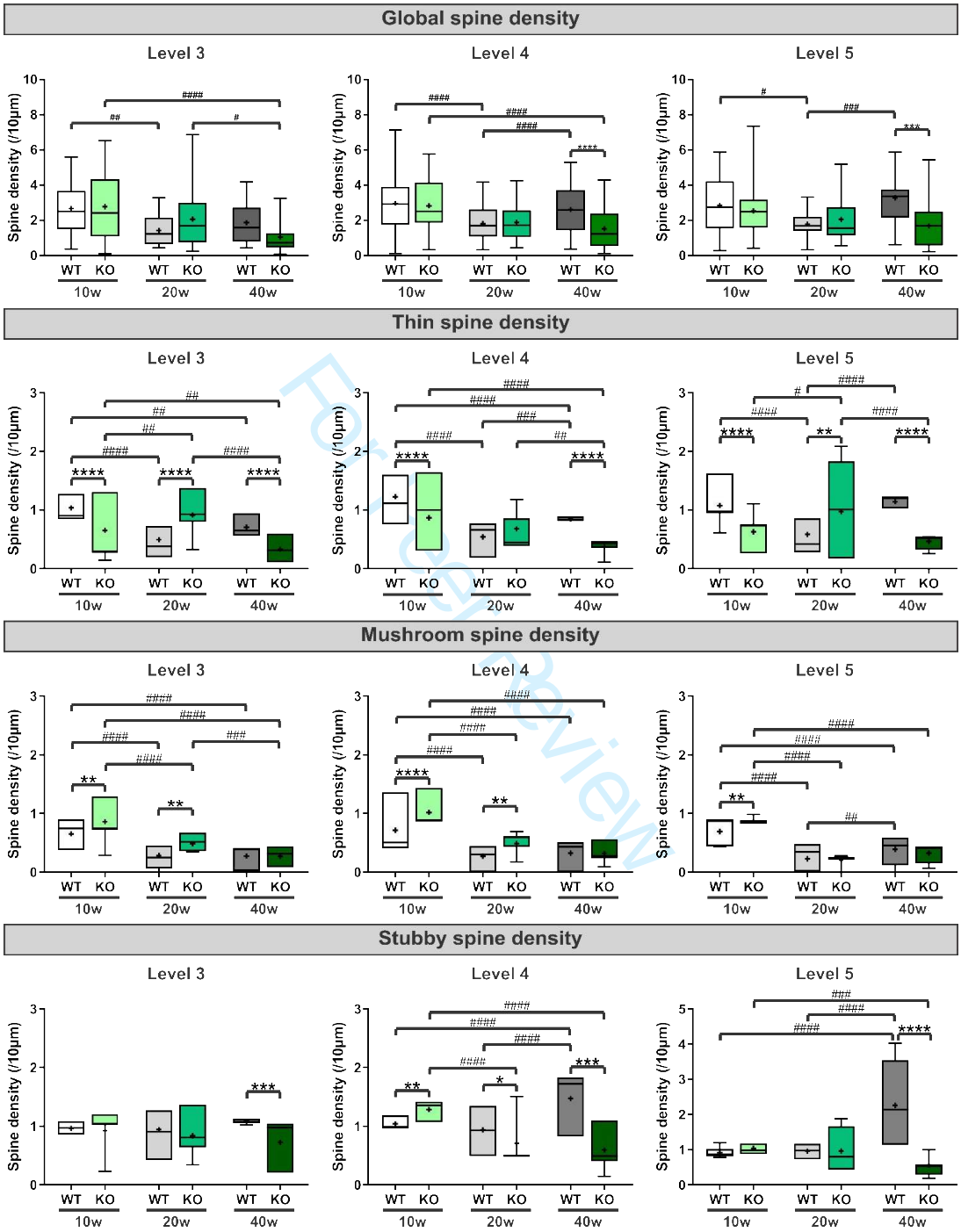

A
WT
KO
10w
20w
40w
B
WT (n=5)
KO (n=5)
WT (n=3)
KO (n=8)
*
WT (n=7)
KO (n=5)
Number of intersections
Distance from soma (µm)
0
10
20
30
0
50
100
150
200
250

Figure 4:




For Peer Review

# DISCUSSION GÉNÉRALE

Les TSA représentent des pathologies psychiatriques neurodéveloppementales qui sont caractérisées par des problèmes de sociabilité et de communication, ainsi que des intérêts et comportements répétitifs et stéréotypés (American Psychiatric Association 2013). Les mécanismes sous-jacents sont encore à l'heure actuelle discutés et aucun traitement n'existe pour cette pathologie. Seuls certains symptômes et comorbidités peuvent être traités, comme l'hyperactivité, l'anxiété, la dépression ou les troubles GI, par le biais de TCC ou de composés pharmacologiques par exemple (Vasa et al. 2014, 2016).

Des approches thérapeutiques nutritionnelles ont peu à peu vu le jour, notamment parce que les enfants avec des TSA ont tendance à avoir une sélectivité alimentaire importante et un comportement agressif à l'heure des repas, ce qui peut donner lieu à des carences (Babinska et al. 2020). Des supplémentations en AGPI n-3 sont parmi les plus prometteuses de ces approches nutritionnelles. En effet, des taux sanguins réduits en AGPI n-3 chez les patients diagnostiqués avec des TSA ont été retrouvés dans la majorité des études et ont été corrélés avec la sévérité des symptômes cœurs des TSA (Amminger et al. 2007; Bent et al. 2011; Mazahery et al. 2017; Parellada et al. 2017; Parletta et al. 2016; Vancassel et al. 2001).

La plupart des études s'intéressent néanmoins à comparer une alimentation déficiente avec une alimentation supplémentée sans prendre en compte les types d'AGPI utilisés et leur proportion (DeMar et al. 2006; Fedorova & Salem 2006; Lafourcade et al. 2011). Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de questionner l'importance des AGPI-LC n-3 face aux précurseurs AGPI n-3. Pour cela, nous avons étudié les effets de deux alimentations équilibrées, partageant un ratio LA/ALA de 6, et ne différant que par leur type d'AGPI n-3. La première ne contient que du LA et de l'ALA, les précurseurs en AGPI n-6 et n-3 qui sont des acides gras essentiels ne pouvant pas être produits par l'organisme et de ce fait proviennent obligatoirement de l'alimentation. La deuxième contient la même quantité de précurseurs avec une supplémentation importante en DHA et EPA, des AGPI-LC n-3.

Dans ce contexte, notre étude a pu montrer qu'une alimentation équilibrée et ne contenant que les précurseurs en AGPI n-3 et n-6 était suffisante pour protéger contre les symptômes comportementaux, cellulaires et métaboliques de TSA induits par une exposition au VPA *in utero* et qu'une supplémentation additionnelle en AGPI-LC n-3 n'apportait que peu de bénéfices supplémentaires.

# CHAPITRE 1 : Lien entre AGPI et TSA : études cliniques et précliniques

Des déficiences en AGPI n-3 chez des patients et plusieurs modèles animaux de TSA ont été retrouvées (El-Ansary & Al-Ayadhi 2014; Mazahery et al. 2017; Parletta et al. 2016; Vancassel et al. 2001). En plus de représenter un biomarqueur de cette physiopathologie, une déficience en AGPI n-3 lors de la période critique de gestation et de lactation chez l'animal donne lieu à des symptômes comportementaux, cellulaires et métaboliques de TSA (Martinat et al. 2021). De ce fait, des stratégies nutritionnelles basées sur une supplémentation en AGPI n-3 ont vu le jour afin de protéger et/ou de réduire les symptômes autistiques en clinique et pré-clinique, mais celles-ci montrent des résultats ambivalents (Bozzatello et al. 2019).

Certaines études ont permis de promouvoir les effets bénéfiques des AGPI n-3, et notamment des AGPI-LC n-3, sur les symptômes principalement retrouvés chez les patients avec des TSA comme la sociabilité, l'hyperactivité, la léthargie et les stéréotypies (Amminger et al. 2007; Cheng et al. 2017; Schuchardt et al. 2010; Yui et al. 2012). D'autres n'ont pas trouvé d'effets bénéfiques ni sur les symptômes de TSA ni sur les marqueurs d'inflammation malgré une restauration des niveaux de DHA dans le plasma et dans les érythrocytes (Clayton et al. 2007; de la Torre-Aguilar et al. 2022; Mankad et al. 2015; Voigt et al. 2014).

Récemment, une méta-analyse a permis de constater qu'une supplémentation en AGPI n-3 donnait lieu à une meilleure communication sociale, seulement lorsque les études sur les

symptômes associés aux TSA étaient prises en compte (Siafis et al. 2022). Dans notre étude, nous avons pu montrer qu'une alimentation équilibrée en AGPI n-3 et n-6 sous forme de précurseurs était suffisante pour protéger contre les symptômes cœurs des TSA, et qu'une alimentation enrichie en AGPI-LC n-3 n'apportait que peu de bénéfices dans la sphère comportementale. En effet, quelle que soit l'alimentation, les souris exposées *in utero* au VPA, qu'elles soient de sexe mâle ou femelle, n'ont pas montré de troubles liées à la sociabilité ou aux stéréotypies. Néanmoins, des différences entre les deux alimentations ont été retrouvées dans les troubles comportementaux associés, comme l'activité globale et la marche ou bien les marqueurs développementaux. L'effet des AGPI-LC n-3 semble différent selon la nature du comportement étudié. Il serait intéressant de compléter cette étude comportementale avec des tests visant à évaluer de manière plus précise l'anxiété, la coordination motrice fine et l'activité globale par exemple. Concernant la marche, plusieurs différences, notamment entre les mâles et les femelles sont apparues. Les résultats obtenus dans ce test renforcent l'idée de troubles moteurs au sein des TSA et représentent une piste prometteuse pour investiguer plus finement les différences entre les sexes, en se basant sur ce qui a été précédemment démontré au sein du laboratoire (Al Sagheer et al. 2018; Haida et al. 2019; Matas et al. 2021).

Les résultats inconsistants retrouvés en clinique peuvent s'expliquer par des différences temporelles d'exposition à la supplémentation, du type d'AGPI n-3, des longues chaînes ou des précurseurs. De plus, les rares études existantes portent souvent sur un nombre restreint de sujets, avec une alimentation et une localisation géographique différente, et sans groupes contrôles adéquats ne permettant pas aux méta-analyses de proposer des résultats fiables et homogènes (Siafis et al. 2022). Notre étude a permis de s'affranchir de ces différences en utilisant le modèle murin VPA et de se concentrer sur les effets de deux alimentations équilibrées en AGPI n-6 et n-3 pendant une longue période. L'impact d'approches nutritionnelles pendant une période aussi critique pour le neurodéveloppement et l'accrétion

d'AG cérébrale, rend la descendance extrêmement sensible aux bénéfices de cette alimentation et permet de la protéger face aux agressions périnatales (Janssen & Kiliaan 2014; Martinat et al. 2021). Ce projet a permis de montrer que l'introduction d'une alimentation supplémentée en AGPI n-3, qu'elle soit sous forme majoritaire de précurseurs ou de longue chaîne, dès le premier jour de gestation jusqu'à l'âge adulte, permet de protéger contre les symptômes induits par le VPA.

Il serait intéressant de compléter cette étude par d'autres approches nutritionnelles temporelles afin de déterminer la fenêtre d'action des AGPI n-3. En se basant sur les études étudiant l'axe cerveau-intestin, la période maternelle entre la gestation et la lactation est la plus critique pour le développement de TSA, et une supplémentation en précurseurs AGPI n-3 ou en AGPI-LC n-3 seulement lors de cette période pourrait être envisagée (Moody et al. 2017; van De Sande et al. 2014). Au sevrage, la descendance aurait à sa disposition une alimentation standard sans supplémentation en AGPI n-3. Cette étude permettrait de statuer sur le potentiel des différents types d'AGPI n-3 lors d'une période critique et face à une agression extérieure.

D'autres projets pourraient aussi découler de cette étude en associant à la supplémentation en AGPI n-3 sous formes de précurseurs une autre stratégie nutritionnelle. En effet, il existe des co-supplémentations, parmi lesquelles l'association des AGPI n-3 (incluant l'ALA, l'EPA, le DHA et leurs combinaisons) et des vitamines (incluant les vitamines B6, B12, C, D, l'acide folique, l'acide folinique et leurs combinaisons) semble procurer les meilleurs bénéfices d'après une récente méta-analyse (Fraguas et al. 2019). Ces co-supplémentations donnent lieu à davantage d'effets positifs sur les symptômes des TSA qu'une supplémentation d'AGPI n-3 seule, et permettent d'identifier l'apport spécifique des supplémentations de façon individuelle par l'utilisation de groupes contrôles (Mazahery et al. 2019). Il a d'ailleurs été montré qu'une co-supplémentation d'AGPI-LC n-3 (EPA+DHA) et de vitamine D pendant 24 mois chez un patient avec des TSA de 23 ans avait eu des effets extrêmement bénéfiques sur les niveaux

sanguins en AGPI n-3 et sur les symptômes autistiques comportementaux (Infante et al. 2020). Cette étude suggère que plus le temps d'exposition à la supplémentation est long, plus les symptômes autistiques s'estompent. Il semblerait d'ailleurs que les patients avec des TSA et des taux sanguins élevés d'IL-1β soient les plus sensibles à la combinaison en AGPI et vitamine D, confortant encore davantage le lien entre inflammation et alimentation (Mazahery et al. 2020). Ces différentes études cliniques démontrent qu'une approche nutritionnelle ne semble pas suffisante à elle seule pour réduire les symptômes autistiques, mais serait plus efficace en combinaison avec d'autres thérapies, comme des TCC (Horvath et al. 2017; Mazahery et al. 2017).

De manière intéressante, les résultats des études portant sur une supplémentation d'AGPI n-3 chez des modèles animaux sont plus positifs. L'utilisation du modèle animal à l'acide propionique a permis notamment de lier les ratios d'AGPI avec les mécanismes de neurotoxicité liés à l'exposition à l'acide propionique, aux problèmes de stress oxydatif, de neurotransmission et de neuroinflammation (Alfawaz et al. 2018; El-Ansary & Al-Ayadhi 2014). Dans ce modèle, comme chez l'Homme, sont retrouvés des taux plasmatiques d'AGPI anormalement bas (El-Ansary & Al-Ayadhi 2014).

Dans notre étude, nous ne sommes pas intéressés aux niveaux plasmatiques ou érythrocytaires en AGPI car ils ne représentent qu'une indication incomplète des niveaux cérébraux. Ce projet s'est concentré sur le cervelet par ses approches comportementales et cellulaires, c'est pourquoi nous avons mis en relation les profils lipidiques périphériques et centraux en investiguant les niveaux en AGPI n-3 et n-6 dans le foie et le cervelet chez les deux sexes de la descendance. Nous nous sommes concentrés sur les AGPI-LC n-3 et n-6 les plus importants dans notre étude : le DHA et l'AA. Dans le foie, nous avons retrouvé de façon constante une augmentation du DHA et une baisse de l'AA chez les animaux supplémentés avec des AGPI-LC n-3, quel que soit leur traitement. Le même impact de la supplémentation

en AGPI-LC n-3 sur les niveaux de AA ont été retrouvés dans le cervelet. De façon surprenante, les niveaux de DHA cérébelleux sont équivalents quel que soit le groupe expérimental. On retrouve cependant chez les femelles exposées au VPA *in utero* et supplémentées avec des AGPI-LC n-3 une augmentation du taux de DHA cérébelleux par rapport à l'alimentation équilibrée avec seul ALA comme source d'AGPI n-3. Nous avons déduit de ses résultats discutés précédemment que les femelles semblent davantage sensibles à la supplémentation en AGPI-LC n-3 et qu'une supplémentation en précurseurs d'AGPI n-3 est suffisante pour obtenir des niveaux de DHA cérébelleux équivalents à ceux produits par une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3.

Dans le modèle Fmr1$^{-/-}$, une supplémentation en AGPI n-3 sous forme de précurseurs pendant 10 semaines après le sevrage n'a pas eu d'impact aussi important sur les niveaux érythrocytaires en AGPI n-3 et AGPI-LC n-3. Seule la supplémentation en AGPI-LC n-3 a permis d'augmenter le taux de tous les AGPI n-3 dans les érythrocytes, surtout en DHA (+50%), tout en diminuant drastiquement la proportion d'AA (-70%) (Pietropaolo et al. 2014). Cette supplémentation a donc permis de modifier le ratio n-6/n-3 en faveur des AGPI n-3. Ces résultats mettent en évidence que des modèles environnementaux et génétiques montrent des déficiences en AGPI n-3 qui peuvent être reversés par une supplémentation spécifique.

Chez d'autres modèles animaux, des stratégies de co-supplémentation ont été étudiées comme chez l'Homme. Il a notamment été montré dans le modèle à l'acide propionique qu'une co-supplémentation de vitamine B12 et d'AGPI-LC n-3 (EPA + DHA) pendant 30 jours permettait de restaurer des niveaux physiologiques de peroxydation lipidique, de lipoxygénase de l'arachidonate 5 (5-LOX), de glutathion (GSH), de S-transférase du glutathion (GST) et cyclo-oxygénase 2 (COX2) (Alfawaz et al. 2018). D'autres modèles environnementaux de TSA sont également sensibles à la supplémentation en AGPI n-3, comme les modèles de MIA viraux (*i.e.* poly I:C) et bactériens (*i.e.* LPS) (Fortunato et al. 2017; Li et al. 2015; Weiser et al. 2016).

Des modèles reliés à l'inflammation et aux comorbidités de TSA sont également sensibles à cette alimentation (Davis et al. 2017; de Theije et al. 2015). De façon intéressante, la supplémentation en AGPI n-3 se révèle également efficace chez la souris BTBR (van Elst et al. 2019).

Très peu d'études se sont intéressées au modèle VPA, résultant en un manque de connaissances sur les effets d'une supplémentation en AGPI n-3 dans ce modèle. Les études existantes portent sur les conséquences d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la mort cellulaire hippocampique, les comportements associés d'apprentissage et de mémoire spatiale ainsi que sur la composition microbienne (Gao et al. 2016; Wang et al. 2020). En effet, la majorité des études s'intéressant aux AGPI et aux TSA portent principalement sur l'hippocampe et le cortex préfrontal (Fedorova & Salem 2006; Lafourcade et al. 2011; Moranis et al. 2012; Xiao et al. 2005).

Ce projet se distingue par l'étude du cervelet, une région très enrichie également en lipides et impliquée dans la physiopathologie des TSA (Thabault et al. 2022). Peu d'études se sont intéressées jusqu'ici aux effets des AGPI n-3 au niveau du cervelet. Chaque région cérébrale a son lipidome propre, ce qui peut expliquer en partie les différences comportementales observées dans ce projet (Carrié et al. 2000; Joffre et al. 2016; Xiao et al. 2005). Il est intéressant de noter que le ratio n-6/n-3 du cervelet (*i.e.* 0.54+0.02) chez la souris C57BL/6J sans approches nutritionnelles est le plus faible de toutes les structures cérébrales étudiées (Joffre et al. 2016). Cette structure est davantage enrichie en AGPI n-3 qu'en AGPI n-6, et est donc plus sensible à des approches nutritionnelles visant à moduler ce ratio. En effet, une déficience en AGPI n-3 du sevrage jusqu'à 4 mois dans cette même étude a mené à une déplétion des AGPI n-3 de 30% et une augmentation des AGPI n-6, notamment d'AA (+19%) (Joffre et al. 2016). Par rapport au cortex préfrontal et l'hippocampe, la déplétion en AGPI n-3 est moins importante tandis que l'augmentation en AGPI n-6 est plus importante. Le cervelet

est donc une région cérébrale complexe dont les niveaux en AGPI n-3 et n-6 sont impactés par des approches nutritionnelles.

Il aurait été intéressant de compléter ces résultats cérébelleux avec d'autres régions cérébrales impliquées dans les TSA. En effet, le cervelet faisant partie d'un réseau lié à la cognition d'une part et à la motricité d'autre part, l'investigation du thalamus, du cortex préfrontal ainsi que du striatum seraient toutes indiquées dans la continuité de ce projet. La souche de souris est également importante dans notre étude. En effet, les souris CD1 semblent avoir un métabolisme lié aux AGPI plus actif que les C57BL/6J. Les souris CD1 nourries avec une alimentation équilibrée ne contenant que des précurseurs n-3, présentent des niveaux de DHA, un AGPI-LC n-3, supérieurs à ceux de la souris C57BL/6J (Joffre et al. 2016). Ces différences entre souches de souris peuvent notamment expliquer la diversité des résultats obtenus dans différents laboratoires dans le cadre de supplémentations en AGPI n-3.

Ce projet a permis d'apporter des résultats menant à considérer davantage les AGPI n-3 comme une thérapie nutritionnelle effective préventive lors de la période périnatale afin de protéger contre la physiopathologie des TSA. Notre étude démontre aussi que dans ce contexte l'ajout d'AGPI-LC n-3 n'apporte que peu de bénéfices supplémentaires.

# CHAPITRE 2 : Inflammation, AGPI et TSA

Cette étude longitudinale a été complétée par des investigations liées aux processus inflammatoires. En effet, une augmentation de l'inflammation dans le cervelet est retrouvée de façon constante chez l'Homme et dans plusieurs modèles animaux de TSA, dont le modèle VPA (Thabault et al. 2022). De plus, certains métabolites des AGPI n-3 et n-6 sont capables de moduler l'expression de cytokines et autres molécules inflammatoires. Nous nous sommes intéressés à l'expression de TNF-α, TGF-β1 et ARG-1 qui sont des marqueurs d'inflammation reliés à la microglie notamment. Ce travail a permis de mettre en évidence qu'il n'y a pas de

différences sur l'expression de ces marqueurs entre les AGPI-LC n-3 et les précurseurs AGPI n-3. Seule l'expression de TNF-α était augmentée chez les femelles contrôle avec une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3. Ce résultat va à l'encontre de la littérature, où une baisse de TNF-α est retrouvée après une supplémentation en AGPI n-3. Par exemple, les AGPI n-3 ont la capacité d'interrompre la synthèse d'IL-1, 6 et 12, CD14 soluble (sCD14) et TNF-α tout en promouvant la synthèse d'IL-2 aux propriétés anti-inflammatoires (Kaliannan et al. 2015; Rey et al. 2019; van Elst et al. 2014). Cependant, TNF-α étant le seul marqueur dont l'expression est augmentée chez les souris femelles contrôle et supplémentées en AGPI-LC n-3, ceci traduirait davantage d'une augmentation des processus neurotrophiques et de plasticité synaptique plutôt que d'une augmentation de l'inflammation. En effet, il a été montré récemment que TNF-α agit en tant que médiateur entre les BG et les PC dans le cervelet (Shim et al. 2018). Par l'activation des récepteurs à TNF-α, les TNFR1, que possèdent les BG, une libération de glutamate au niveau de la synapse tripartite active le récepteur glutamatergique mGluR1 au niveau des PC, menant à une augmentation de leur excitabilité. Ceci montre qu'une augmentation de TNF-α, par le biais des astrocytes ou de la microglie, est nécessaire au maintien du niveau de glutamate dans la fente synaptique pour activer mGluR1 et induire une plasticité synaptique. Les processus de plasticité synaptique induits par la glio-transmission et leur pertinence dans les TSA sont notamment détaillés dans la revue dont je suis co-première auteure et incluse dans ce manuscrit (Thabault et al. 2022).

Afin de compléter ces résultats, il aurait été également intéressant de ce fait d'étudier la morphologie et les marqueurs spécifiques des populations gliales par immunohistochimie et par des méthodes de biologie moléculaire. Cela aurait pu nous renseigner sur l'activité astrogliale au niveau des régions crus I et crus II, qui sont ici des régions d'intérêt dans la pathologie des TSA. En effet, il a constamment été retrouvé chez l'Homme et dans plusieurs modèles animaux

une astrogliose, une augmentation globale de l'inflammation et une microglie inefficace (Thabault et al. 2022).

De plus, les résultats des marqueurs d'inflammation et du profil lipidomique cérébelleux auraient pu être corrélés avec le profil d'oxylipines cérébelleux dans notre étude. Les oxylipines sont des métabolites oxygénés des AGPI qui dépendent de la composition lipidique stockée dans le cerveau. Elles sont rapidement produites à la demande par différentes enzymes telles que les cyclooxygénases, les lipoxygénases, les cytochromes P450 et les époxydes hydrolases (Gabbs et al. 2015) et ne sont jamais conservées sur le long terme (Joffre 2019; Serhan 2014). Les oxylipines synthétisées dépendent des différents types d'acides gras ingérés. Par exemple, une alimentation avec un ratio élevé de LA/ALA a résulté en une augmentation du ratio des oxylipines n-6/n-3 dans le sérum (Leng et al. 2017). Les oxylipines dérivées des AGPI n-6, notamment les prostaglandines, les leucotriènes, les thromboxanes et les acides hydroxytetraénoïques jouent un rôle pro-inflammatoire (Calder 2002). En opposition, les oxylipines produites à partir des AGPI n-3 sont les acides hydroxyoctadécadiénoïques et hydroxytetraénoïques ainsi que les médiateurs de résolution de l'inflammation comme les marésines, les neuroprotectines et les résolvines qui sont impliqués dans la résolution de l'inflammation (Calder 2002). Néanmoins, il existe des oxylipines dérivées des AGPI n-6 aux propriétés anti-inflammatoires comme les lipoxines, comme il existe des oxylipines dérivées des AGPI n-3 de nature pro-inflammatoire comme les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes (Gabbs et al. 2015). Les oxylipines peuvent également être catégorisées selon l'AG précurseur. On distingue les octadecanoïdes, dérivés de LA et l'ALA, les eicosanoïdes, produits à partir de l'AA et du DGLA pour les AGPI n-6 et l'EPA pour les AGPI n-3, et les docosanoïdes, dont l'AdA, le DPA n-3 et le DHA dérivent (Liput et al. 2021).

Les facteurs d'inflammation et notamment les niveaux d'oxylipines ont récemment été étudiés dans le contexte des TSA. Des taux élevés d'époxydes hydrolases associés à des niveaux

diminués des acides gras époxy ont été retrouvés dans le cortex préfrontal de souris exposées au poly I:C *in utero* (Ma et al. 2019). De façon intéressante, ce modèle de MIA présente des troubles cognitifs associés aux TSA et un inhibiteur d'époxyde hydrolase pendant la période prénatale permet de protéger entre autres contre ces symptômes. De fait, les oxylipines semblent être d'un intérêt particulier dans la physiopathologie des TSA.

Il a également été montré dans d'autres modèles animaux de MIA qu'une supplémentation alimentaire en APGI-LC n-3 module le profil d'oxylipines dans l'hippocampe suite à une inflammation induite par injection cutanée de LPS (Rey et al. 2019). Les animaux de cette étude étaient sujets soit à une alimentation déficiente ou enrichie en AGPI-LC n-3 à partir du sevrage (P21) et cela pendant deux mois, avant de recevoir du LPS (i.p., 125ug/kg). La diète supplémentée en AGPI-LC n-3 a permis un enrichissement de l'hippocampe en ces AGPI spécifiquement et de ce fait, a influencé le ratio d'oxylipines dérivées des AGPI n-3/n-6 en faveur des AGPI n-3, médiateurs de la résolution de l'inflammation. On retrouve l'exact opposé chez les souris ayant eu une alimentation déficiente en AGPI-LC n-3, où les AGPI n-6 se retrouvent en plus grande quantité et créent un environnement pro-inflammatoire avec une prévalence d'oxylipines dérivées des AGPI n-6. Le LPS a augmenté l'expression de cylooxygénase-2 et 5-lipoxygénase quelle que soit l'alimentation, mais dans une moindre mesure chez les animaux soumis à l'alimentation enrichie en AGPI-LC n-3 (Rey et al. 2019). Les AGPI-LC n-3 ont donc un réel effet protecteur concernant l'inflammation en produisant des oxylipines aux propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires.

De façon intéressante, une étude récente démontre également le pouvoir de l'ALA sur le profil des oxylipines. Contrairement à ce qui est communément retrouvé dans la littérature, les AGPI-LC n-3 ne sont pas les seuls à être métabolisés en oxylipines. Dans un contexte d'obésité, d'inflammation et de résistance à l'insuline, un enrichissement de l'alimentation de souris C57BL/6J avec de l'ALA avec un ratio n-6/n-3 de 1 pendant 10 semaines a permis d'augmenter

drastiquement la bioconversion des AGPI n-3 et AGPI-LC n-3 en oxylipines anti-inflammatoires. Ces oxylipines auraient ensuite inhibé l'activité de NF-κB et l'activité pro-inflammatoire des macrophages, permettant de diminuer l'accumulation de triglycérides ainsi que l'inflammation au niveau du tissu adipeux (Fan et al. 2020).

Cette étude montre la capacité de l'ALA, en tant que précurseur AGPI n-3, à modifier le profil d'oxylipines de manière aussi efficace que les AGPI-LC n-3 comme l'EPA et le DHA. L'ALA permet donc de conduire à un profil anti-inflammatoire comme les AGPI-LC n-3, ce qui expliquerait l'efficacité de notre aliment équilibré en précurseurs LA et ALA sur la protection de la physiopathologie des TSA. Au vu de nos résultats concernant les profils lipidiques et inflammatoires cérébelleux, nous nous attendrions à retrouver des profils similaires d'oxylipines anti-inflammatoires entre nos groupes expérimentaux.

# CHAPITRE 3 : Modèle VPA : microbiote intestinal, AGPI et TSA

L'action du VPA repose sur la potentialisation de la neurotransmission GABAergique et de la transcription génique par le biais de l'inhibition des HDAC qui peuvent moduler *in fine* les profils inflammatoire et lipidique. Il est intéressant de noter que le VPA est un AGCC, au même titre que les acides propionique, butyrique et acétique, impliqués et étudiés dans la physiopathologie des TSA (De Angelis et al. 2013; Löscher 2002; Wang et al. 2012). Ces AGCC sont connus pour avoir des effets sur le microbiote intestinal et le système nerveux central, notamment par le biais du nerf vague (Bonaz et al. 2018; Davoli-Ferreira et al. 2021; Madore et al. 2020). Néanmoins, les résultats de notre projet ne semblent pas indiquer un effet du VPA sur le comportement, les processus cellulaires ou métaboliques. Seule une interaction du VPA et de l'alimentation a été retrouvée pour certains paramètres comme le redressement dans le test du cylindre ou bien pour le profil inflammatoire et lipidomique cérébelleux. Peu

d'études se sont intéressées aux conséquences du VPA sur les profils lipidomique et d'oxylipines.

Une étude chez les microorganismes a pu montrer un effet du VPA sur les types d'AG synthétisés et de ce fait sur les processus inflammatoires (Poolchanuan et al. 2020). Le VPA a notamment induit la production chez une souche bactérienne spécifique d'acide élaïdique, un AG *trans* ayant la capacité d'inhiber la β-oxydation dans les macrophages périphériques humains et de mener à une augmentation de la concentration en zinc dans cette population cellulaire spécifique (Zacherl et al. 2014, 2015). Il semblerait que les effets du VPA sur la biosynthèse des AG au niveau du microbiote intestinal nécessite une haute concentration intestinale de VPA (100uM) due à une dose importante de VPA ingérée (de 600 à 900mg) (Poolchanuan et al. 2020).

Le modèle VPA que nous avons utilisé dans cette étude résulte d'une injection unique de 450mg/kg chez la souris C57BL/6J. Sgritta et ses collaborateurs ont également étudié ce modèle et montré une augmentation du ratio *Bacteroidetes*/*Firmicutes* ainsi qu'une augmentation de l'abondance des *Proteobacteria* comparé aux contrôles (Sgritta et al. 2019). De plus, seule la bêta diversité a été impactée par l'exposition au VPA, ce que nous retrouvons également dans notre étude mais seulement chez les mères exposées au VPA et supplémentées avec des AGPI-LC n-3. Ces travaux nous confortent davantage sur la capacité des AGPI n-3, qu'ils soient précurseurs ou à longue chaîne, dans la régulation de la composition du microbiote intestinal chez la descendance exposée au VPA *in utero*. Un modèle VPA très proche de celui que nous avons utilisé, avec une injection à E12 et une dose de 400mg/kg chez le rat a résulté en une baisse de la diversité microbienne (alpha diversité), une augmentation de l'abondance de certains phyla microbiens comme les *Proteobacteria*, les *Eubacteriacae*, les *Rikenellaceae* et les *Staphylococcaceae* ainsi qu'une baisse des *Enterobacteriaceae* (Liu et al. 2018). Récemment, Gu et ses collaborateurs ont également montré une augmentation de l'abondance

des *Proteobacteria* dans le modèle VPA rat (E12.5, 600mg/kg) (Gu et al. 2022). Ces résultats démontrent qu'une exposition unique au VPA donne lieu à des changements drastiques du microbiote intestinal qui peuvent être différents selon le temps d'injection, la dose utilisée et la souche de souris. Ces conséquences peuvent s'expliquer par la variété des mécanismes par lesquels le VPA agit sur l'organisme et qui ont été décrits dans la partie introductive de ce manuscrit. L'action inhibitrice du VPA sur les HDAC pendant le neurodéveloppement mène notamment à des modifications épigénétiques qui vont moduler de façon durable les aspects comportementaux, cellulaires et moléculaires. Dans le cadre de l'axe cerveau-intestin, l'inhibition sélective des HDAC a notamment permis de réduire l'inflammation dans plusieurs modèles animaux d'inflammation intestinale (Felice et al. 2015). Dans notre projet, des différences liées au microbiote intestinal n'ont pas été observées, ce qui promeut la supplémentation en AGPI n-3 et AGPI-LC n-3 comme protectrice.

De plus, malgré une abondance similaire de *Lactobacillus reuteri* chez les animaux VPA et les contrôles, une supplémentation de cette bactérie dans l'eau de boisson de l'animal pendant 4 semaines a permis normaliser la sociabilité des animaux VPA comparés aux contrôles (Sgritta et al. 2019). Ces études montrent un lien important entre certains phyla et souches bactériennes avec le comportement, notamment social, caractéristique des TSA. Les mécanismes en lien avec cette restauration du comportement social sont encore à l'étude mais des pistes concernant le système oxytocinergique et l'action directe sur le nerf vague sont privilégiées (Sgritta et al. 2019).

Ces changements de composition microbienne dans le modèle VPA, variant selon les études, ont pour conséquence de modifier les voies métaboliques associées au microbiote intestinal. Par exemple, 21 voies bactériennes ont été augmentées et 8 réduites chez les animaux exposés au VPA (400mg/kg) *in utero* à E12 (Liu et al. 2018). Parmi celles-ci, sont retrouvées une activation du système de sécrétion bactérien, la réplication et la réparation de l'ADN et une

diminution des voies des transporteurs ABC. Ces résultats indiquent que le VPA augmente l'activité de voies reliées à l'activité et la survie bactérienne (Liu et al. 2018).

Dans notre étude, nous avons également investigué les différentes voies métaboliques impactées par l'exposition au VPA et à la supplémentation en AGPI n-3, qu'ils soient précurseurs ou à longue chaîne. Par souci de clarté dans l'article soumis et présent dans ce manuscrit dans la section résultats, nous avons fait le choix de ne pas détailler ces résultats. Néanmoins, il apparaît intéressant ici de préciser que seules 5 voies métaboliques ont montré des différences entre les groupes expérimentaux chez la descendance mâle et femelle, avec une forte prévalence chez les femelles seules (4 voies métaboliques) et concernent majoritairement le métabolisme lipidique. Chez les mères, on retrouve de façon intéressante 215 voies métaboliques impactées, dont la vaste majorité sont liées à la synthèse des acides aminés et des vitamines. Ces résultats sont en accord avec l'absence de différences concernant le microbiote intestinal chez la descendance. Ceci conforte notre hypothèse principale selon laquelle une alimentation équilibrée en précurseurs LA/ALA est suffisante pour protéger contre les symptômes induits par une exposition au VPA *in utero*.

Ce projet apporte ici une nouvelle vision des thérapies nutritionnelles périnatales. Il s'inscrit dans le cadre d'études qui ont déjà montré l'importance de la période de supplémentation pour protéger des symptômes de TSA ou les réduire (Janssen & Kiliaan 2014; Moody et al. 2017; van De Sande et al. 2014). Il semble que la période d'exposition soit ici cruciale puisque chez la mère, le nombre de voies métaboliques impactées est corrélé à des modifications de la bêta diversité et de l'abondance de certains phyla bactériens comme les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria* sans modifications du comportement maternel. En effet, il a déjà été montré que des supplémentations en AGPI n-3, qu'elles soient sous forme de précurseurs ou de longues chaînes, étaient plus efficaces chez l'enfant dans le cadre de soucis GI ou dans les TSA de façon générale (Karhu et al. 2020).

Notre étude s'est intéressée aux différents stades de développement du modèle VPA jusqu'à l'âge adulte. Les TSA étant une pathologie qui persiste tout au long de la vie, il serait intéressant d'étudier le modèle VPA à un stade plus avancé en prenant exemple sur le projet collaboratif décrit dans les résultats de cette thèse, où le modèle Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ a été étudié à 10, 20 et 40 semaines (Thabault et al., soumis). De plus, il a déjà été montré qu'une supplémentation en AGPI n-3 sous forme de ALA tout au long de la vie avait résulté en une augmentation des niveaux de DHA et en une diminution des niveaux de AA dans le cortex, ce qui avait mené à une restauration du comportement émotionnel chez des souris CD1 adultes (3-5 mois) et âgées (19-23 mois) (Moranis et al. 2012). Néanmoins, cela n'avait pas été suffisant pour protéger contre des déficits en mémoire spatiale mais aussi contre une augmentation de l'expression d'IL-6, pro-inflammatoire, et une diminution d'IL-10, anti-inflammatoire, dans le cortex des souris âgées. En effet, les niveaux d'AGPI-LC n-6 comme l'AA sont augmentés avec l'âge et la neuroinflammation, menant à une augmentation de la production d'eicosanoïdes de nature pro-inflammatoire (Rapoport 2008; Yehuda et al. 2002). Il semblerait donc qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3 soit nécessaire dans le maintien des processus cognitifs avec l'âge.

# CHAPITRE 4 : Différences liées au sexe

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressées aux différences liées au sexe. En effet, même si un ratio de 3,7 hommes pour 1 femme avec des TSA existe, les femmes ont tendance à être sous-diagnostiquées et il apparaît de plus en plus clairement que les femmes sont également touchées par ce trouble neurodéveloppemental, mais de façon différente. Il existe à l'heure actuelle plusieurs théories mettant en cause le système neuroendocrinien dans les différences comportementales retrouvées par exemple (Auyeung et al. 2009; Baron-Cohen et al. 2015, 2020). Il a d'ailleurs été montré précédemment dans le laboratoire que les souris

femelles exposées au VPA ou au poly I:C *in utero* ne présentaient pas de difficultés de sociabilité contrairement aux mâles (Al Sagheer et al. 2018; Haida et al. 2019). L'utilisation d'autres critères de diagnostic seraient donc importants dans cette pathologie, notamment l'évaluation des symptômes moteurs, comme dans notre projet avec la marche et les stéréotypies motrices.

En réalisant une approche nutritionnelle visant à protéger des symptômes autistiques induits par l'exposition au VPA *in utero*, nous avons retrouvé des résultats différents entre mâles et femelles. Chez les mâles, les niveaux de DHA cérébelleux sont équivalents quel que soit le groupe expérimental. De façon intéressante, les femelles exposées au VPA avec une alimentation équilibrée ne contenant que des précurseurs en AGPI n-3 présentent des niveaux plus bas de DHA que les femelles exposées au même traitement mais avec une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3. Ces résultats semblent être en contradiction avec la littérature actuelle. En effet, il a été mis en évidence que les femmes auraient tendance à métaboliser l'ALA et le LA en AGPI-LC plus rapidement que les hommes, ce qui serait également retrouvé chez le rat (Childs et al. 2008). Une étude a notamment permis de montrer l'augmentation de la conversion de l'ALA en DHA et EPA i*n vitro* par un traitement au 17-β-estradiol (Alessandri et al. 2008). Les femmes et les femelles seraient donc les plus à même d'être sensibilisées à des modifications nutritionnelles de l'apport lipidique. Néanmoins, ces études ne se sont intéressées qu'aux tissus périphériques et seules quelques-unes se sont intéressées aux niveaux cérébraux et aux différences liées au sexe (Chen et al. 2020; Kitson et al. 2012; Rodriguez-Navas et al. 2016). Chen et ses collaborateurs ont d'ailleurs permis de mettre en évidence un effet du sexe sur les niveaux d'AA cérébelleux, mais pas sur les niveaux de DHA cérébelleux, en étudiant différentes concentrations d'ALA dans l'alimentation (Chen et al. 2020). Ces niveaux d'AGPI-LC dépendent encore une fois largement des AG essentiels, LA et ALA, présents dans

l'alimentation à des concentrations variables. Ces études mettent en exergue l'importance des AGPI précurseurs dans le métabolisme cérébral chez les deux sexes.

De plus, nous nous sommes ici intéressés au cervelet, qui est une région sujette à des différences entre les sexes. Le cervelet est une région où est fortement exprimé ROR-α, un facteur de transcription impliqué dans l'étiologie des TSA, et qui est retrouvé en faibles proportions dans le LCR des patients avec des TSA (Nguyen et al. 2010; Sarachana et al. 2011; Sarachana & Hu 2013). Sarachana et Hu ont d'ailleurs mis en évidence que ROR-α interagissait avec d'autres gènes liés aux TSA et aux différences liées au sexe comme *A2bp1*, *Cyp19a1*, *Hsd17b10*, *Itpr1*, *Nlgn1* (Sarachana & Hu 2013).

*Cyp19a1* code pour une enzyme appelée aromatase permettant la conversion d'androgènes en estrogènes (Sarachana et al. 2011). De fait, une baisse des niveaux de ROR-α mène à une baisse de l'activité de l'aromatase et donc à une augmentation de la testostérone. Des niveaux de testostérone sanguins élevés ont en effet été retrouvés chez des femmes diagnostiquées avec des TSA (Bejerot et al. 2012). De plus, *Hsd17b10* code pour une enzyme mitochondriale notamment impliquée dans l'oxydation des AG et des stéroïdes. Une baisse de cette enzyme a pour conséquence d'augmenter les niveaux d'androgènes et de diminuer les niveaux d'estrogènes, et serait liée à l'apparition de DI, de troubles moteurs, de difficultés liées au langage ainsi qu'un comportement atypique, des symptômes retrouvés chez les personnes atteintes de TSA (Lenski et al. 2007; Ofman et al. 2003; Reyniers et al. 1999). Ces résultats mettent en lumière l'implication de processus neuroendocriniens liés notamment au métabolisme des AGPI dans la physiopathologie des TSA. L'étude de ROR-α et de l'aromatase dans ce modèle se révèlerait utile pour déterminer les mécanismes liés au sexe sous-jacents dans la physiopathologie des TSA. Il aurait été intéressant dans notre étude de réaliser des approches de biologie moléculaire pour investiguer l'expression de l'aromatase et des récepteurs à estrogènes dans le cervelet des animaux de nos différents groupes expérimentaux.

L'utilisation de souris mutantes pour le gène codant ROR-α (*staggerer*) ont permis de mettre en évidence qu'il est impliqué dans diverses fonctions, parmi lesquelles se trouvent la différentiation des PC, le développement cérébelleux, la protection neuronale contre le stress oxydatif mais aussi contre l'inflammation (Boukhtouche et al. 2006a,b; Delerive et al. 2001; Gold et al. 2007; Hadj-Sahraoui et al. 2001; Harding et al. 1997). L'expression diminuée de cette protéine a donc des conséquences très importantes sur l'organisme. Suite à une exposition au LPS ou au TNF-α, les souris *staggerer* présentent des niveaux d'expression anormalement élevés d'ARNm d'IL-1β, IL-6 et IL-8 dans des cellules musculaires lisses primaires humaines (Delerive et al. 2001; Kopmels et al. 1992).

De plus, le développement des PC est en lien étroit avec l'expression de ROR-α et des niveaux d'hormones stéroïdiennes, notamment pendant la deuxième semaine postnatale chez le rongeur. En effet, à cette période les PC acquièrent leur arborisation très développée et caractéristique et passent par un élagage synaptique important des CF (Altman 1972; Kakizawa et al. 2000; Roth & Häusser 2001). Cette période est donc cruciale pour le développement des PC et une agression lors de cette période par le biais de PGE2 ou du LPS a donné lieu à une réduction de la croissance de l'arborisation dendritique des PC et un comportement social anormal chez les rats mâles exclusivement (Hoffman et al. 2016). Ces différents résultats montrent le lien entre les processus inflammatoires dans le cervelet et le sexe.

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de différences du nombre de PC quel que soit le groupe expérimental et le sexe. Néanmoins, notre analyse s'est focalisée sur deux régions uniquement et n'a pas permis d'obtenir des aspects liés à la fonctionnalité des PC. Il aurait été intéressant, comme dans le projet collaboratif sur le modèle Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ auquel j'ai participé, d'étudier la complexité de l'arborisation dendritique neuronale ainsi que la morphologie des épines dendritiques dans les PC (Thabault et al., soumis). Associés à ces analyses, il aurait été pertinent de réaliser des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* en patch clamp. En effet,

les PC présentent des récepteurs intranucléaires ER-β, les rendant sensibles aux niveaux d'estrogènes cérébelleux, notamment dans le cadre des processus neurodéveloppementaux (Belcher 2008). L'activation de ces récepteurs mène à l'activation de mGluR1a et promeut la neurotransmission au niveau de la synapse entre les FP et les PC. En conséquence, cela potentialise l'activité glutamatergique dans le cervelet (Hedges et al. 2018). De ce fait, chez les patients diagnostiqués avec des TSA ayant des niveaux élevés d'androgènes et des niveaux faibles d'estrogènes, l'activité glutamatergique serait grandement diminuée et notamment dans le cervelet. Ces analyses auraient pu nous permettre d'identifier des différences liées au sexe sur les PC, permettant de confirmer le lien entre les AGPI, l'inflammation et le système neuroendocrinien.

# CONCLUSIONS

Ce projet de thèse a porté sur l'étude des effets des AGPI n-3, qu'ils soient précurseurs ou à longue chaîne, sur les symptômes de TSA comportementaux, cellulaires et métaboliques du modèle murin d'exposition *in utero* au VPA.

Nous avons pu montrer par cette étude longitudinale que les AGPI n-3 précurseurs ou essentiels comme l'ALA étaient suffisants pour protéger contre les déficits comportementaux et la perte neuronale dans le cervelet caractéristiques des TSA et communément retrouvés dans le modèle VPA. Nos résultats semblent indiquer que les deux alimentations ont un effet protecteur et que les AGPI-LC n-3 ne semblent apporter que peu de bénéfices supplémentaires dans ce modèle.

Dans cette étude, des différences entre les sexes ont été retrouvées dans les troubles associés aux TSA, comme la marche et l'activité globale, mais aussi dans les profils lipidique et inflammatoire. Ce travail contribue ainsi à promouvoir, à son échelle, les études portant sur les deux sexes. Depuis 2009, la proportion d'études prenant en compte les deux sexes a quasiment doublé (Willingham 2022). Les femmes étant diagnostiquées avec des TSA beaucoup plus tardivement que les hommes, il apparaît nécessaire de s'intéresser aux comorbidités et troubles associés aux TSA pouvant permettre de poser un diagnostic plus rapidement. De façon générale, il semble important qu'en 2022 la santé des femmes soit autant étudiée que celle des hommes.

Notre étude sur le cervelet a permis de mettre en évidence des liens entre les comportements observés et les aspects cellulaires de cette région cérébrale. En effet, les deux alimentations utilisées ont permis de protéger contre des anomalies dans des comportements cérébelleux et contre des pertes cellulaires dans des régions liées aux fonctions cognitives et motrices (lobule VII). Cette étude témoigne d'un réel intérêt du cervelet dans l'étude des TSA et des thérapies nutritionnelles à base d'AGPI n-3. Davantage d'études sur ces aspects devraient pouvoir ouvrir des pistes mécanistiques plus avancées vers un traitement personnalisé des TSA.

Nous avons d'ailleurs tenté d'apporter des pistes de réflexion quant à l'aspect mécanistique des AGPI n-3 sur la physiopathologie des TSA. L'action des AGPI n-3 sur les processus reliés à l'inflammation, et notamment sur le microbiote intestinal sont d'un intérêt tout particulier. De plus, les AGPI n-3 et le VPA modulant la perméabilité de la paroi intestinale et la BHE, il serait intéressant d'investiguer davantage la vascularisation cérébelleuse. Par sa proximité avec le plexus choroïde, le cervelet est une région cérébrale en première ligne lors d'anomalies liées aux barrières protectrices cérébrales.

Ce projet a pu bénéficier d'étroites collaborations sur ces différents aspects et a permis d'obtenir des résultats complémentaires novateurs qui questionnent les processus de vulnérabilité aux TSA en fonction de l'alimentation maternelle et de la descendance.

Enfin, ce travail s'inscrit dans un projet plus vaste visant à explorer des stratégies thérapeutiques tout en étudiant de la façon la plus exhaustive possible ses répercussions sur la physiopathologie des TSA. En effet, ce projet de grande ampleur ne s'est pas seulement concentré sur l'étude des deux sexes de la descendance autistique mais également sur les mères exposées au VPA pendant la gestation et la lactation. Cet aspect du projet, même s'il n'en est pas le point central, m'a tenu à cœur et a permis de valoriser les résultats. Par ce suivi de plus de trois mois, des différences entre les mères et la descendance se sont dégagées. Il semblerait que les mères, des souris adultes, nécessitent une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3 pour contrebalancer les effets du VPA notamment sur les profils microbiens et lipidiques, cérébelleux et hépatiques. Néanmoins, ces différences n'ont pas donné lieu à des différences au niveau du comportement maternel qui auraient pu influencer le comportement de la descendance.

Pris dans leur ensemble, ces résultats promeuvent sur la période périnatale comme une période critique où des approches nutritionnelles, basées sur une supplémentation en AGPI n-

3 sous forme de précurseurs ou de longues chaînes, sont efficaces afin de protéger contre les symptômes de TSA induits par l'exposition au VPA *in utero*.

# ANNEXE

| | | 2-way ANOVA | F(1, 105) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Righting reflex Males | P9 | Interaction | 1,9480 | 0,1658 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9874 | *ns* |
| | | Nutrition | 6,8120 | 0,0104 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0171 | * |
| | | Treatment | 0,8390 | 0,3618 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,6480 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0569 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,8477 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,3405 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 105) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P11 | Interaction | 0,3757 | 0,5412 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,7748 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,0071 | 0,9331 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,9787 | *ns* |
| | | Treatment | 3,9940 | 0,0483 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,4796 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,5088 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9660 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,2363 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 105) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P13 | Interaction | 3,2150 | 0,0758 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9937 | *ns* |
| | | Nutrition | 3,2930 | 0,0137 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0089 | ** |
| | | Treatment | 4,7190 | 0,0321 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9956 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0052 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9635 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0246 | * |
| Righting reflex Females | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P9 | Interaction | 0,1687 | 0,6821 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,7279 | *ns* |
| | | Nutrition | 6,2310 | 0,0141 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1338 | *ns* |
| | | Treatment | 3,2650 | 0,0735 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9575 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0206 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,5044 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,4417 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P11 | Interaction | 2,1090 | 0,1493 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,6546 | *ns* |
| | | Nutrition | 8,0330 | 0,0055 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0090 | ** |
| | | Treatment | 9,0630 | 0,0032 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9992 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0007 | *** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,7914 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0166 | * |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P13 | Interaction | 1,0980 | 0,2971 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,4265 | *ns* |
| | | Nutrition | 13,8400 | 0,0003 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1910 | *ns* |
| | | Treatment | 1,0080 | 0,3176 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1968 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0088 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0098 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | >0,9999 | *ns* |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 114) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Eye opening Males | P12 | Interaction | 0,8741 | 0,3518 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,5664 | *ns* |
| | | Nutrition | 6,5710 | 0,0117 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,6210 | *ns* |
| | | Treatment | 0,8741 | 0,3518 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,6786 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0577 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0903 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | >0,9999 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 114) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P13 | Interaction | 6,9870 | 0,0094 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,4651 | *ns* |
| | | Nutrition | 19,0700 | <0,0001 | **** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| | | Treatment | 0,2912 | 0,5905 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0472 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0028 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,6504 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1052 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 114) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P14 | Interaction | 1,1900 | 0,2776 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,1142 | *ns* |
| | | Nutrition | 6,0190 | 0,0157 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0465 | * |
| | | Treatment | 4,6790 | 0,0326 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0104 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9966 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,7941 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,8665 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 114) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P15 | Interaction | 0,0751 | 0,7845 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,0979 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,9674 | 0,3274 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,7859 | *ns* |
| | | Treatment | 9,4850 | 0,0026 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0308 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,4243 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9636 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1856 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 114) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P16 | Interaction | 0,0727 | 0,7880 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,2939 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,1351 | 0,7139 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,9647 | *ns* |
| | | Treatment | 5,1930 | 0,0245 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,2701 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,5062 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9999 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,4718 | *ns* |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 116) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Eye opening Females | P12 | Interaction | 1,1780 | 0,2800 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,3709 | *ns* |
| | | Nutrition | 3,0330 | 0,0842 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1629 | *ns* |
| | | Treatment | 1,1780 | 0,2800 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1707 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9695 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9703 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | >0,9999 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 116) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P13 | Interaction | 0,3241 | 0,5703 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,4810 | *ns* |
| | | Nutrition | 22,1500 | <0,0001 | **** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0009 | *** |
| | | Treatment | 6,2960 | 0,0142 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,3717 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0293 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1729 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 116) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P14 | Interaction | 0,7000 | 0,4045 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9792 | *ns* |
| | | Nutrition | 18,8600 | <0,0001 | **** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0521 | *ns* |
| | | Treatment | 1,8610 | 0,1751 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0003 | *** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,1784 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0034 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,4519 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 116) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P15 | Interaction | 0,4327 | 0,5120 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,8982 | *ns* |
| | | Nutrition | 5,9800 | 0,0160 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1056 | *ns* |
| | | Treatment | 0,0756 | 0,7839 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1987 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,4477 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,6192 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9940 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 116) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | P16 | Interaction | 0,0060 | 0,9386 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9360 | *ns* |
| | | Nutrition | 6,3490 | 0,0131 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,2767 | *ns* |
| | | Treatment | 0,7436 | 0,3903 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0699 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,6677 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,2961 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9214 | *ns* |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Grooming Males** | Frequency | **2-way ANOVA** | F(1, 110) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | | Interaction | 0,6065 | 0,4378 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9797 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,1900 | 0,6638 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,9994 | *ns* |
| | | Treatment | 0,0493 | 0,8247 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9700 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9986 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,8456 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,8914 | *ns* |
| | Duration | **2-way ANOVA** | F(1, 110) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | | Interaction | 0,7574 | 0,3860 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9893 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,0768 | 0,7852 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,8277 | *ns* |
| | | Treatment | 1,7350 | 0,1905 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,8941 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,6429 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9782 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,4054 | *ns* |
| **Grooming Females** | Frequency | **2-way ANOVA** | F(1, 112) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | | Interaction | 0,0452 | 0,8319 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,8435 | *ns* |
| | | Nutrition | 2,0440 | 0,1556 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,8086 | *ns* |
| | | Treatment | 0,8044 | 0,3717 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9796 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,3886 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,6767 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9669 | *ns* |
| | Duration | **2-way ANOVA** | F(1, 112) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | | Interaction | 0,4909 | ########## | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,4781 | *ns* |
| | | Nutrition | 1,2840 | 0,2633 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,5403 | *ns* |
| | | Treatment | 6,9710 | 0,0095 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,6828 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0547 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9915 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1134 | *ns* |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 110) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rearing Males | Frequency | Interaction | 3,0130 | 0,0158 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,0089 | ** |
| | | Nutrition | 5,6890 | 0,0188 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | >0,9999 | *ns* |
| | | Treatment | 4,6070 | 0,0340 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9985 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0061 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0080 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9963 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 110) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | Duration | Interaction | 5,0370 | 0,0268 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,0198 | * |
| | | Nutrition | 5,9900 | 0,0160 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,9980 | *ns* |
| | | Treatment | 3,8760 | 0,0515 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9880 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0080 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0108 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9973 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 112) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| Rearing Females | Frequency | Interaction | 14,2000 | 0,0003 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| | | Nutrition | 5,1680 | 0,0249 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,6968 | *ns* |
| | | Treatment | 6,6820 | 0,0110 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9958 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0066 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0004 | *** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,8570 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 112) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | Duration | Interaction | 17,8600 | <0,0001 | **** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| | | Nutrition | 7,1540 | 0,0086 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,6689 | *ns* |
| | | Treatment | 5,8700 | 0,0170 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9977 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0039 | ** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,6152 | *ns* |

**3-CT Phase II Males**

| 3-way ANOVA | F(1, 216) | p value | summary |
|---|---|---|---|
| Sociability | 334,3000 | <0,0001 | **** |
| Treatment | 0,0876 | 0,7676 | *ns* |
| Nutrition | 0,1980 | 0,6568 | *ns* |
| Sociability x Treatment | 1,2450 | 0,2658 | *ns* |
| Sociability x Nutrition | 30,5300 | <0,0001 | **** |
| Treatment x Nutrition | 0,0286 | 0,8659 | *ns* |
| Sociability x Treatment x Nutrition | 8,1720 | 0,0047 | ** |

| Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* SC1:n-3 bal:VPA | 0,8424 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* SC1:n-3 supp:SAL | 0,9414 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* SC1:n-3 supp:VPA | 0,0246 | * |
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA *vs* SC1:n-3 supp:SAL | 0,1430 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:VPA *vs* SC1:n-3 supp:VPA | 0,5968 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:VPA *vs* NSC2:n3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA *vs* NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA *vs* NSC2:n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA *vs* NSC2:n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL *vs* SC1:n-3 supp:VPA | 0,0002 | *** |
| SC1:n-3 supp:SAL *vs* NSC2:n-3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL *vs* NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA *vs* NSC2:n-3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA *vs* NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA *vs* NSC2:n-3:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA *vs* NSC2:n-3:VPA | <0,0001 | **** |
| NSC2:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 bal:VPA | 0,9417 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:SAL | 0,9976 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:VPA | 0,0381 | * |
| NSC2:n-3 bal:VPA *vs* NSC2:n-3 supp:SAL | 0,5593 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:VPA *vs* NSC2:n-3 supp:VPA | 0,5140 | *ns* |
| NSC2:n-3 supp:SAL *vs* NSC2:n-3 supp:VPA | 0,0022 | ** |

**3-CT Phase II Females**

| 3-way ANOVA | F(1, 112) | p value | summary |
|---|---|---|---|
| Sociability | 211,0000 | <0,0001 | **** |
| Treatment | 0,0742 | 0,7855 | *ns* |
| Nutrition | 0,0057 | 0,9398 | *ns* |
| Sociability x Treatment | 1,1610 | 0,2824 | *ns* |
| Sociability x Nutrition | 0,7393 | 0,3908 | *ns* |
| Treatment x Nutrition | 0,2588 | 0,6114 | *ns* |
| Sociability x Treatment x Nutrition | 0,0569 | 0,8117 | *ns* |

| Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|
| SC1:n-3 bal:SAL vs SC1:n-3 bal:VPA | >0,9999 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:SAL vs SC1:n-3 supp:SAL | 0,9899 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:SAL vs SC1:n-3 supp:VPA | >0,9999 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA vs SC1:n-3 supp:SAL | 0,9555 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:VPA vs SC1:n-3 supp:VPA | 0,9996 | *ns* |
| SC1:n-3 bal:VPA vs NSC2:n3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA vs NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA vs NSC2:n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 bal:VPA vs NSC2:n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL vs SC1:n-3 supp:VPA | 0,9991 | *ns* |
| SC1:n-3 supp:SAL vs NSC2:n-3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL vs NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL vs NSC2:n-3 supp:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:SAL vs NSC2:n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA vs NSC2:n-3 bal:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA vs NSC2:n-3 bal:VPA | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA vs NSC2:n-3:SAL | <0,0001 | **** |
| SC1:n-3 supp:VPA vs NSC2:n-3:VPA | <0,0001 | **** |
| NSC2:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 bal:VPA | 0,9928 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 supp:SAL | >0,9999 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:SAL vs NSC2:n-3 supp:VPA | >0,9999 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:VPA vs NSC2:n-3 supp:SAL | 0,9946 | *ns* |
| NSC2:n-3 bal:VPA vs NSC2:n-3 supp:VPA | 0,9956 | *ns* |
| NSC2:n-3 supp:SAL vs NSC2:n-3 supp:VPA | >0,9999 | *ns* |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 109) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Paw Width Males | FL | Interaction | 17,6100 | <0,0001 | **** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,6855 | *ns* |
| | | Nutrition | 1,2660 | 0,2631 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1052 | *ns* |
| | | Treatment | 6,7450 | 0,0107 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0616 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,6971 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0029 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | FR | Interaction | 13,8400 | 0,0003 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,6183 | *ns* |
| | | Nutrition | 2,1570 | 0,1448 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,3376 | *ns* |
| | | Treatment | 3,8610 | 0,0520 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0976 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9830 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0039 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0004 | *** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HL | Interaction | 14,2500 | 0,0003 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,5151 | *ns* |
| | | Nutrition | 1,5930 | 0,2096 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,2432 | *ns* |
| | | Treatment | 3,1840 | 0,0771 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1704 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9803 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0054 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0006 | *** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HR | Interaction | 10,4300 | 0,0160 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,7870 | *ns* |
| | | Nutrition | 2,6420 | 0,1070 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,6288 | *ns* |
| | | Treatment | 3,5400 | 0,0626 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0871 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9976 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0079 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0020 | ** |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 109) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Paw Length Males | FL | Interaction | 15,8300 | 0,0001 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,8851 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,0021 | 0,9636 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0206 | * |
| | | Treatment | 8,5600 | 0,0042 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1884 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,1501 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0390 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | FR | Interaction | 15,4500 | 0,0001 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,7865 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,1344 | 0,7147 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,4340 | * |
| | | Treatment | 6,6670 | 0,0111 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1940 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,3614 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0237 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HL | Interaction | 10,8800 | 0,0013 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9446 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,5899 | 0,4441 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,2377 | *ns* |
| | | Treatment | 6,2240 | 0,0141 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1259 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,5794 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0362 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0003 | *** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HR | Interaction | 5,9530 | 0,0163 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | >0,9999 | *ns* |
| | | Nutrition | 2,6280 | 0,1079 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,9280 | *ns* |
| | | Treatment | 6,0720 | 0,0153 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0327 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9243 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0365 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0032 | ** |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 109) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Paw Area Males | FL | Interaction | 16,1100 | 0,0001 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,6514 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,0562 | 0,8131 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0285 | * |
| | | Treatment | 5,4500 | 0,0214 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,3057 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,4107 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0259 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | FR | Interaction | 14,7400 | 0,0002 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,6077 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,6981 | 0,4059 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1172 | *ns* |
| | | Treatment | 4,2460 | 0,0417 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,2079 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,8011 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0114 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0002 | *** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HL | Interaction | 10,9300 | 0,0013 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9972 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,0167 | 0,8974 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0880 | *ns* |
| | | Treatment | 9,1170 | 0,0032 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1482 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,1478 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1021 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | <0,0001 | **** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HR | Interaction | 8,0220 | 0,0055 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9431 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,7613 | 0,3848 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,4619 | *ns* |
| | | Treatment | 4,0860 | 0,0457 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,2082 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,8305 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0669 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0036 | ** |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 109) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stride Length Males | FL | Interaction | 4,8620 | 0,0296 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9472 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,7517 | 0,3879 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,7495 | *ns* |
| | | Treatment | 8,9680 | 0,0034 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0486 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,3980 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1709 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0016 | ** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | FR | Interaction | 4,3740 | 0,0388 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9373 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,7235 | 0,3969 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,7900 | *ns* |
| | | Treatment | 8,5950 | 0,0041 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0556 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,4178 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,2025 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0024 | ** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HL | Interaction | 7,0570 | 0,0091 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9984 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,1218 | 0,7278 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,3186 | *ns* |
| | | Treatment | 5,8410 | 0,0173 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,2441 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,4236 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0187 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0021 | ** |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HR | Interaction | 1,9800 | 0,1622 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9241 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,6116 | 0,4359 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,9880 | *ns* |
| | | Treatment | 5,3270 | 0,0229 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1607 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,6727 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,4578 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0413 | * |

| | | 2-way ANOVA | F(1, 109) | p value | summary | Tukey multiple comparisons | p value | summary |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Swing Time Males | FL | Interaction | 11,5400 | 0,0010 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,2111 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,8426 | 0,3607 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0089 | ** |
| | | Treatment | 0,3286 | 0,5677 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9955 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,6885 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,3460 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0252 | * |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | FR | Interaction | 11,6600 | 0,0009 | *** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,0893 | *ns* |
| | | Nutrition | 0,0671 | 0,7960 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,0913 | *ns* |
| | | Treatment | 0,0003 | 0,9960 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9982 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9973 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0704 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0717 | *ns* |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HL | Interaction | 5,0480 | 0,0267 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9967 | *ns* |
| | | Nutrition | 1,4230 | 0,2356 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,8597 | *ns* |
| | | Treatment | 3,7710 | 0,0547 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,1511 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9452 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,1014 | *ns* |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0161 | * |
| | | **2-way ANOVA** | F(1, 109) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | HR | Interaction | 9,3700 | 0,0028 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,9621 | *ns* |
| | | Nutrition | 2,7460 | 0,1004 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,7205 | *ns* |
| | | Treatment | 5,5680 | 0,0201 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,0370 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,9542 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0104 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0009 | *** |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Base of Support** | Forelimbs | **2-way ANOVA** | F(1, 111) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | | Interaction | 7,9260 | 0,0058 | ** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,0009 | *** |
| | | Nutrition | 3,0100 | 0,0855 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,8514 | *ns* |
| | | Treatment | 5,9370 | 0,0164 | * | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,9576 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0233 | * |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0144 | * |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9942 | *ns* |
| **Females** | Hindlimbs | **2-way ANOVA** | F(1, 111) | p value | summary | **Tukey multiple comparisons** | p value | summary |
| | | Interaction | 0,9321 | 0,3364 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 bal:VPA | 0,1403 | *ns* |
| | | Nutrition | 16,1100 | <0,0001 | **** | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:SAL | 0,1028 | *ns* |
| | | Treatment | 3,7300 | 0,0560 | *ns* | n-3 bal:SAL *vs* n-3 supp:VPA | 0,4227 | *ns* |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:SAL | 0,0004 | *** |
| | | | | | | n-3 bal:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,0054 | ** |
| | | | | | | n-3 supp:VPA *vs* n-3 supp:VPA | 0,9152 | *ns* |

# RÉFÉRENCES

# A


Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, Francheteau M, Matas E, et al. 2018. Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *Int J Neuropsychopharmacol*. 21(9):871–82

Alessandri J-M, Extier A, Langelier B, Perruchot M-H, Heberden C, et al. 2008. Estradiol Favors the Formation of Eicosapentaenoic Acid (20:5n-3) and n-3 Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) from Alpha-Linolenic Acid (18:3n-3) in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Lipids*. 43(1):19–28

Alfawaz H, Al-Onazi M, Bukhari SI, Binobead M, Othman N, et al. 2018. The Independent and Combined Effects of Omega-3 and Vitamin B12 in Ameliorating Propionic Acid Induced Biochemical Features in Juvenile Rats as Rodent Model of Autism. *J Mol Neurosci*. 66(3):403–13

Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E. 1997. Attentional Activation of the Cerebellum Independent of Motor Involvement. *Science*. 275(5308):1940–43

Allen G, Müller R-A, Courchesne E. 2004. Cerebellar function in autism: functional magnetic resonance image activation during a simple motor task. *Biol Psychiatry*. 56(4):269–78

Altman J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *Journal of Comparative Neurology*. 145(4):399–463

American Psychiatric Association. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fifth Edition*

Amminger GP, Berger GE, Schäfer MR, Klier C, Friedrich MH, Feucht M. 2007. Omega-3 fatty acids supplementation in children with autism: a double-blind randomized, placebo-controlled pilot study. *Biol Psychiatry*. 61(4):551–53

Angelucci F, Cechova K, Amlerova J, Hort J. 2019. Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 16(1):108

Anne SL, Govek E-E, Ayrault O, Kim JH, Zhu X, et al. 2013. WNT3 inhibits cerebellar granule neuron progenitor proliferation and medulloblastoma formation via MAPK activation. *PLoS One*. 8(11):e81769

ANSES. 2011 Rapport d'expertise collective - Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras

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

Asperger H. 1944. Die Autistisehen Psychopathen im Kindesalter. *Leiter der Heilpädagodischen Abteilung der Klinik*. 76–136

Atladóttir HÓ, Henriksen TB, Schendel DE, Parner ET. 2012. Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study. *Pediatrics*. 130(6):e1447-1454

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

# B


Babinska K, Celusakova H, Belica I, Szapuova Z, Waczulikova I, et al. 2020. Gastrointestinal Symptoms and Feeding Problems and Their Associations with Dietary Interventions, Food Supplement Use, and Behavioral Characteristics in a Sample of Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders. *IJERPH*. 17(17):6372

Badura A, Verpeut JL, Metzger JW, Pereira TD, Pisano TJ, et al. 2018. Normal cognitive and social development require posterior cerebellar activity. *Elife*. 7:e36401

Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, et al. 1998. A clinicopathological study of autism. *Brain*. 121 ( Pt 5):889–905

Bailey K, Rahimi Balaei M, Mehdizadeh M, Marzban H. 2013. Spatial and temporal expression of lysosomal acid phosphatase 2 (ACP2) reveals dynamic patterning of the mouse cerebellar cortex. *Cerebellum*. 12(6):870–81

Bailey W, Popovich B, Jones KL. 1995. Monozygotic twins discordant for the Russell-Silver syndrome. *Am J Med Genet*. 58(2):101–5

Baird G, Douglas HR, director a., Murphy MS. 2011. Recognising and diagnosing autism in children and young people: summary of NICE guidance. *BMJ*. 343(oct21 1):d6360–d6360

Baron-Cohen S. 2002. The extreme male brain theory of autism. *Trends Cogn Sci*. 6(6):248–54

Baron-Cohen S, Ashwin E, Ashwin C, Tavassoli T, Chakrabarti B. 2009. Talent in autism: hyper-systemizing, hyper-attention to detail and sensory hypersensitivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 364(1522):1377–83

Baron-Cohen S, Auyeung B, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Abdallah MW, et al. 2015. Elevated fetal steroidogenic activity in autism. *Mol Psychiatry*. 20(3):369–76

Baron-Cohen S, Tsompanidis A, Auyeung B, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, et al. 2020. Foetal oestrogens and autism. *Mol Psychiatry*. 25(11):2970–78

Bauman ML, Kemper TL. 2005. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci*. 23(2–3):183–87

Bazinet RP, Layé S. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci*. 15(12):771–85

Beekhof GC, Osório C, White JJ, van Zoomeren S, van der Stok H, et al. 2021. Differential spatiotemporal development of Purkinje cell populations and cerebellum-dependent sensorimotor behaviors. *eLife*. 10:e63668

Behesti H, Marino S. 2009. Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 41(3):435–45

Bejerot S, Eriksson JM, Bonde S, Eriksson E. 2012. The extreme male brain revisited: gender coherence in adults with autism spectrum disorder. . 8

Belcher SM. 2008. Rapid signaling mechanisms of estrogens in the developing cerebellum. *Brain Research Reviews*. 57(2):481–92

Bell JG, MacKinlay EE, Dick JR, MacDonald DJ, Boyle RM, Glen ACA. 2004. Essential fatty acids

and phospholipase A2 in autistic spectrum disorders. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 71(4):201–4

Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, et al. 2005. Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet*. 77(5):851–68

Ben-Sasson A, Gill SV. 2014. Motor and language abilities from early to late toddlerhood: using formalized assessments to capture continuity and discontinuity in development. *Res Dev Disabil*. 35(7):1425–32

Ben-Shalom R, Keeshen CM, Berrios KN, An JY, Sanders SJ, Bender KJ. 2017. Opposing Effects on NaV1.2 Function Underlie Differences Between SCN2A Variants Observed in Individuals With Autism Spectrum Disorder or Infantile Seizures. *Biol Psychiatry*. 82(3):224–32

Bent S, Bertoglio K, Ashwood P, Bostrom A, Hendren RL. 2011. A pilot randomized controlled trial of omega-3 fatty acids for autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 41(5):545–54

Bernier R, Steinman KJ, Reilly B, Wallace AS, Sherr EH, et al. 2016. Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genet Med*. 18(4):341–49

Betancur C, Sakurai T, Buxbaum JD. 2009. The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci*. 32(7):402–12

Bittker SS, Bell KR. 2018. Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: an epidemiological study. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 14:1399–1414

Bojović K, Ignjatović Đ -d ica, Soković Bajić S, Vojnović Milutinović D, Tomić M, et al. 2020. Gut Microbiota Dysbiosis Associated With Altered Production of Short Chain Fatty Acids in Children With Neurodevelopmental Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:223

Bolton P, Powell J, Rutter M, Buckle V, Yates JRW, et al. 1995. Autism, mental retardation, multiple exostoses and short stature in a female with 46,X,t(X;8)(p22.13;q22.1). *Psychiatric Genetics*. 5(2):51–56

Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. 2018. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci*. 12:49

Bossu J-L, Roux S. 2019. [The valproate model of autism]. *Med Sci (Paris)*. 35(3):236–43

Boukhtouche F, Janmaat S, Vodjdani G, Gautheron V, Mallet J, et al. 2006a. Retinoid-related orphan receptor alpha controls the early steps of Purkinje cell dendritic differentiation. *J Neurosci*. 26(5):1531–38

Boukhtouche F, Vodjdani G, Jarvis CI, Bakouche J, Staels B, et al. 2006b. Human retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha1 overexpression protects neurones against oxidative stress-induced apoptosis. *J Neurochem*. 96(6):1778–89

Bourgeron T. 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 16(9):551–63

Bourre J-. M, Pascal G, Durand G, Masson M, Dumont O, Piciotti M. 1984. Alterations in the Fatty Acid Composition of Rat Brain Cells (Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes) and of Subcellular Fractions (Myelin and Synaptosomes) Induced by a Diet Devoid of n-3 Fatty Acids. *J Neurochem*. 43(2):342–48

Bozek K, Wei Y, Yan Z, Liu X, Xiong J, et al. 2015. Organization and Evolution of Brain Lipidome Revealed by Large-Scale Analysis of Human, Chimpanzee, Macaque, and Mouse Tissues. *Neuron*. 85(4):695–702

Bozzatello, Rocca, Mantelli, Bellino. 2019. Polyunsaturated Fatty Acids: What is Their Role in Treatment of Psychiatric Disorders? *Int J Mol Sci*. 20(21):5257

Braitenberg V, Atwood RP. 1958. Morphological observations on the cerebellar cortex. *J Comp Neurol*. 109(1):1–33

Brian J, Bryson SE, Garon N, Roberts W, Smith IM, et al. 2008. Clinical assessment of autism in high-risk 18-month-olds. *Autism*. 12(5):433–56

Brito AR, Vasconcelos MM, Domingues RC, Hygino da Cruz LC, Rodrigues L de S, et al. 2009. Diffusion tensor imaging findings in school-aged autistic children. *J Neuroimaging*. 19(4):337–43

Broadhurst CL, Wang Y, Crawford MA, Cunnane SC, Parkington JE, Schmidt WF. 2002. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 131(4):653–73

Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. 2016. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*. 165(7):1762–75

Buffo A, Rossi F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol*. 109:42–63

Burdge GC, Wootton SA. 2002. Conversion of α-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*. 88(4):411–20

## C

Calder PC. 2002. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc*. 61(3):345–58

Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM. 2000. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res*. 41(3):465–72

Carter RA, Bihannic L, Rosencrance C, Hadley JL, Tong Y, et al. 2018. A Single-Cell Transcriptional Atlas of the Developing Murine Cerebellum. *Curr Biol*. 28(18):2910-2920.e2

Cassidy S, Bradley P, Robinson J, Allison C, McHugh M, Baron-Cohen S. 2014. Suicidal ideation and suicide plans or attempts in adults with Asperger's syndrome attending a specialist diagnostic clinic: a clinical cohort study. *Lancet Psychiatry*. 1(2):142–47

Chakrabarti B, Dudbridge F, Kent L, Wheelwright S, Hill-Cawthorne G, et al. 2009. Genes related to sex steroids, neural growth, and social-emotional behavior are associated with autistic traits, empathy, and Asperger syndrome. *Autism Res*. 2(3):21

Chalon S. 2006. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 75(4–5):259–69

Chalon S, Vancassel S, Zimmer L, Guilloteau D, Durand G. 2001. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*. 36(9):937–44

Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, et al. 2012. Comparative Lipidomic Analysis of Mouse and Human Brain with Alzheimer Disease. *J Biol Chem*. 287(4):2678–88

Chang Y-C, Quan J, Wood JJ. 2012. Effects of Anxiety Disorder Severity on Social Functioning in Children with Autism Spectrum Disorders. *J Dev Phys Disabil*. 24(3):235–45

Chataigner M, Mortessagne P, Lucas C, Pallet V, Layé S, et al. 2021. Dietary fish hydrolysate supplementation containing n-3 LC-PUFAs and peptides prevents short-term memory and stress response deficits in aged mice. *Brain Behav Immun*. 91:716–30

Chen CT, Haven S, Lecaj L, Borgstrom M, Torabi M, et al. 2020. Brain PUFA Concentrations Are Differentially Affected by Interactions of Diet, Sex, Brain Regions, and Phospholipid Pools in Mice. *The Journal of Nutrition*. 150(12):3123–32

Chen CT, Liu Z, Ouellet M, Calon F, Bazinet RP. 2009. Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 80(2–3):157–63

Chen S, Subbaiah PV. 2013. Regioisomers of phosphatidylcholine containing DHA and their potential to deliver DHA to the brain: role of phospholipase specificities. *Lipids*. 48(7):675–86

Cheng Y-S, Tseng P-T, Chen Y-W, Stubbs B, Yang W-C, et al. 2017. Supplementation of omega 3 fatty acids may improve hyperactivity, lethargy, and stereotypy in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis of randomized controlled trials. *NDT*. Volume 13:2531–43

Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC, Calder PC. 2008. Gender differences in the *n* -3 fatty acid content of tissues. *Proc. Nutr. Soc.* 67(1):19–27

Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem*. 274(1):471–77

Choi J, Yin T, Shinozaki K, Lampe JW, Stevens JF, et al. 2018. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 442(1–2):187–201

Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, et al. 2013. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*. 309(16):1696

Christensen J, Overgaard M, Parner ET, Vestergaard M, Schendel D. 2016. Risk of epilepsy and autism in full and half siblings-A population-based cohort study. *Epilepsia*. 57(12):2011–18

Clandinin MT, Parrott A, Van Aerde JE, Hervada AR, Lien E. 1992. Feeding preterm infants a formula containing C20 and C22 fatty acids simulates plasma phospholipid fatty acid composition of infants fed human milk. *Early Hum Dev*. 31(1):41–51

Clark-Taylor T, Clark-Taylor BE. 2004. Is autism a disorder of fatty acid metabolism? Possible dysfunction of mitochondrial beta-oxidation by long chain acyl-CoA dehydrogenase. *Med Hypotheses*. 62(6):970–75

Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 11ème révision (CIM-11), Organisation mondiale de la santé (OMS). 2019/2021. https://icd.who.int

Clayton EH, Hanstock TL, Garg ML, Hazell PL. 2007. Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of psychiatric illnesses in children and adolescents. *Acta Neuropsychiatr*. 19(2):92–103

Consalez GG, Goldowitz D, Casoni F, Hawkes R. 2020. Origins, Development, and Compartmentation

of the Granule Cells of the Cerebellum. *Front Neural Circuits*. 14:611841

Constantino JN, Zhang Y, Frazier T, Abbacchi AM, Law P. 2010. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *Am J Psychiatry*. 167(11):1349–56

Coste J, Blotiere P-O, Miranda S, Mikaeloff Y, Peyre H, et al. 2020. Risk of early neurodevelopmental disorders associated with in utero exposure to valproate and other antiepileptic drugs: a nationwide cohort study in France. *Sci Rep*. 10(1):17362

Cotney J, Muhle RA, Sanders SJ, Liu L, Willsey AJ, et al. 2015. The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nat Commun*. 6:6404

Courchesne E. 1997. Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. *Curr Opin Neurobiol*. 7(2):269–78

Crawford MA, Bloom M, Broadhurst CL, Schmidt WF, Cunnane SC, et al. 1999. Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids*. 34(S1):S39–47

Crippa A, Craig F, Busti Ceccarelli S, Mauri M, Grazioli S, et al. 2021. A multimethod approach to assessing motor skills in boys and girls with autism spectrum disorder. *Autism*. 25(5):1481–91

Cryan JF, Dinan TG. 2015. More than a gut feeling: the microbiota regulates neurodevelopment and behavior. *Neuropsychopharmacology*. 40(1):241–42

Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B, Clark AJ. 2001. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia*. 34(4):272–82

## D

D'Angelo E. 2018. Chapter 6 - Physiology of the cerebellum. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 154, eds. M Manto, TAGM Huisman, pp. 85–108. Elsevier

D'Angelo E, Koekkoek SKE, Lombardo P, Solinas S, Ros E, et al. 2009. Timing in the cerebellum: oscillations and resonance in the granular layer. *Neuroscience*. 162(3):805–15

Daniels JL, Longnecker MP, Rowland AS, Golding J, ALSPAC Study Team. University of Bristol Institute of Child Health. 2004. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology*. 15(4):394–402

Davis DJ, Hecht PM, Jasarevic E, Beversdorf DQ, Will MJ, et al. 2017. Sex-specific effects of docosahexaenoic acid (DHA) on the microbiome and behavior of socially-isolated mice. *Brain Behav Immun*. 59:38–48

Davoli-Ferreira M, Thomson CA, McCoy KD. 2021. Microbiota and Microglia Interactions in ASD. *Front Immunol*. 12:676255

De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, De Giacomo A, Gobbetti M. 2015. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes*. 6(3):207–13

De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, Giacomo AD, et al. 2013. Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. *PLOS ONE*. 8(10):e76993

de Blas AL. 1984. Monoclonal antibodies to specific astroglial and neuronal antigens reveal the cytoarchitecture of the Bergmann glia fibers in the cerebellum. *J Neurosci*. 4(1):265–73

de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. 2010. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299(2):G440-448

de la Torre-Aguilar MJ, Gomez-Fernandez A, Flores-Rojas K, Martin-Borreguero P, Mesa MD, et al. 2022. Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Intervention Modifies Plasma and Erythrocyte Omega-3 Fatty Acid Profiles But Not the Clinical Course of Children With Autism Spectrum Disorder: A Randomized Control Trial. *Front Nutr*. 9:790250

De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, et al. 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 515(7526):209–15

de Sena Cortabitarte A, Degenhardt F, Strohmaier J, Lang M, Weiss B, et al. 2017. Investigation of SHANK3 in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 174(4):390–98

de Theije CGM, van den Elsen LWJ, Willemsen LEM, Milosevic V, Korte-Bouws GAH, et al. 2015. Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice. *Neuropharmacology*. 90:15–22

Deckmann I, Schwingel GB, Fontes-Dutra M, Bambini-Junior V, Gottfried C. 2018. Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Neuroimmunomodulation*. 25(5–6):285–99

Decoeur F, Picard K, St-Pierre M-K, Greenhalgh AD, Delpech J-C, et al. 2022. N-3 PUFA Deficiency Affects the Ultrastructural Organization and Density of White Matter Microglia in the Developing Brain of Male Mice. *Front Cell Neurosci*. 16:802411

DeGeorge JJ, Noronha JG, Bell J, Robinson P, Rapoport SI. 1989. Intravenous injection of [1-14C]arachidonate to examine regional brain lipid metabolism in unanesthetized rats. *J Neurosci Res*. 24(3):413–23

Delerive P, Monté D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, et al. 2001. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep*. 2(1):42–48

Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Besnard J-C, Durand G. 2002. α-Linolenic Acid Dietary Deficiency Alters Age-Related Changes of Dopaminergic and Serotoninergic Neurotransmission in the Rat Frontal Cortex. *J Neurochem*. 66(4):1582–91

Delion S, Chalon S, Hérault J, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G. 1994. Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotoninergic neurotransmission in rats. *J Nutr*. 124(12):2466–76

DeMar JC, Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI. 2006. One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res*. 47(1):172–80

Deng W, Zou X, Deng H, Li J, Tang C, et al. 2015. The Relationship Among Genetic Heritability, Environmental Effects, and Autism Spectrum Disorders: 37 Pairs of Ascertained Twin Study. *J Child Neurol*. 30(13):1794–99

Descomps B. 2003. Les désaturases au cours du développement chez l'homme. *Cah Nutr Diet*. 38:384–91

Dieudonné S. 2016. Golgi Neurons. In *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders: A Primer For Graduate Students*, eds. DL Gruol, N Koibuchi, M Manto, M Molinari, JD Schmahmann, Y Shen, pp. 201–5. Cham: Springer International Publishing

D'Mello AM, Stoodley CJ. 2015. Cerebro-cerebellar circuits in autism spectrum disorder. *Front Neurosci*. 9:408

Dow R, Moruzzi G. 1958. *The Physiology and Pathology of the Cerebellum*. University of Minnesota Press. NED-New edition ed.

Duerden EG, Oatley HK, Mak-Fan KM, McGrath PA, Taylor MJ, et al. 2012. Risk factors associated with self-injurious behaviors in children and adolescents with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 42(11):2460–70

Duffney LJ, Zhong P, Wei J, Matas E, Cheng J, et al. 2015. Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep*. 11(9):1400–1413

Durand T, De Felice C, Signorini C, Oger C, Bultel-Poncé V, et al. 2013. F2-Dihomo-isoprostanes and brain white matter damage in stage 1 Rett syndrome. *Biochimie*. 95(1):86–90

## E

Eilander A, Hundscheid DC, Osendarp SJ, Transler C, Zock PL. 2007. Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: a review of human studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 76(4):189–203

El-Ansary A, Al-Ayadhi L. 2014. Relative abundance of short chain and polyunsaturated fatty acids in propionic acid-induced autistic features in rat pups as potential markers in autism. *Lipids Health Dis*. 13(1):140

Ellegood J, Pacey LK, Hampson DR, Lerch JP, Henkelman RM. 2010. Anatomical phenotyping in a mouse model of fragile X syndrome with magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 53(3):1023–29

Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V. 1999. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development*. 126(16):3585–96

Englund C, Kowalczyk T, Daza RAM, Dagan A, Lau C, et al. 2006. Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *J Neurosci*. 26(36):9184–95

Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, et al. 2015. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 18(7):965–77

Esparham AE, Smith T, Belmont JM, Haden M, Wagner LE, et al. 2015. Nutritional and Metabolic Biomarkers in Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Integrative Medicine*. 14(2):14

Essa MM, Braidy N, Vijayan KR, Subash S, Guillemin GJ. 2013. Excitotoxicity in the pathogenesis of autism. *Neurotox Res*. 23(4):393–400

Esteban-Figuerola P, Canals J, Fernández-Cao JC, Arija Val V. 2019. Differences in food consumption and nutritional intake between children with autism spectrum disorders and typically developing children: A meta-analysis. *Autism*. 23(5):1079–95

Evans DW, Canavera K, Kleinpeter FL, Maccubbin E, Taga K. 2005. The fears, phobias and anxieties of children with autism spectrum disorders and Down syndrome: comparisons with developmentally and chronologically age matched children. *Child Psychiatry Hum Dev*. 36(1):3–26

## F

Fan R, Kim J, You M, Giraud D, Toney AM, et al. 2020. α-Linolenic acid-enriched butter attenuated high fat diet-induced insulin resistance and inflammation by promoting bioconversion of n-3 PUFA and subsequent oxylipin formation. *J Nutr Biochem*. 76:108285

Fatemi SH. 2001. Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly. *Mol Psychiatry*. 6(2):129–33

Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, et al. 2002. Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cell Mol Neurobiol*. 22(2):171–75

Fedorova I, Salem N. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 75(4–5):271–89

Felice C, Lewis A, Armuzzi A, Lindsay JO, Silver A. 2015. Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 41(1):26–38

Feltham BA, Balogun KA, Cheema SK. 2019. Perinatal and postweaning diets high in omega-3 fatty acids have age- and sex-specific effects on the fatty acid composition of the cerebellum and brainstem of C57BL/6 mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 148:16–24

Ferguson BJ, Dovgan K, Severns D, Martin S, Marler S, et al. 2019. Lack of Associations Between Dietary Intake and Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder. *Front. Psychiatry*. 10:528

Fernández M, Sánchez-León CA, Llorente J, Sierra-Arregui T, Knafo S, et al. 2021. Altered Cerebellar Response to Somatosensory Stimuli in the Cntnap2 Mouse Model of Autism. *eNeuro*. 8(5):ENEURO.0333-21.2021

Fortunato JJ, da Rosa N, Martins Laurentino AO, Goulart M, Michalak C, et al. 2017. Effects of ω-3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccarides. *Nutrition*. 35:119–27

Fraguas D, Díaz-Caneja CM, Pina-Camacho L, Moreno C, Durán-Cutilla M, et al. 2019. Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 144(5):e20183218

Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, et al. 2014. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*. 506(7487):179–84

## G

Gabbs M, Leng S, Devassy JG, Monirujjaman M, Aukema HM. 2015. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. *Adv Nutr*. 6(5):513–40

Gallagher C, McCarthy FP, Ryan RM, Khashan AS. 2018. Maternal Alcohol Consumption During Pregnancy and the Risk of Autism Spectrum Disorders in Offspring: A Retrospective Analysis of the Millennium Cohort Study. *J Autism Dev Disord*. 48(11):3773–82

Gao J, Wang X, Sun H, Cao Y, Liang S, et al. 2016. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. *Int J Dev Neurosci*. 49(1):67–78

Garcia MC, Ward G, Ma YC, Salem N, Kim HY. 1998. Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. *J Neurochem*. 70(1):24–30

Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. 2009. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 195(1):7–14

Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. 2011. Perinatal and Neonatal Risk Factors for Autism: A Comprehensive Meta-analysis. *Pediatrics*. 128(2):344–55

Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. 2004. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 9(5):474–84

Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, et al. 2011. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet*. 7(11):e1002334

Gold DA, Gent PM, Hamilton BA. 2007. ROR alpha in genetic control of cerebellum development: 50 staggering years. *Brain Res*. 1140:19–25

Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res*. 50 Suppl:S86-90

Goldowitz D, Hamre KM, Przyborski SA, Ackerman SL. 2000. Granule cells and cerebellar boundaries: analysis of Unc5h3 mutant chimeras. *J Neurosci*. 20(11):4129–37

Gordon A, Geschwind DH. 2020. Human in vitro models for understanding mechanisms of autism spectrum disorder. *Mol Autism*. 11(1):26

Grabrucker S, Boeckers TM, Grabrucker AM. 2016. Gender Dependent Evaluation of Autism like Behavior in Mice Exposed to Prenatal Zinc Deficiency. *Front Behav Neurosci*. 10:37

Green CD, Ozguden-Akkoc CG, Wang Y, Jump DB, Olson LK. 2010. Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species. *J Lipid Res*. 51(7):1871–77

Green P, Yavin E. 1996. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. *Lipids*. 31(8):859–65

Grønn M, Christensen E, Hagve TA, Christophersen BO. 1991. Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells. *Biochim Biophys Acta*. 1081(1):85–91

Gu Y, Han Y, Ren S, Zhang B, Zhao Y, et al. 2022. Correlation among gut microbiota, fecal metabolites and autism-like behavior in an adolescent valproic acid-induced rat autism model. *Behav Brain Res*. 417:113580

Guesnet P, Alessandri J-M, Astorg P, Pifferi F, Lavialle M. 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL*. 12(5–6):333–43

Guo C, Witter L, Rudolph S, Elliott HL, Ennis KA, Regehr WG. 2016. Purkinje Cells Directly Inhibit Granule Cells in Specialized Regions of the Cerebellar Cortex. *Neuron*. 91(6):1330–41

Guo J, Shu G, Zhou L, Zhu X, Liao W, et al. 2013. Selective transport of long-chain fatty acids by FAT/CD36 in skeletal muscle of broilers. *Animal*. 7(3):422–29

# H

Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K, Mariani J. 2001. Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+/sg)). *Brain Res Dev Brain Res*. 126(2):201–9

Hagberg H, Gressens P, Mallard C. 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: Implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol*. 71(4):444–57

Haida O, Al Sagheer T, Balbous A, Francheteau M, Matas E, et al. 2019. Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Transl Psychiatry*. 9(1):124

Hall AC, Lucas FR, Salinas PC. 2000. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*. 100(5):525–35

Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, et al. 2011. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*. 68(11):1095–1102

Hameete BC, Fernández-Calleja JMS, de Groot MWGDM, Oppewal TR, Tiemessen MM, et al. 2021. The poly(I:C)-induced maternal immune activation model; a systematic review and meta-analysis of cytokine levels in the offspring. *Brain Behav Immun Health*. 11:100192

Hansel C, Linden DJ. 2000. Long-term depression of the cerebellar climbing fiber--Purkinje neuron synapse. *Neuron*. 26(2):473–82

Hansel C, Linden DJ, D'Angelo E. 2001. Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci*. 4(5):467–75

Harding HP, Atkins GB, Jaffe AB, Seo WJ, Lazar MA. 1997. Transcriptional activation and repression by RORalpha, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development. *Mol Endocrinol*. 11(11):1737–46

Hashimoto M, Hossain S, Shido O. 2006. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol Cell Biochem*. 293(1–2):1–8

Hedges VL, Chen G, Yu L, Krentzel AA, Starrett JR, et al. 2018. Local Estrogen Synthesis Regulates Parallel Fiber–Purkinje Cell Neurotransmission Within the Cerebellar Cortex. *Endocrinology*. 159(3):1328–38

Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. 2003. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*. 111(1):e39-44

Hérault J, Martineau J, Petit E, Perrot A, Sauvage D, et al. 1994. Genetic markers in autism: association study on short arm of chromosome 11. *J Autism Dev Disord*. 24(2):233–36

Herzfeld DJ, Kojima Y, Soetedjo R, Shadmehr R. 2015. Encoding of action by the Purkinje cells of the cerebellum. *Nature*. 526(7573):439–42

Hirono M. 2016. Lugaro Cells. In *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders: A Primer For*

*Graduate Students*, eds. DL Gruol, N Koibuchi, M Manto, M Molinari, JD Schmahmann, Y Shen, pp. 207–11. Cham: Springer International Publishing

Hoffman JF, Wright CL, McCarthy MM. 2016. A Critical Period in Purkinje Cell Development Is Mediated by Local Estradiol Synthesis, Disrupted by Inflammation, and Has Enduring Consequences Only for Males. *J Neurosci*. 36(39):10039–49

Horrobin DF. 1999. Lipid metabolism, human evolution and schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 60(5–6):431–37

Horvath A, Łukasik J, Szajewska H. 2017. ω-3 Fatty Acid Supplementation Does Not Affect Autism Spectrum Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Nutr*. 147(3):367–76

Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, et al. 2005. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*. 47(2):201–13

Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. 1997. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*. 389(6652):733–37

Howlin P, Moss P, Savage S, Rutter M. 2013. Social outcomes in mid- to later adulthood among individuals diagnosed with autism and average nonverbal IQ as children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 52(6):572-581.e1

Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, et al. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 155(7):1451–63

Hu Y-H, Zhang Y, Jiang L-Q, Wang S, Lei C-Q, et al. 2015. WDFY1 mediates TLR3/4 signaling by recruiting TRIF. *EMBO Rep*. 16(4):447–55

Huard JM, Forster CC, Carter ML, Sicinski P, Ross ME. 1999. Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development*. 126(9):1927–35

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

Hull C, Regehr WG. 2012. Identification of an inhibitory circuit that regulates cerebellar Golgi cell activity. *Neuron*. 73(1):149–58

# I

Idring S, Magnusson C, Lundberg M, Ek M, Rai D, et al. 2014. Parental age and the risk of autism spectrum disorders: findings from a Swedish population-based cohort. *Int J Epidemiol*. 43(1):107–15

Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, et al. 2001. Glia-synapse interaction through Ca2+-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*. 292(5518):926–29

Infante M, Sears B, Rizzo AM, Mariani Cerati D, Caprio M, et al. 2020. Omega-3 PUFAs and vitamin D co-supplementation as a safe-effective therapeutic approach for core symptoms of autism spectrum disorder: case report and literature review. *Nutr Neurosci*. 23(10):779–90

Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, et al. 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*. 515(7526):216–21

Ito M. 1984. The Cerebellum: The Cerebellum and Neural Control. *Science*. 229(4713):547–547

# J

Jaeger D. 2011. Mini-review: synaptic integration in the cerebellar nuclei--perspectives from dynamic clamp and computer simulation studies. *Cerebellum*. 10(4):659–66

Jain M, Ngoy S, Sheth SA, Swanson RA, Rhee EP, et al. 2014. A systematic survey of lipids across mouse tissues. *Endocrinol Metab*. 15

Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, et al. 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*. 34(1):27–29

Janssen CIF, Kiliaan AJ. 2014. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in Lipid Research*. 53:1–17

Jiang H-Y, Xu L-L, Shao L, Xia R-M, Yu Z-H, et al. 2016. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 58:165–72

Joffre C. 2019. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Resolution of Neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 10:16

Joffre C, Grégoire S, De Smedt V, Acar N, Bretillon L, et al. 2016. Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 114:1–10

Joffre C, Nadjar A, Lebbadi M, Calon F, Laye S. 2014. n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 91(1–2):1–20

Jones KL, Will MJ, Hecht PM, Parker CL, Beversdorf DQ. 2013. Maternal diet rich in omega-6 polyunsaturated fatty acids during gestation and lactation produces autistic-like sociability deficits in adult offspring. *Behav Brain Res*. 238:193–99

Joshi G, Wozniak J, Petty C, Martelon MK, Fried R, et al. 2013. Psychiatric comorbidity and functioning in a clinically referred population of adults with autism spectrum disorders: a comparative study. *J Autism Dev Disord*. 43(6):1314–25

Jump DB, Tripathy S, Depner CM. 2013. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annu Rev Nutr*. 33:249–69

# K

Kakizawa S, Yamasaki M, Watanabe M, Kano M. 2000. Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. *J Neurosci*. 20(13):4954–61

Kaliannan K, Wang B, Li X-Y, Kim K-J, Kang JX. 2015. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep*. 5(1):11276

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, Hudspeth AJ. 2012. *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw Hill / Medical. 5e édition ed.

Kanner L. 1943. Autistic disturbance of affective contact. *Nerv Child*. 2:217–50

Kanner L. 1968. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr*. 35(4):100–136

Karhu E, Zukerman R, Eshraghi RS, Mittal J, Deth RC, et al. 2020. Nutritional interventions for autism spectrum disorder. *Nutr Rev*. 78(7):515–31

Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. 2013. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol*. 16(1):91–103

Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, et al. 2016. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*. 537(7622):675–79

Kaur G, Molero JC, Weisinger HS, Sinclair AJ. 2013. Orally administered [$^{14}$C]DPA and [$^{14}$C]DHA are metabolised differently to [$^{14}$C]EPA in rats. *Br J Nutr*. 109(3):441–48

Kawamura Y, Takahashi O, Ishii T. 2008. Reevaluating the incidence of pervasive developmental disorders: impact of elevated rates of detection through implementation of an integrated system of screening in Toyota, Japan. *Psychiatry Clin Neurosci*. 62(2):152–59

Keller R, Basta R, Salerno L, Elia M. 2017. Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare association. *Neurol Sci*. 38(8):1353–61

Kerns CM, Maddox BB, Kendall PC, Rump K, Berry L, et al. 2015. Brief measures of anxiety in non-treatment-seeking youth with autism spectrum disorder. *Autism*. 19(8):969–79

Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, et al. 2004. PKC-θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 114(6):823–27

Kim YS, Leventhal BL, Koh Y-J, Fombonne E, Laska E, et al. 2011. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry*. 168(9):904–12

King BH, Hollander E, Sikich L, McCracken JT, Scahill L, et al. 2009. Lack of efficacy of citalopram in children with autism spectrum disorders and high levels of repetitive behavior: citalopram ineffective in children with autism. *Arch Gen Psychiatry*. 66(6):583–90

Kirov G, Rees E, Walters JTR, Escott-Price V, Georgieva L, et al. 2014. The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biol Psychiatry*. 75(5):378–85

Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, Bernardi MM. 2013. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One*. 8(12):e82244

Kitson AP, Smith TL, Marks KA, Stark KD. 2012. Tissue-specific sex differences in docosahexaenoic acid and Δ6-desaturase in rats fed a standard chow diet. *Appl Physiol Nutr Metab*. 37(6):1200–1211

Klibaite U, Kislin M, Verpeut JL, Bergeler S, Sun X, et al. 2022. Deep phenotyping reveals movement phenotypes in mouse neurodevelopmental models. *Mol Autism*. 13(1):12

Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. 2002. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev*. 16(20):2699–2712

Koirala S, Corfas G. 2010. Identification of novel glial genes by single-cell transcriptional profiling of Bergmann glial cells from mouse cerebellum. *PLoS One*. 5(2):e9198

Kopmels B, Mariani J, Delhaye-Bouchaud N, Audibert F, Fradelizi D, Wollman EE. 1992. Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J Neurochem*. 58(1):192–99

Kouser M, Speed HE, Dewey CM, Reimers JM, Widman AJ, et al. 2013. Loss of predominant Shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *J Neurosci*. 33(47):18448–68

Kremer JM. 2000. n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr*. 71(1 Suppl):349S-51S

Krishnan V, Stoppel DC, Nong Y, Johnson MA, Nadler MJS, et al. 2017. Autism gene Ube3a and seizures impair sociability by repressing VTA Cbln1. *Nature*. 543(7646):507–12

Kumar RA, Sudi J, Babatz TD, Brune CW, Oswald D, et al. 2010. A de novo 1p34.2 microdeletion identifies the synaptic vesicle gene RIMS3 as a novel candidate for autism. *J Med Genet*. 47(2):81–90

# L

Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, et al. 2011. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci*. 14(3):345–50

Lagarde M, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thiès F, et al. 2001. Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *J Mol Neurosci*. 16(2–3):201–4; discussion 215-221

Lai M-C, Lombardo MV, Baron-Cohen S. 2014. Autism. *The Lancet*. 383(9920):896–910

Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, et al. 2004. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet*. 74(3):552–57

Lauritzen L. 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*. 40(1–2):1–94

LeBarton ES, Iverson JM. 2013. Fine motor skill predicts expressive language in infant siblings of children with autism. *Dev Sci*. 16(6):815–27

Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, et al. 2014. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet*. 10(9):e1004580

Lei J, Lecarie E, Jurayj J, Boland S, Sukhodolsky DG, et al. 2019. Altered Neural Connectivity in Females, But Not Males with Autism: Preliminary Evidence for the Female Protective Effect from a Quality-Controlled Diffusion Tensor Imaging Study. *Autism Res*. 12(10):1472–83

Leng S, Winter T, Aukema HM. 2017. Dietary LA and sex effects on oxylipin profiles in rat kidney, liver, and serum differ from their effects on PUFAs. *J Lipid Res*. 58(8):1702–12

Lenski C, Kooy RF, Reyniers E, Loessner D, Wanders RJA, et al. 2007. The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. *Am J Hum Genet*. 80(2):372–77

Leonard HC, Bedford R, Charman T, Elsabbagh M, Johnson MH, et al. 2014. Motor development in children at risk of autism: a follow-up study of infant siblings. *Autism*. 18(3):281–91

Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, et al. 2016. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*. 15(6):789–828

Leung AW, Li JYH. 2018. The Molecular Pathway Regulating Bergmann Glia and Folia Generation in the Cerebellum. *Cerebellum*. 17(1):42–48

Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP. 2004. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol*. 270(2):393–410

Leyrolle Q, Decoeur F, Dejean C, Brière G, Leon S, et al. 2021. N-3 PUFA deficiency disrupts oligodendrocyte maturation and myelin integrity during brain development. *Glia*. 70(1):50–70

Li M, Fallin MD, Riley A, Landa R, Walker SO, et al. 2016. The Association of Maternal Obesity and Diabetes With Autism and Other Developmental Disabilities. *Pediatrics*. 137(2):e20152206

Li Q, Leung YO, Zhou I, Ho LC, Kong W, et al. 2015. Dietary supplementation with n-3 fatty acids from weaning limits brain biochemistry and behavioural changes elicited by prenatal exposure to maternal inflammation in the mouse model. *Transl Psychiatry*. 5(9):e641–e641

Liang J-S, Shimojima K, Ohno K, Sugiura C, Une Y, et al. 2009. A newly recognised microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behaviour, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2 Mb deletion. *J Med Genet*. 46(9):645–47

Limperopoulos C, Bassan H, Gauvreau K, Robertson RL, Sullivan NR, et al. 2007. Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors? *Pediatrics*. 120(3):584–93

Lin Y, Chen L, Lin C, Luo Y, Tsai RYL, Wang F. 2009. Neuron-derived FGF9 is essential for scaffold formation of Bergmann radial fibers and migration of granule neurons in the cerebellum. *Dev Biol*. 329(1):44–54

Linden DJ, Dickinson MH, Smeyne M, Connor JA. 1991. A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Neuron*. 7(1):81–89

Liput KP, Lepczyński A, Ogłuszka M, Nawrocka A, Poławska E, et al. 2021. Effects of Dietary n–3 and n–6 Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammation and Cancerogenesis. *Int J Mol Sci*. 22(13):6965

Liu F, Horton-Sparks K, Hull V, Li RW, Martínez-Cerdeño V. 2018. The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. *Mol Autism*. 9(1):61

Liu H-Q, Qiu Y, Mu Y, Zhang X-J, Liu L, et al. 2013. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. *Nutr Research*. 33(10):849–58

Liu JJ, Green P, John Mann J, Rapoport SI, Sublette ME. 2015. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: Implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Research*. 1597:220–46

Liu P, Wu L, Peng G, Han Y, Tang R, et al. 2019. Altered microbiomes distinguish Alzheimer's disease from amnestic mild cognitive impairment and health in a Chinese cohort. *Brain Behav Immun*. 80:633–43

Liu X, Malenfant P, Reesor C, Lee A, Hudson ML, et al. 2011. 2p15–p16.1 microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*. 19(12):1264–70

Lloyd KA. 2013. A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience*

*Horizons*. 6(0):hzt003–hzt003

Loomes R, Hull L, Mandy WPL. 2017. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 56(6):466–74

Löscher W. 2002. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*. 16(10):669–94

Lotrich FE, Sears B, McNamara RK. 2013. Anger induced by interferon-alpha is moderated by ratio of arachidonic acid to omega-3 fatty acids. *J Psychosom Res*. 75(5):475–83

Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. 2007. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 73(5):1576–85

Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42(2):145–51

Lum JAG, Shandley K, Albein-Urios N, Kirkovski M, Papadopoulos N, et al. 2021. Meta-Analysis Reveals Gait Anomalies in Autism. *Autism Res*. 14(4):733–47

Lyall K, Munger KL, O'Reilly ÉJ, Santangelo SL, Ascherio A. 2013. Maternal Dietary Fat Intake in Association With Autism Spectrum Disorders. *Am J Epidemiol*. 178(2):209–20

# M

Ma K, Qin L, Matas E, Duffney LJ, Liu A, Yan Z. 2018. Histone deacetylase inhibitor MS-275 restores social and synaptic function in a Shank3-deficient mouse model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 43(8):1779–88

Ma M, Ren Q, Yang J, Zhang K, Xiong Z, et al. 2019. Key role of soluble epoxide hydrolase in the neurodevelopmental disorders of offspring after maternal immune activation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 116(14):7083–88

Mabunga DFN, Gonzales ELT, Kim J, Kim KC, Shin CY. 2015. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol*. 24(4):285–300

Machold R, Fishell G. 2005. Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron*. 48(1):17–24

Machold RP, Kittell DJ, Fishell GJ. 2007. Antagonism between Notch and bone morphogenetic protein receptor signaling regulates neurogenesis in the cerebellar rhombic lip. *Neural Dev*. 2:5

Madore C, Leyrolle Q, Morel L, Rossitto M, Greenhalgh AD, et al. 2020. Essential omega-3 fatty acids tune microglial phagocytosis of synaptic elements in the mouse developing brain. *Nat Commun*. 11(1):6133

Maenner MJ, Shaw KA, Bakian AV, Bilder DA, Durkin MS, et al. 2021. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ*. 70(11):1–16

Magnusson C, Lundberg M, Lee BK, Rai D, Karlsson H, et al. 2016. Maternal vitamin D deficiency and the risk of autism spectrum disorders: population-based study. *BJPsych Open*. 2(2):170–72

Mahoney AD, Minter B, Burch K, Stapel-Wax J. 2013. Autism Spectrum Disorders and Prematurity: A Review Across Gestational Age Subgroups. *Adv Neonatal Care*. 13(4):247–51

Main SL, Kulesza RJ. 2017. Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience*. 340:34–47

Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis*. 26:27663

Mandy W, Chilvers R, Chowdhury U, Salter G, Seigal A, Skuse D. 2012. Sex differences in autism spectrum disorder: evidence from a large sample of children and adolescents. *J Autism Dev Disord*. 42(7):1304–13

Manicolo O, Brotzmann M, Hagmann-von Arx P, Grob A, Weber P. 2019. Gait in children with infantile/atypical autism: Age-dependent decrease in gait variability and associations with motor skills. *Eur J Paediatr Neurol*. 23(1):117–25

Mankad D, Dupuis A, Smile S, Roberts W, Brian J, et al. 2015. A randomized, placebo controlled trial of omega-3 fatty acids in the treatment of young children with autism. *Mol Autism*. 6(1):18

Martin RE, Bazan NG. 1992. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem*. 59(1):318–25

Martinat M, Rossitto M, Di Miceli M, Layé S. 2021. Perinatal Dietary Polyunsaturated Fatty Acids in Brain Development, Role in Neurodevelopmental Disorders. *Nutrients*. 13(4):1185

Masini E, Loi E, Vega-Benedetti AF, Carta M, Doneddu G, et al. 2020. An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in Autism Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity. *Int J Mol Sci*. 21(21):E8290

Masoli S, D'Angelo E. 2017. Synaptic Activation of a Detailed Purkinje Cell Model Predicts Voltage-Dependent Control of Burst-Pause Responses in Active Dendrites. *Front Cell Neurosci*. 11:278

Matas E, Maisterrena A, Thabault M, Balado E, Francheteau M, et al. 2021. Major motor and gait deficits with sexual dimorphism in a Shank3 mutant mouse model. *Mol Autism*. 12(1):2

Mattila M-L, Kielinen M, Linna S-L, Jussila K, Ebeling H, et al. 2011. Autism Spectrum Disorders According to DSM-IV-TR and Comparison With DSM-5 Draft Criteria: An Epidemiological Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 50(6):583-592.e11

Mazahery H, Conlon CA, Beck KL, Mugridge O, Kruger MC, et al. 2019. A Randomised-Controlled Trial of Vitamin D and Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in the Treatment of Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder in Children. *J Autism Dev Disord*. 49(5):1778–94

Mazahery H, Conlon CA, Beck KL, Mugridge O, Kruger MC, et al. 2020. Inflammation (IL-1β) Modifies the Effect of Vitamin D and Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids on Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder—An Exploratory Pilot Study. *Nutrients*. 12(3):661

Mazahery H, Stonehouse W, Delshad M, Kruger M, Conlon C, et al. 2017. Relationship between Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Randomised Controlled Trials. *Nutrients*. 9(2):155

McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG. 2014. Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 133(5):872–83

Meador KJ. 2008. Effects of in utero antiepileptic drug exposure. *Epilepsy Curr*. 8(6):143–47

Melton EM, Cerny RL, Watkins PA, DiRusso CC, Black PN. 2011. Human fatty acid transport protein 2a/very long chain acyl-CoA synthetase 1 (FATP2a/Acsvl1) has a preference in mediating the channeling of exogenous n-3 fatty acids into phosphatidylinositol. *J Biol Chem*. 286(35):30670–79

Meltzer A, Van de Water J. 2017. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 42(1):284–98

Meyer U. 2014. Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry*. 75(4):307–15

Meyer U, Feldon J, Dammann O. 2011. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res*. 69(5 Pt 2):26R-33R

Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. 2009. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 33(7):1061–79

Middleton FA, Strick PL. 1994. Anatomical Evidence for Cerebellar and Basal Ganglia Involvement in Higher Cognitive Function. *Science*. 266(5184):458–61

Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, et al. 2009. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet*. 46(4):242–48

Mitchell SJ, Silver RA. 2000. GABA spillover from single inhibitory axons suppresses low-frequency excitatory transmission at the cerebellar glomerulus. *J Neurosci*. 20(23):8651–58

Mittmann W, Häusser M. 2007. Linking synaptic plasticity and spike output at excitatory and inhibitory synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*. 27(21):5559–70

Miyazawa K, Himi T, Garcia V, Yamagishi H, Sato S, Ishizaki Y. 2000. A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci*. 20(15):5756–63

Modabbernia A, Sandin S, Gross R, Leonard H, Gissler M, et al. 2019. Apgar score and risk of autism. *Eur J Epidemiol*. 34(2):105–14

Moldrich RX, Leanage G, She D, Dolan-Evans E, Nelson M, et al. 2013. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav Brain Res*. 257:253–64

Moody L, Chen H, Pan Y-X. 2017. Early-Life Nutritional Programming of Cognition—The Fundamental Role of Epigenetic Mechanisms in Mediating the Relation between Early-Life Environment and Learning and Memory Process. *Adv Nutr*. 8(2):337–50

Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem*. 56(2):518–24

Moore SA, Yoder E, Spector AA. 1990. Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids from essential fatty acid precursors. *J Neurochem*. 55(2):391–402

Moranis A, Delpech J-C, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Guesnet P, et al. 2012. Long term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working

memory disruption and brain cytokine expression in aged mice. *Brain Behav Immun*. 26(5):721–31

Morris-Rosendahl DJ, Crocq M-A. 2020. Neurodevelopmental disorders—the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues Clin Neurosci*. 22(1):65–72

Mosconi MW, Kay M, D'Cruz A-M, Guter S, Kapur K, et al. 2010. Neurobehavioral Abnormalities in First-Degree Relatives of Individuals With Autism. *Arch Gen Psychiatry*. 67(8):830

Mosconi MW, Mohanty S, Greene RK, Cook EH, Vaillancourt DE, Sweeney JA. 2015a. Feedforward and Feedback Motor Control Abnormalities Implicate Cerebellar Dysfunctions in Autism Spectrum Disorder. *J Neurosci*. 35(5):2015–25

Mosconi MW, Wang Z, Schmitt LM, Tsai P, Sweeney JA. 2015b. The role of cerebellar circuitry alterations in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Front Neurosci*. 9:296

Mousain-Bosc M, Roche M, Polge A, Pradal-Prat D, Rapin J, Bali JP. 2006. Improvement of neurobehavioral disorders in children supplemented with magnesium-vitamin B6. II. Pervasive developmental disorder-autism. *Magnes Res*. 19(1):53–62

Mugnaini E, Diño MR, Jaarsma D. 1997. The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. *Prog Brain Res*. 114:131–50

Mugnaini E, Sekerková G, Martina M. 2011. The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Res Rev*. 66(1–2):220–45

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, et al. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 164(11):5998–6004

## N

Nadeem MS, Hosawi S, Alshehri S, Ghoneim MM, Imam SS, et al. 2021. Symptomatic, Genetic, and Mechanistic Overlaps between Autism and Alzheimer's Disease. *Biomolecules*. 11(11):1635

Napoli E, Wong S, Giulivi C. 2013. Evidence of reactive oxygen species-mediated damage to mitochondrial DNA in children with typical autism. *Mol Autism*. 4(1):2

Nariai T, DeGeorge JJ, Greig NH, Rapoport SI. 1991. In vivo incorporation of [9,10(-3)H]-palmitate into a rat metastatic brain-tumor model. *J Neurosurg*. 74(4):643–49

Naviaux RK, Zolkipli Z, Wang L, Nakayama T, Naviaux JC, et al. 2013. Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly(IC) mouse model. *PLoS One*. 8(3):e57380

Nevins JEH, Donovan SM, Snetselaar L, Dewey KG, Novotny R, et al. 2021. Omega-3 Fatty Acid Dietary Supplements Consumed During Pregnancy and Lactation and Child Neurodevelopment: A Systematic Review. *J Nutr*. 151(11):3483–94

Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK, et al. 2007. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health*. 28:235–58

Nguyen A, Rauch TA, Pfeifer GP, Hu VW. 2010. Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain. *FASEB J*. 24(8):3036–51

Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, et al. 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*. 509(7501):503–6

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Bloc'h JL, et al. 2008. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 92(3):272–83

Nicolini C, Fahnestock M. 2018. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol*. 299:217–27

Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, et al. 2011. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 29(11):1408–14

## O

O'Connor DL, Hall R, Adamkin D, Auestad N, Castillo M, et al. 2001. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics*. 108(2):359–71

Ofman R, Ruiter JPN, Feenstra M, Duran M, Poll-The BT, et al. 2003. 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency is caused by mutations in the HADH2 gene. *Am J Hum Genet*. 72(5):1300–1307

Olsen SF, Sørensen JD, Secher NJ, Hedegaard M, Henriksen TB, et al. 1992. Randomised controlled trial of effect of fish-oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet*. 339(8800):1003–7

Ornoy A. 2009. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol*. 28(1):1–10

Ozonoff S, Young GS, Belding A, Hill M, Hill A, et al. 2014. The broader autism phenotype in infancy: when does it emerge? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 53(4):398-407.e2

Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, et al. 2011. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 128(3):e488-495

## P

Pagnamenta AT, Wing K, Sadighi Akha E, Knight SJL, Bölte S, et al. 2009. A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *Eur J Hum Genet*. 17(5):687–92

Pardo CA, Eberhart CG. 2007. The Neurobiology of Autism. *Brain Pathology*. 17(4):434–47

Parellada M, Llorente C, Calvo R, Gutierrez S, Lázaro L, et al. 2017. Randomized trial of omega-3 for autism spectrum disorders: Effect on cell membrane composition and behavior. *Eur Neuropsychopharmacol*. 27(12):1319–30

Park C, Falls W, Finger JH, Longo-Guess CM, Ackerman SL. 2002. Deletion in Catna2, encoding alpha N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nat Genet*. 31(3):279–84

Parletta N, Niyonsenga T, Duff J. 2016. Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Correlations with Symptoms in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Autistic Spectrum Disorder and Typically Developing Controls. *PLoS ONE*. 11(5):e0156432

Patterson PH. 2009. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal

models. *Behav Brain Res*. 204(2):313–21

Patterson PH. 2011. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med*. 17(7):389–94

Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, et al. 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*. 472(7344):437–42

Pei Y, Brun SN, Markant SL, Lento W, Gibson P, et al. 2012. WNT signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum. *Development*. 139(10):1724–33

Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, et al. 2011. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*. 147(1):235–46

Persico AM, Napolioni V. 2013. Autism genetics. *Behav Brain Res*. 251:95–112

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 276(39):36734–41

Phillips JR, Hewedi DH, Eissa AM, Moustafa AA. 2015. The cerebellum and psychiatric disorders. *Front Public Health*. 3:66

Phillips NI, Fowler LJ. 1982. The effects of sodium valproate on γ-aminobutyrate metabolism and behaviour in naive and ethanolamine-O-sulphate pretreated rats and mice. *Biochem Pharmacol*. 31(13):2257–61

Pietropaolo S, Goubran M, Joffre C, Aubert A, Lemaire-Mayo V, et al. 2014. Dietary supplementation of omega-3 fatty acids rescues fragile X phenotypes in Fmr1-Ko mice. *Psychoneuroendocrinology*. 49:119–29

Pinot M, Vanni S, Pagnotta S, Lacas-Gervais S, Payet L-A, et al. 2014. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. . 6

Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, et al. 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 466(7304):368–72

Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, et al. 1999. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K+ channels. *Neuron*. 24(4):1037–47

Poolchanuan P, Unagul P, Thongnest S, Wiyakrutta S, Ngamrojanavanich N, et al. 2020. An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms. *Sci Rep*. 10(1):9300

Przyborski SA, Knowles BB, Ackerman SL. 1998. Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development*. 125(1):41–50

Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW, Blue ME, Pevsner J. 2001. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*. 57(9):1618–28

# Q

Qi K, Hall M, Deckelbaum RJ. 2002. Long-chain polyunsaturated fatty acid accretion in brain. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 5(2):133–38

Qin L, Ma K, Wang Z-J, Hu Z, Matas E, et al. 2018. Social deficits in Shank3-deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Nat Neurosci*. 21(4):564–75

# R

Rajcan-Separovic E, Harvard C, Liu X, McGillivray B, Hall JG, et al. 2007. Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. *J Med Genet*. 44(4):269–76

Ranger P, Ellenbroek BA. 2016. Perinatal Influences of Valproate on Brain and Behaviour: An Animal Model for Autism. *Curr Top Behav Neurosci*. 29:363–86

Rapoport SI. 2008. Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 79(3–5):153–56

Rapoport SI, Chang MC, Spector AA. 2001. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res*. 42(5):678–85

Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M. 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 77(5–6):251–61

Reeber SL, Arancillo MKV, Sillitoe RV. 2018. Bergmann glia are patterned into topographic molecular zones in the developing and adult mouse cerebellum. *Cerebellum*. 17(4):392–403

Rey C, Delpech JC, Madore C, Nadjar A, Greenhalgh AD, et al. 2019. Dietary n-3 long chain PUFA supplementation promotes a pro-resolving oxylipin profile in the brain. *Brain Behav Immun*. 76:17–27

Reyniers E, Van Bogaert P, Peeters N, Vits L, Pauly F, et al. 1999. A new neurological syndrome with mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior maps to chromosome Xp11. *Am J Hum Genet*. 65(5):1406–12

Risch N, Hoffmann TJ, Anderson M, Croen LA, Grether JK, Windham GC. 2014. Familial recurrence of autism spectrum disorder: evaluating genetic and environmental contributions. *Am J Psychiatry*. 171(11):1206–13

Rivet TT, Matson JL. 2011. Review of gender differences in core symptomatology in autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord*. 5(3):957–76

Robea M-A, Luca A-C, Ciobica A. 2020. Relationship between Vitamin Deficiencies and Co-Occurring Symptoms in Autism Spectrum Disorder. *Medicina (Kaunas)*. 56(5):E245

Robinson EB, Lichtenstein P, Anckarsäter H, Happé F, Ronald A. 2013. Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(13):5258–62

Rodriguez-Navas C, Morselli E, Clegg DJ. 2016. Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Mol Metab*. 5(8):680–89

Romoli M, Mazzocchetti P, D'Alonzo R, Siliquini S, Rinaldi VE, et al. 2019. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Curr Neuropharmacol*. 17(10):926–46

Rose DR, Yang H, Serena G, Sturgeon C, Ma B, et al. 2018. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav Immun*. 70:354–68

Rosen BN, Lee BK, Lee NL, Yang Y, Burstyn I. 2015. Maternal Smoking and Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *J Autism Dev Disord*. 45(6):1689–98

Rosen NJ, Yoshida CK, Croen LA. 2007. Infection in the first 2 years of life and autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 119(1):e61-69

Rosen TE, Mazefsky CA, Vasa RA, Lerner MD. 2018. Co-occurring psychiatric conditions in autism spectrum disorder. *Int Rev Psychiatry*. 30(1):40–61

Rossignol DA, Frye RE. 2012. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 17(3):290–314

Rossignol DA, Genuis SJ, Frye RE. 2014. Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl Psychiatry*. 4:e360

Roth A, Häusser M. 2001. Compartmental models of rat cerebellar Purkinje cells based on simultaneous somatic and dendritic patch-clamp recordings. *J Physiol*. 535(Pt 2):445–72

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

Ruigrok ANV, Lai M-C. 2020. Sex/gender differences in neurology and psychiatry: Autism. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 175, pp. 283–97. Elsevier

Russell JK, Jones CK, Newhouse PA. 2019. The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging. *Neurotherapeutics*. 16(3):649–65

## S

Sacrey L-AR, Bennett JA, Zwaigenbaum L. 2015. Early Infant Development and Intervention for Autism Spectrum Disorder. *J Child Neurol*. 30(14):1921–29

Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K. 2003. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology*. 144(10):4466–77

Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, et al. 2011. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 70(5):863–85

Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, et al. 2015. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*. 87(6):1215–33

Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. 2014. The familial risk of autism. *JAMA*. 311(17):1770–77

Sankar R. 2007. Teratogenicity of antiepileptic drugs: role of drug metabolism and pharmacogenomics.

*Acta Neurol Scand*. 116(1):65–71

Santamaria F, Tripp PG, Bower JM. 2007. Feedforward inhibition controls the spread of granule cell-induced Purkinje cell activity in the cerebellar cortex. *J Neurophysiol*. 97(1):248–63

Sarachana T, Hu VW. 2013. Genome-wide identification of transcriptional targets of RORA reveals direct regulation of multiple genes associated with autism spectrum disorder. *Mol Autism*. 4(1):14

Sarachana T, Xu M, Wu R-C, Hu VW. 2011. Sex Hormones in Autism: Androgens and Estrogens Differentially and Reciprocally Regulate RORA, a Novel Candidate Gene for Autism. *PLOS ONE*. 6(2):e17116

Sarn N, Thacker S, Lee H, Eng C. 2021. Germline nuclear-predominant Pten murine model exhibits impaired social and perseverative behavior, microglial activation, and increased oxytocinergic activity. *Mol Autism*. 12(1):41

Sasahara K, Shikimi H, Haraguchi S, Sakamoto H, Honda S, et al. 2007. Mode of action and functional significance of estrogen-inducing dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis in the developing Purkinje cell. *J Neurosci*. 27(28):7408–17

Sastry PS. 1985. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog Lipid Res*. 24(2):69–176

Schmahmann JD. 2019. The cerebellum and cognition. *Neurosci Lett*. 688:62–75

Schonewille M, Gao Z, Boele H-J, Veloz MFV, Amerika WE, et al. 2011. Reevaluating the role of LTD in cerebellar motor learning. *Neuron*. 70(1):43–50

Schuchardt JP, Huss M, Stauss-Grabo M, Hahn A. 2010. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur J Pediatr*. 169(2):149–64

Schultz ST, Klonoff-Cohen HS, Wingard DL, Akshoomoff NA, Macera CA, et al. 2006. Breastfeeding, infant formula supplementation, and Autistic Disorder: the results of a parent survey. *Int Breastfeed J*. 1(1):16

Schwartz RD, Yu X. 1992. Inhibition of GABA-gated chloride channel function by arachidonic acid. *Brain Res*. 585(1):405–10

Schwartzer JJ, Careaga M, Onore CE, Rushakoff JA, Berman RF, Ashwood P. 2013. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. *Transl Psychiatry*. 3:e240

Scott R, Sánchez-Aguilera A, van Elst K, Lim L, Dehorter N, et al. 2019. Loss of Cntnap2 Causes Axonal Excitability Deficits, Developmental Delay in Cortical Myelination, and Abnormal Stereotyped Motor Behavior. *Cereb Cortex*. 29(2):586–97

Serhan CN. 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 510(7503):92–101

Servadio M, Manduca A, Melancia F, Leboffe L, Schiavi S, et al. 2018. Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *Eur Neuropsychopharmacol*. 28(1):85–96

Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, et al. 2019. Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*. 101(2):246-259.e6

Shi L, Smith SEP, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. 2009. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav Immun*. 23(1):116–23

Shim HG, Jang S-S, Kim SH, Hwang EM, Min JO, et al. 2018. TNF-α increases the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje cells through elevating glutamate release in Bergmann Glia. *Sci Rep*. 8(1):11589

Shimamoto C, Ohnishi T, Maekawa M, Watanabe A, Ohba H, et al. 2014. Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. *Hum Mol Genet*. 23(24):6495–6511

Siafis S, Çıray O, Wu H, Schneider-Thoma J, Bighelli I, et al. 2022. Pharmacological and dietary-supplement treatments for autism spectrum disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Mol Autism*. 13(1):10

Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol*. 11:25

Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. 2008. Psychiatric Disorders in Children With Autism Spectrum Disorders: Prevalence, Comorbidity, and Associated Factors in a Population-Derived Sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 47(8):921–29

Simopoulos AP. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 56(8):365–79

Simopoulos AP. 2011. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol*. 44(2):203–15

Sliwinski S, Croonenberghs J, Christophe A, Deboutte D, Maes M. 2006. Polyunsaturated fatty acids: do they have a role in the pathophysiology of autism? *Neuro Endocrinol Lett*. 27(4):465–71

Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 27(40):10695–702

Sobaniec-Lotowska ME. 2001. Ultrastructure of Purkinje cell perikarya and their dendritic processes in the rat cerebellar cortex in experimental encephalopathy induced by chronic application of valproate. *Int J Exp Pathol*. 82(6):337–48

Sokolova E, Oerlemans AM, Rommelse NN, Groot P, Hartman CA, et al. 2017. A Causal and Mediation Analysis of the Comorbidity Between Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autism Spectrum Disorder (ASD). *J Autism Dev Disord*. 47(6):1595–1604

Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME. 2001. Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron*. 31(4):557–68

Spector AA. 2001. Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J Mol Neurosci*. 16(2–3):159–65; discussion 215-221

Speed HE, Kouser M, Xuan Z, Reimers JM, Ochoa CF, et al. 2015. Autism-Associated Insertion Mutation (InsG) of Shank3 Exon 21 Causes Impaired Synaptic Transmission and Behavioral Deficits. *J Neurosci*. 35(26):9648–65

Starling P, Charlton K, McMahon AT, Lucas C. 2015. Fish intake during pregnancy and foetal neurodevelopment--a systematic review of the evidence. *Nutrients*. 7(3):2001–14

Subashini C, Dhanesh SB, Chen C-M, Riya PA, Meera V, et al. 2017. Wnt5a is a crucial regulator of neurogenesis during cerebellum development. *Sci Rep*. 7(1):42523

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):11055–69

Sugathan A, Biagioli M, Golzio C, Erdin S, Blumenthal I, et al. 2014. CHD8 regulates neurodevelopmental pathways associated with autism spectrum disorder in neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(42):E4468-4477

Sugihara I. 2018. Crus I in the Rodent Cerebellum: Its Homology to Crus I and II in the Primate Cerebellum and Its Anatomical Uniqueness Among Neighboring Lobules. *Cerebellum*. 17(1):49–55

Sugihara I, Fujita H. 2013. Peri- and Postnatal Development of Cerebellar Compartments in the Mouse. *Cerebellum*. 12(3):325–27

Sun GY, Simonyi A, Fritsche KL, Chuang DY, Hannink M, et al. 2018. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 136:3–13

## T

Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E. 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res*. 964(1):136–43

Tammimies K, Marshall CR, Walker S, Kaur G, Thiruvahindrapuram B, et al. 2015. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA*. 314(9):895

Tang S, Wang Y, Gong X, Wang G. 2015. A Meta-Analysis of Maternal Smoking during Pregnancy and Autism Spectrum Disorder Risk in Offspring. *Int J Environ Res Public Health*. 12(9):10418–31

Tartaglione AM, Villani A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L, Ricceri L, et al. 2022. Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes. *Transl Psychiatry*. 12(1):384

Teitelbaum P, Teitelbaum O, Nye J, Fryman J, Maurer RG. 1998. Movement analysis in infancy may be useful for early diagnosis of autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(23):13982–87

Thabault M, Turpin V, Maisterrena A, Jaber M, Egloff M, Galvan L. 2022. Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: From Clinical Observations to Animal Models. *Int J Mol Sci*. 23(4):2294

Thion MS, Garel S. 2017. On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. *Curr Opin Neurobiol*. 47:121–30

Thomson CA, Nibbs RJ, McCoy KD, Mowat AM. 2020. Immunological roles of intestinal mesenchymal cells. *Immunology*. 160(4):313–24

Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijsdijk F. 2016. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry*. 57(5):585–95

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, et al. 1999. Reeler/Disabled-like

disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*. 97(6):689–701

Turner T, Pihur V, Chakravarti A. 2011. Quantifying and Modeling Birth Order Effects in Autism. *PLOS ONE*. 6(10):e26418

## V

Vaillant C, Monard D. 2009. SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum*. 8(3):291–301

van De Sande MMH, van Buul VJ, Brouns FJPH. 2014. Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. *Nutr Res Rev*. 27(2):199–214

van der Wurff ISM, Meyer BJ, de Groot RHM. 2020. Effect of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (n-3 LCPUFA) Supplementation on Cognition in Children and Adolescents: A Systematic Literature Review with a Focus on n-3 LCPUFA Blood Values and Dose of DHA and EPA. *Nutrients*. 12(10):3115

van Elst K, Brouwers JF, Merkens JE, Broekhoven MH, Birtoli B, et al. 2019. Chronic dietary changes in n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios cause developmental delay and reduce social interest in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 29(1):16–31

van Elst K, Bruining H, Birtoli B, Terreaux C, Buitelaar JK, Kas MJ. 2014. Food for thought: Dietary changes in essential fatty acid ratios and the increase in autism spectrum disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 45:369–78

van Steensel FJA, Bögels SM, Perrin S. 2011. Anxiety Disorders in Children and Adolescents with Autistic Spectrum Disorders: A Meta-Analysis. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 14(3):302–17

Vancassel S, Durand G, Barthélémy C, Lejeune B, Martineau J, et al. 2001. Plasma fatty acid levels in autistic children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 65(1):1–7

Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 57(1):67–81

Vasa RA, Carroll LM, Nozzolillo AA, Mahajan R, Mazurek MO, et al. 2014. A systematic review of treatments for anxiety in youth with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 44(12):3215–29

Vasa RA, Mazurek MO, Mahajan R, Bennett AE, Bernal MP, et al. 2016. Assessment and Treatment of Anxiety in Youth With Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*. 137 Suppl 2:S115-123

Veroniki AA, Rios P, Cogo E, Straus SE, Finkelstein Y, et al. 2017. Comparative safety of antiepileptic drugs for neurological development in children exposed during pregnancy and breast feeding: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open*. 7(7):e017248

Vilensky JA, Damasio AR, Maurer RG. 1981. Gait disturbances in patients with autistic behavior: a preliminary study. *Arch Neurol*. 38(10):646–49

Voigt RG, Mellon MW, Katusic SK, Weaver AL, Matern D, et al. 2014. Dietary Docosahexaenoic Acid Supplementation in Children With Autism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 58(6):715–22

Vuong HE, Pronovost GN, Williams DW, Coley EJL, Siegler EL, et al. 2020. The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature*. 586(7828):281–86

# W


Wallis JG, Watts JL, Browse J. 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci*. 27(9):467–73

Wan H, Zhang C, Li H, Luan S, Liu C. 2018. Association of maternal diabetes with autism spectrum disorders in offspring. *Medicine (Baltimore)*. 97(2):e9438

Wang C, Geng H, Liu W, Zhang G. 2017. Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 96(18):e6696

Wang J, Xu Y, Hou J, Li J, Xing J, et al. 2020. Effects of Dietary Fat Profile on Gut Microbiota in Valproate Animal Model of Autism. *Front Med*. 7:151

Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. 2012. Elevated Fecal Short Chain Fatty Acid and Ammonia Concentrations in Children with Autism Spectrum Disorder. *Dig Dis Sci*. 57(8):2096–2102

Wang SS-H, Kloth AD, Badura A. 2014. The cerebellum, sensitive periods, and autism. *Neuron*. 83(3):518–32

Wang VY, Rose MF, Zoghbi HY. 2005a. Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron*. 48(1):31–43

Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J, Jump DB. 2005b. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res*. 46(4):706–15

Washizaki K, Smith QR, Rapoport SI, Purdon AD. 1994. Brain arachidonic acid incorporation and precursor pool specific activity during intravenous infusion of unesterified [3H]arachidonate in the anesthetized rat. *J Neurochem*. 63(2):727–36

Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, et al. 1998. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci*. 10(3):976–88

Wei H, Alberts I, Li X. 2013. Brain IL-6 and autism. *Neuroscience*. 252:320–25

Weinstock-Guttman B, Baier M, Park Y, Feichter J, Lee-Kwen P, et al. 2005. Low fat dietary intervention with omega-3 fatty acid supplementation in multiple sclerosis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 73(5):397–404

Weiser MJ, Mucha B, Denheyer H, Atkinson D, Schanz N, et al. 2016. Dietary docosahexaenoic acid alleviates autistic-like behaviors resulting from maternal immune activation in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 106:27–37

Werling DM. 2016. The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biol Sex Differ*. 7(1):58

Willingham E. 2022. The fraught quest to account for sex in biology research. *Nature*. 609(7927):456–59

Witter L, Rudolph S, Pressler RT, Lahlaf SI, Regehr WG. 2016. Purkinje Cell Collaterals Enable Output Signals from the Cerebellar Cortex to Feed Back to Purkinje Cells and Interneurons. *Neuron*. 91(2):312–19

Won H, Mah W, Kim E. 2013. Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: focus on neuronal synapses. *Front Mol Neurosci*. 6:19

Wong CCY, Meaburn EL, Ronald A, Price TS, Jeffries AR, et al. 2014. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol Psychiatry*. 19(4):495–503

Wu Y-Q, Dang R-L, Tang M-M, Cai H-L, Li H-D, et al. 2016. Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Alleviates Doxorubicin-Induced Depressive-Like Behaviors and Neurotoxicity in Rats: Involvement of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Nutrients*. 8(4):243

## X

Xiao Y, Huang Y, Chen Z-Y. 2005. Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr*. 94(4):544–50

Xuan ICY, Hampson DR. 2014. Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. *PLoS One*. 9(8):e104433

## Y

Yamada K, Watanabe M. 2002. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int*. 77(2):94–108

Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC-M. 2011. Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int*. 58(3):321–29

Yehuda S, Rabinovitz S, Lcarasso R, Imostofsky D. 2002. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging*. 23(5):843–53

Yuasa S. 1996. Bergmann glial development in the mouse cerebellum as revealed by tenascin expression. *Anat Embryol (Berl)*. 194(3):223–34

Yui K, Imataka G, Kawasak Y, Yamada H. 2016. Increased ω-3 polyunsaturated fatty acid/arachidonic acid ratios and upregulation of signaling mediator in individuals with autism spectrum disorders. *Life Sciences*. 145:205–12

Yui K, Koshiba M, Nakamura S, Kobayashi Y. 2012. Effects of Large Doses of Arachidonic Acid Added to Docosahexaenoic Acid on Social Impairment in Individuals With Autism Spectrum Disorders: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial. *J Clin Psychopharmacol*. 32(2):200–206

## Z

Zacherl JR, Mihalik SJ, Chace DH, Christensen TC, Robinson LJ, Blair HC. 2014. Elaidate, an 18-Carbon *trans* -Monoenoic Fatty Acid, Inhibits β-Oxidation in Human Peripheral Blood Macrophages: Elaidate Inhibits β-Oxidation in Human Macrophages. *J Cell Biochem*. 115(1):62–70

Zacherl JR, Tourkova I, St. Croix CM, Robinson LJ, Peck Palmer OM, et al. 2015. Elaidate, an 18-Carbon Trans-monoenoic Fatty Acid, but Not Physiological Fatty Acids Increases Intracellular $Zn^{2+}$ in Human Macrophages: Elaidate activates macrophage Zn<sup>2+<sup> signaling. *J Cell*

*Biochem*. 116(4):524–32

Zawadzka A, Cieślik M, Adamczyk A. 2021. The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *Int J Mol Sci*. 22(21):11516

Zeise ML, Kasparow S, Zieglgänsberger W. 1991. Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. *Brain Res*. 544(2):345–48

Zerbo O, Leong A, Barcellos L, Bernal P, Fireman B, Croen LA. 2015. Immune mediated conditions in autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 46:232–36

Zhu Y, Mordaunt CE, Yasui DH, Marathe R, Coulson RL, et al. 2019. Placental DNA methylation levels at CYP2E1 and IRS2 are associated with child outcome in a prospective autism study. *Hum Mol Genet*. 28(16):2659–74

Zimmerman AW. 2000. Commentary: Immunological Treatments for Autism: In Search of Reasons for Promising Approaches. *J Autism Dev Disord*. 30(5):481–84

Zordan P, Croci L, Hawkes R, Consalez GG. 2008. Comparative analysis of proneural gene expression in the embryonic cerebellum. *Dev Dyn*. 237(6):1726–35

# Résumé

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux, touchant 3,7 hommes pour 1 femme en France, qui se traduisent principalement par des déficits persistants dans les comportements sociaux ainsi que par des comportements, intérêts et activités restreints et répétés. L'exposition à des facteurs environnementaux, notamment durant la période périnatale, serait majoritairement impliquée dans l'étiologie des TSA. On retrouve parmi ces facteurs, des composés pharmacologiques comme l'acide valproïque (VPA) (Dépakine®), dont l'exposition *in utero* augmente la probabilité de développer des TSA. Le cervelet, par ses fonctions cognitives et motrices, représente l'une des structures les plus impliquées dans la physiopathologie des TSA par des modifications anatomiques, cellulaires et moléculaires chez des patients et modèles animaux de TSA. Chez des enfants diagnostiqués avec des TSA, une supplémentation en acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 (AGPI-LC n-3) sur plusieurs mois permet de réduire certains symptômes. L'objectif de cette thèse a donc été de déterminer si une alimentation supplémentée en AGPI-LC n-3 en période périnatale pouvait protéger des symptômes de TSA induits par une exposition *in utero* au VPA chez la souris. Nous avons réalisé une étude longitudinale portant sur l'évolution des symptômes sociaux et moteurs ainsi que sur les corrélats cellulaires et moléculaires cérébelleux chez des souris mâles et femelles. Ces travaux ont permis de mettre en évidence qu'une alimentation équilibrée en AGPI n-3 et n-6 permet de protéger contre l'apparition de symptômes comportementaux, la perte de neurones cérébelleux et la dysbiose du microbiote intestinal.



# Summary

Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders, affecting 3.7 men for every woman in France, which mainly result in persistent deficits in social behaviors as well as restricted and repeated behaviors, interests, and activities. Exposure to environmental factors, especially during the perinatal period, are mainly involved in the etiology of ASD. These factors include pharmacological compounds such as valproic acid (VPA) (Dépakine®), which *in utero* exposure increases the risk to develop ASD. The cerebellum, through its cognitive and motor functions, represents one of the structures most involved in the pathophysiology of ASD at the anatomical, cellular, and molecular levels in both patients and animal models. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) n-3 supplementation over several months has been shown to reduce ASD symptoms in children. This thesis aim was to determine whether a diet supplemented with n-3 LCPUFA throughout the perinatal period could protect against ASD symptoms induced by *in utero* exposure to VPA in mice. We performed a longitudinal study on the evolution of social and motor symptoms as well as cerebellar cellular and molecular correlates in male and female mice. This work has demonstrated that a balanced diet of n-3 and n-6 PUFA protects against the appearance of behavioral symptoms, loss of cerebellar neurons and intestinal microbiota dysbiosis.