



HAL
open science

Altérations sexe-dépendantes de la nociception dans un modèle d'autisme induit par le valproate

Lucien Ruelle-Le Glaunec

► **To cite this version:**

Lucien Ruelle-Le Glaunec. Altérations sexe-dépendantes de la nociception dans un modèle d'autisme induit par le valproate. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ032 . tel-04212143

HAL Id: tel-04212143

<https://theses.hal.science/tel-04212143v1>

Submitted on 20 Sep 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.

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPECIALITE NEUROSCIENCES

Institut des neurosciences cellulaires et intégratives

**ALTERATIONS SEXE-DEPENDANTES DE LA
NOCICEPTION DANS UN MODELE MURIN
D'AUTISME INDUIT PAR LE VALPROATE**

Présentée par

Lucien RUELLE-LE GLAUNEC

soutenu le : 13 mars 2023

Sous la codirection de

Mr. Rémy SCHLICHTER, Professeur de l'Université de Strasbourg
Mr. Jean-Louis BOSSU, Directeur de recherche au CNRS.

Membres du jury

Mme Susanna PIETROPAOLO	Directrice de Recherche au CNRS, Bordeaux	Rapporteur externe
Mr Emmanuel BOURINET	Directeur de recherche au CNRS, Montpellier	Rapporteur externe
Mme Ipek YALCIN	Directrice de recherche au CNRS, Strasbourg	Examineur
Mme Anne BARON	Chargée de recherche au CNRS, Nice	Examineur

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à l'obtention d'un contrat doctoral de 3 ans et à l'obtention de prolongations COVID-19 de la part du ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur ainsi que de la part d'EURIDOL (ANR-17-EURE-0022).

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Un grand merci à Susanna Pietropaolo, Emmanuel Bourinet, Ypek Yalcin et Anne Baron pour le temps que vous avez accordé à ce travail qui est le fruit de plusieurs années d'expériences, d'analyses, et d'interminables réflexions. Un travail qui m'aura autant passionné qu'il m'a découragé par moments mais dont je suis fier aujourd'hui à la fois des résultats scientifiques novateurs qu'il apporte que de ses défauts et biais. Je suis honoré de pouvoir le partager et le défendre devant vous.

Je souhaite ensuite remercier mes deux directeurs de thèse, Rémy Schlichter, Jean-Louis Bossu ainsi que les membres de l'équipe.

Rémy, merci d'avoir accepté l'idée que je fasse une thèse avec toi dès le premier courriel que je t'ai envoyé alors que je venais tout juste de rejoindre le Master. Lors de notre premier entretien je me souviens que nous avons discuté d'un projet d'étude des contrôles descendants noradrénergiques utilisant de l'optogénétique et de l'électrophysiologie. Quelle a été ma tête quand tu me proposais un sujet sur les troubles du spectre autistique. Aujourd'hui je suis content d'avoir accepté car il m'a apporté beaucoup et est vraiment très cohérent avec la voie de recherche translationnelle que je souhaite suivre. Merci aussi de m'avoir entraîné pour décrocher mon master et ma bourse de thèse sur un projet que nous avons inventé en quelques semaines. C'est comique quand je pense que tu avais refusé ma demande de stage d'été faute de « personnel pour encadrer » lorsque j'étais encore en médecine, et qu'aujourd'hui je soutiens ma thèse sous ta direction, le destin peut-être ...

Jean-Louis, merci d'avoir accepté d'encadrer un étudiant que tu ne connaissais ni d'Adam ni d'Eve. Merci de m'avoir accordé une confiance absolue pour la réalisation de ce projet sans jamais brider mes idées ou mes suggestions. Merci de m'avoir appris à devenir un apprenti « chasseur de bruit » et à pister le moindre problème sur le poste de patch. Je crois aujourd'hui être plutôt fier et satisfait de notre collaboration et de l'avancée de ce projet démarré alors de zéro. Et quand par moment je perdais espoir dans le projet tu as toujours su trouver les mots, quitte à mettre la main à la pâte et aux analyses et tu es toujours resté optimiste et ça je m'en souviendrais durant toute ma carrière.

Merci à **Viviane** qui m'a pris sous son aile dès mon arrivé en thèse. Merci pour tes conseils, ton expérience, sans cela j'aurais certainement abandonné le projet dès ma première année.

Merci à **Chantal** pour son aide précieuse lorsque j'avais la tête perdue dans tous les placards.

Merci à **Catherine** pour ses blagues toujours de bon goût et avec qui je partage ma gourmandise pour le chocolat.

Merci à **Yannick** et **Virginie** pour leur collaboration expérimentale vis-à-vis de mon projet.

Merci à **Sylvain** pour son aide lorsque j'apprenais l'électrophysiologie et qui m'expliquait la théorie du patch-clamp. Je peux l'avouer aujourd'hui j'ai souvent hoché la tête alors que je n'avais pas compris un mot par peur de paraître idiot. Merci pour les moments de convivialité au labo, les pirateries COVID, les excursions en forêt et pour les bières partagées sur le campus à discuter avec de charmants

individus nommés Fabrice. Je regrette de n'avoir pas pu conserver cette relation jusqu'à la fin de ma thèse mais te souhaite le meilleurs dans tes futurs projets.

Merci à **Perrine** pour toutes les choses qu'elle m'a apprises mais aussi pour toutes celles qu'elle ne m'a pas apprises parce que j'étais trop têtu pour lui demander ! Merci pour les blagues douteuses que tu gardais en tête pour les partager avec moi car c'était « mon humour », je ne sais pas si c'est une bonne chose mais j'ai beaucoup apprécié nos interactions. Tu étais toujours disponible lorsque je te demandais de l'aide, quitte à souiller ta belle blouse de Boston avec de l'urine murine. Merci particulièrement pour tes mots encourageant pour l'inquiétude que tu as manifestée à mon égard lors de ces dernières semaines d'écriture.

Je tiens aussi à remercier l'animalerie du Chronobiotron et plus particulièrement à **Dominique** et **Nicolas** qui se sont toujours démenés pour que mon projet puisse avancer.

Je voudrais ensuite remercier les étudiants avec qui j'ai pu tisser des liens au cours de ces années ;

Merci à **Patrick** pour son aide précieuse lorsque je me suis retrouvé seul devant le poste d'imagerie du calcium avec mes cultures qui m'a permis de pouvoir tirer des données avec cet appareil venu d'un autre monde.

Merci à **Benjamin** avec qui j'ai partagé quelques breuvages anisés toujours rafraichissants ce qui n'a pas toujours mené aux discussions les plus rationnelles mais toujours divertissantes.

Merci à **Karim** pour sa bonne humeur contagieuse, toujours motivé pour un Bailey ou une bonne pipe.

Merci à **Lou** pour avoir été la grande sœur du labo, qui m'a appris à quoi ressemblaient les interneurons de la corne dorsale, et qu'une cellule qui ne veut ne pas se laisser patcher sera peut-être un peu plus coopératives après quelques insultes. Merci de m'avoir toujours gardé une petite moelle sacrée pour que je puisse casser des pipettes. Tu as été le meilleur public que je n'ai jamais eu pour mes blagues pourries, et tu as rendu les après-midis de patch presque agréables même si tu étais chiante quand tu avais déjà tes 4 cellules alors que je n'avais fait qu'essayer les fuites de mon poste pendant deux heures.

Un énorme merci à mes partenaires de belotte préférés, les vrais, le sang ;

Merci à **Valod** pour son cognac, son humour et sa rigueur scientifique. Un sacré cocktail, souvent explosif qui transforme une journée de merde en une bonne journée. Merci d'avoir rempli la boîte à délice parce que c'est sympa les amandes de louise mais ce n'est pas ce que j'appelle un « délice » !

Merci à **Robin**, membre fondateur de la BAC... Tout repose désormais sur tes épaules. Merci pour toutes les soirées jeux de société, les débats sur la science ou même les randonnées en forêt noire. Je sais que la période qui arrive va être difficile pour toi mais tu peux compter sur moi pour des conseils, du soutien ou même juste pour une bière en terrasse. Je t'encourage aussi à continuer ton combat pour la vulgarisation scientifique et l'enseignement, ça te va vraiment bien !

Merci à **Louise**.

Merci aux autres **copains de l'institut** pour les apéros sur la pelouse, les *Friday meetings* et les madeleines gratuites au chariot : Marion, Angel, Théo, Sarah, Gilles, Quentin, Léa, Etienne, Valentin, Charlotte, Camille, Guillaume... et les oubliés car il doit me rester seulement 2 ou 3 neurones fonctionnels après cette période de rédaction et ils ne sont pas dans l'hippocampe...

Merci aux personnes importantes dans ma vie extrascientifique ;

A mon meilleur ami **Maël**, que je n'ai pas assez vu à mon goût ces dernières années. Il va en falloir des treks pour rattraper le temps perdu. Merci d'avoir été là, chaque fois qu'on se voyait ça me faisait énormément de bien!

A **mes parents** qui m'ont toujours soutenu dans mes projets et que j'aime énormément. Eux qui faisaient lire ma publication aux invités qu'ils recevaient et qui ont essayé de comprendre ce que je faisais pendant quatre ans. Promis je retourne en médecine, ça sera plus facile à expliquer. Mention spéciale à mon papa qui a corrigé les fautes d'orthographe, s'il manque des « s », c'est lui le coupable.

A **ma petite sœur** avec qui j'ai aussi beaucoup de temps à rattraper. Merci d'avoir décroché ton téléphone lorsque ça n'allait pas, promis je te rendrais la pareille !

To **Lizette**, for fueling me during all these years. Thank you for making "us" possible by coming to France. Thank you for the amazing time we shared during quarantine. I could not have done it without you. Every night that I felt discouraged by work, you were a breeze of fresh air in my hair, a ray of sun on my skin and you put a smile on my face. I can't wait to go on an adventure with you now that this formality is done and over with!

A **mon Parrain** qui n'aura pas la chance de voir ce travail terminé à quelques mois près mais qui a tenu à le célébrer en avance autour d'un verre de champagne dans ses derniers instants de vie. Parrain, tu m'as souvent servi de modèle et m'a inspiré énormément pour devenir la personne que je suis. J'espère qu'aujourd'hui, où que tu sois, tu es fier de ton filleul.

Finalement, le plus grand des merci à tic (ou tac je ne sais pas), *my PhD bestie*, ma sœur de thèse, **Louise**. Ensemble, on a commencé le même jour et on soutient à deux jours d'écart. Encore une fois tu es avant moi, la haine ! On aura tout partagé de A à Z au cours de cette thèse, même une chambre d'hôtel, et je ne sais pas si tout ce cheminement aurait la même saveur sans toi. Je ne sais pas s'il y a un sujet dont on n'a pas parlé, tu as toujours été là pour m'écouter et me reconforter lorsque ça n'allait pas, lorsque je voulais me plaindre, faire des blagues vaseuses ou même des bruits bizarres car c'était mon quart d'heure de folie et qu'il était temps de rentrer. Tu m'as parfois saoulé à rentrer trop tôt du bar ou à me prendre la tête pour de la politique dès 8h du matin mais en vrai quand j'y pense ça me fait rire. Il faut bien l'avouer, on est quand même d'accord sur 99% du monde quoi ($p < 0.0001$, test exact de Fisher). Je suis heureux aujourd'hui d'avoir trouvé une amie aussi précieuse et si je devais garder une seule chose de cette thèse ça serait notre amitié. J'espère qu'on pourra un jour installer nos *tiny houses* l'une à côté de l'autre et parler pendant des heures autour d'un thé, pour toi seulement, moi je trouve ça fade ! Je tiens aussi à te féliciter pour ton travail et ta persévérance. Félicitation **Dr. Louise Vial-Markiewicz**, tu es la meilleure !



*Illustration réalisée par l'algorithme d'intelligence artificielle DALI en utilisant les mots clés de ce projet :
« Douleur, Autisme & Différences sexuelles »*

RESUME

L'autisme est une pathologie neurodéveloppementale complexe associée à une mosaïque de symptômes regroupés sous le terme de troubles du spectre autistiques (TSA). Elle est caractérisée par des déficits de communication et d'interaction sociale ainsi que la présence de centres d'intérêts restreints et de comportements répétitifs. Les individus atteints de TSA présentent fréquemment des anomalies sensorielles. Il peut s'agir d'hyper, d'hypo-réactivité ou d'un intérêt atypique pour des informations sensorielles provenant de l'environnement. La nociception est une modalité sensorielle capitale pour la survie de l'organisme. Elle regroupe les mécanismes de détection et d'encodage des stimuli potentiellement nocifs pour l'organisme, qui, après interprétation consciente et subjective, peuvent donner lieu à la sensation de douleur. Les individus atteints de TSA ont longtemps été considérés comme insensibles à la douleur. De plus, ils sont statistiquement plus enclins à l'expérimenter au cours de leur vie que la population générale. Malheureusement, du fait des déficits dans la communication qui caractérisent la symptomatologie ainsi que des potentiels déficits intellectuels associés, leur douleur est souvent mal évaluée et mal traitée. Les études chez l'humain évaluant la douleur d'individus atteints de TSA sont loin de faire consensus, des hypo-sensibilités, des hyper-sensibilités et des normo-sensibilités sont retrouvées. Cette hétérogénéité suggère l'intérêt que pourrait représenter l'utilisation de modèles animaux de TSA afin de réaliser des mesures standardisées de la sensibilité nociceptive et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la sensibilité nociceptive d'animaux modèles de TSA mâles et femelles et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient sous-tendre les altérations observées.

Pour répondre à ces questions nous avons utilisé un modèle d'exposition prénatale au valproate de sodium (VPA) chez des souris génétiquement variables. Dans un premier temps, nous avons exploré les caractéristiques comportementales de ces animaux pouvant faire écho aux symptômes TSA ainsi que leur sensibilité somatosensorielle avec un intérêt particulier pour la nociception. Dans un second temps, nous avons étudié les potentielles altérations cellulaires et moléculaires au niveau des neurones sensoriels des ganglions rachidiens en utilisant de l'imagerie du calcium libre intracellulaire. Dans un troisième temps, nous avons étudié le réseau neuronal de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME), premier réseau responsable de l'intégration des informations nociceptives, en couplant sur des tranches *ex-vivo* des dosages de neurotransmetteurs en spectrométrie de masse à l'enregistrement des courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs grâce à la technique du *patch-clamp*.

Nos observations démontrent que le modèle VPA reproduit un certain nombre d'altérations comportementales pouvant s'apparenter aux symptômes des TSA humains comme un retard développemental, des modifications de la sociabilité et des comportements répétitifs. De plus, les altérations de la sensibilité nociceptive sont en faveur d'une hyposensibilité thermique au chaud dans notre modèle. De manière importante, les mâles VPA présentent plus d'altérations que les femelles VPA notamment à l'âge adulte, ce qui peut être mis en parallèle de la prévalence plus importante des TSA chez les individus de sexe masculin. Sur le plan des neurones sensoriels, nous avons observé une élévation de calcium plus transitoire des neurones issus d'animaux VPA à la suite d'une application de capsaïcine, un agoniste de récepteurs-canaux TRPV1, ce qui pourrait sous-tendre une hyposensibilité thermique au chaud. Concernant le réseau de la CDME, les altérations pointent en

direction de modifications de la transmission synaptique chez les animaux VPA, sans déséquilibre de la balance excitation/inhibition.

Cependant, les résultats observés ne permettent pas de tirer des conclusions définitives sur les altérations de la perception douloureuse dans le cadre des TSA. En effet, la sensation de douleur résulte de l'interprétation consciente et subjective de l'information nociceptive et est influencées par des facteurs émotionnels, cognitifs et affectifs, qui sont à prendre en compte dans le cadre de l'autisme.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
I. Les Troubles du Spectre Autistique	5
1. Un peu d'histoire	5
2. Symptomatologie et critères diagnostiques	6
3. Epidémiologie	9
4. Etiologie.....	9
5. Traitement	12
6. Focus sur les différences sexuelles.....	13
7. Focus sur les altérations sensorielles.....	16
I. Nociception et Douleur	20
1. Neurobiologie.....	20
4. Mesure de la Nociception de la Douleur chez l'Humain	26
5. Focus sur les différences sexuelles.....	27
II. Troubles du Spectre Autistique et Douleur	29
1. Evaluation de la douleur dans le cadre des TSA	29
2. Sensibilité nociceptive et douloureuse des individus TSA.....	31
3. L'apport des modèles animaux	42
METHODES	51
I. Animaux	53
1. Génération du modèle VPA.....	53
2. Stabulation.....	53
II. Comportement	53
1. Développement	53
2. Test symptomatologie TSA-like	54
3. Tests somato-sensoriels	56
4. Analyse vidéo	58
III. Ex-Vivo Patch Clamp	61
1. Laminectomie et prélèvement de la moelle épinière.....	61
2. Réalisation des tranches de moelle épinière	61
3. Dispositif expérimental	62
4. Enregistrements.....	62
5. Analyse des courants post-synaptiques	64
IV. Imagerie du calcium intracellulaire	65
1. Culture de ganglions rachidiens fraîchement dissociés.....	65

2.	La sonde calcique Fura-2.....	65
3.	Dispositif expérimental	66
4.	Acquisition	66
5.	Analyse	66
V.	Spectrométrie de Masse	68
1.	Préparation des échantillons	68
2.	Chromatographie à phase liquide couplé à la spectrométrie de masse	68
VI.	Analyse statistique	70
RESULTATS		71
<i>Les résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique.</i>		
DISCUSSION.....		105
I.	L'exposition au vpa chez la souris cd1, un bon modèle de TSA ?	108
1.	Validé de construction, la toxicité d'une injection de VPA durant la grossesse	108
2.	Isomorphies comportementales avec les symptômes de TSA	109
3.	La variabilité et notion de spectre.....	112
4.	Les différences sexuelles	112
II.	Les altérations somato-sensorielles	114
1.	Préférence thermique.....	114
2.	Sensibilité mécanique	114
3.	Sensibilité au froid.....	115
4.	Sensibilité nociceptive au chaud.....	115
5.	Répertoire comportemental nociceptif	116
6.	Modèle de douleur aiguë.....	116
7.	Corrélations	117
8.	Effet de l'âge	117
III.	Le système nociceptif au niveau cellulaire et moléculaire	119
1.	Les neurones sensoriels	119
2.	La corne dorsale de la moelle épinière	122
3.	Des problèmes généralisés des acteurs de la dynamique du calcium intracellulaire	129
4.	L'implication des cellules gliales	130
IV.	Perspectives	135
1.	Le bon modèle de TSA ?	135
2.	Les différences sexuelles et l'effet de l'âge	135
3.	Evaluation de la nociception et de la douleur	136
4.	Les acteurs cellulaires	136
ANNEXE		137
BIBLIOGRAPHIE		159

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Table 1. Grille Diagnostique des Troubles du Spectre Autistique et exemples de comportements.	7
Figure 1. Schéma des acteurs du système nerveux dont la modification augmente le risque de TSA.	11
Table 2. Les différences sexuelles dans les TSA, interventions de différents facteurs.	15
Table 3. Exemples d'altérations sensorielles retrouvées dans les TSA.	17
Figure 2. Schéma simplifié du système nociceptif ou « circuit de la douleur ».	21
Figure 3. Les fibres périphériques et le réseau de la corne dorsale de la moelle épinière.	23
Table 4. Sensibilité douloureuse des patients TSA évaluée avec des méthodes physico-chimiques.	33
Figure 5. Les modèles d'étude des TSA chez l'animal.	43
Table 5. Sensibilité nociceptive d'animaux modèles de TSA.	46
Figure 6. Chronologie de l'étude comportementale.	55
Figure 7. Schéma simplifié des procédures <i>ex-vivo</i> .	60
Figure 8. Dispositif expérimental et protocole d'électrophysiologie <i>patch clamp</i> .	63
Figure 9. Dispositif expérimental et protocole d'imagerie du calcium libre intracellulaire.	67
Table 6. Paramètres de la LC-MS/MS pour le dosage des neurotransmetteurs.	69
Table 7. Récapitulatif des résultats comportementaux.	104
Table 8. Récapitulatif des résultats <i>ex-vivo</i> .	105
Figure 10. Schéma conceptuel de la nociception dans le modèle VPA.	134
Annexe 1. Revue publiée : « Nociception, Douleur et Autisme ».	140
Annexe 2. Tests sensori-moteurs à différents âges du développement.	151
Annexe 3. Comportements <i>TSA-like</i> additionnels.	152
Annexe 4. La variabilité inter et intra-test des animaux VPA.	153
Annexe 5. Distribution de la taille des neurones de DRG en culture.	154
Annexe 6. Réponse à la capsaïcine de neurones sensoriels de différentes tailles en culture.	155
Annexe 7. Réponse à une dépolarisation de neurones sensoriels de différentes tailles en culture.	156
Annexe 8. Transmission synaptique miniature dans la Lamina II de la CDME.	157
Annexe 9. Quantification de la transmission synaptique dans les neurones de la Lamina II.	158
Annexe 10. Effet de la capsaïcine sur la transmission synaptique spontanée dans la Lamina II.	159

LISTE DES ABREVIATIONS

BL : Ligne de base	NCCPC : <i>Non-communicative children pain checklist</i>
Caps : capsaïcine	NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
CCA : Cortex cingulaire antérieur	OMS : Organisation mondiale de la santé
CCP : Cortex cingulaire postérieur	PAG : Substance grise périaqueducule
CDME : Corne dorsale de la moelle épinière	PBN : Noyau parabrachial
CNTNAP2 : <i>Contactin-associated protein-like 2</i>	PFC : Cortex préfrontal
CNV : Variant du nombre de copie	PolyIC : Acide Polyinosinique-polycytidylique
DRG : Ganglion rachidien	PPC : Cortex pariétal postérieur
DSM : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux	PSC : Courant post-synaptique
EEG : Electro-encéphalographie	PT : Température de préférence
EPSC : Courant post-synaptique excitateur	PTEN : <i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
FMR1 : <i>Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1</i>	QI : Quotient intellectuel
FMRP : <i>Fragile X messenger ribonucleoprotein</i>	QST : <i>Quantitative sensory testing</i>
GABA : Acide γ -aminobutyrique	ROI : Région d'intérêt
GABA-A : Récepteur de l'acide γ -aminobutyrique de type A	RVM : Moelle rostro-ventrale
GARBRB3 : <i>Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3</i>	SEM : Erreur standard à la moyenne
GBD : <i>Global Burden of Diseases</i>	sEPSC : Courant post-synaptique excitateur spontané
GED-DI : Grille d'évaluation douleur - déficience intellectuelle	SHANK : <i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains</i>
GlyR : Récepteur à la glycine	sIPSC : Courant post-synaptique inhibiteur spontané
HCN : <i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i>	SMA : Aire motrice supplémentaire
HDAC : <i>Histone deacetylase</i>	SNP : <i>Single nucleotid polymorphism</i>
HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance	SYNGAP1 : <i>Synaptic Ras GTPase-activating protein 1</i>
IPSC : Courant post-synaptique inhibiteur	TDAH : Trouble déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
IRM : Imagerie par résonance magnétique	TND : Troubles du neurodéveloppement
LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse	TRPV1 : <i>Transient receptor potential vanilloid type 1</i>
LPS : <i>Lipopolysaccharide</i>	TSA : Troubles du spectre autistique
ME : Moelle épinière	TSC : Sclérose tubéreuse
MECP2 : <i>Methyl CpG binding protein 2</i>	TTX : Tétrodontoxine
mEPSC : Courant post-synaptique excitateur miniature	UBE3A : <i>Ubiquitin-protein ligase E3A</i>
mIPSC : Courant post-synaptique inhibiteur miniature	VPA : Acide valproïque ou Valproate

AVANT-PROPOS

La douleur est une sensation physiologique nécessaire au maintien de l'intégrité de l'organisme. Sa présence représente la majorité des raisons pour lesquels les individus s'orientent vers une consultation médicale. Cependant, la connaissance des mécanismes impliqués est restreinte et l'arsenal thérapeutique réduit comparé à d'autres pathologies. En tant qu'étudiant en médecine notamment à travers mes stages à l'hôpital, j'ai réalisé que le système médical privilégiait le curatif par rapport à l'amélioration de la qualité de vie souvent en sous-évaluant ou sous-traitant les douleurs. C'est dans ce contexte que j'ai décidé de réaliser une thèse de recherche sur l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les processus douloureux.

Le contexte des troubles du spectre autistique m'a été apporté par hasard et j'ai peu à peu réalisé qu'il s'agissait d'un défi majeur. En effet, lorsqu'un être humain souffre de douleur il recherche du réconfort et lorsque possible des méthodes pour diminuer cette douleur qui souvent consiste en un traitement antalgique. Pour cela, l'individu doit convaincre autrui d'apporter soutien et soin. Ceci requiert des capacités de communication et d'interaction sociale précises. Cependant, dans de nombreuses situations comme c'est le cas des troubles du spectre autistique, ces capacités sont affectées. C'est pourquoi la douleur d'individus dyscommunicants ou restreints dans leurs interactions sociales est souvent mal diagnostiquée et mal traitée. Historiquement, certaines descriptions ont longtemps suggéré que les individus autistes étaient insensibles à la douleur. Cependant, les études sur ce sujet jusqu'à aujourd'hui ne pointent pas du tout dans cette direction. Bien qu'il soit clair qu'il existe des spécificités de la douleur dans le cadre des TSA, celles-ci ne peuvent pas être résumées par des hypo- ou des hyper-sensibilités et sont souvent variables en fonction des individus.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et son objectif est d'étudier la question de la douleur dans le cadre des troubles du spectre autistique à l'aide d'un modèle animal pour effectuer des mesures standardisées en environnement contrôlé de la sensibilité nociceptive et douloureuse ainsi que pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement modifiés.

L'introduction de ce manuscrit résume le contexte scientifique au sujet de la douleur dans le cadre de l'autisme et est composé de trois sous-parties. La première sous-partie est une description détaillée des troubles du spectre autistique avec un intérêt particulier pour les symptômes sensoriels. La seconde sous-partie est une description de la douleur, des processus neurobiologiques qui la sous-tendent ainsi que de ses modes d'évaluation. Finalement, la dernière sous-partie résume la question de la douleur spécifiquement dans le cadre de l'autisme chez l'humain mais à l'aide de modèles animaux sur le plan comportemental mais aussi des hypothèses cellulaires et moléculaires sous-jacentes. Ensuite, une section détaille les méthodes et protocoles expérimentaux utilisés dans cette étude. Puis les résultats seront présentés en anglais sous la forme d'un article scientifique que nous sommes en cours de rédaction. Finalement, le tout sera discuté en français à l'aide de résultats préliminaires et d'autres études publiées précédemment.

INTRODUCTION

I. LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

L'**autisme** est un « trouble du développement neurologique caractérisé par une altération des interactions sociales, de la communication et du comportement »¹. En réalité, l'autisme est un ensemble de **troubles neurodéveloppementaux** (TND) qui, du fait de l'hétérogénéité clinique de sa symptomatologie, est aujourd'hui décrit sous le terme de « **Troubles du Spectre Autistique** » (TSA)^{2,3}. Ce syndrome est notamment caractérisé par des désordres d'interaction sociale et des comportements restreints et répétitifs. Il est à noter qu'on le retrouve aussi sous la dénomination de Trouble envahissant du développement dans la classification internationale des maladies de l'organisation mondiale de la santé (OMS).

1. Un peu d'histoire

Bien que rétrospectivement plusieurs descriptions historiques remontant au XVIIIe siècle pourraient correspondre à la définition actuelle des TSA, **Grunya Efimovna Sukhareva**, une pédopsychiatre soviétique, est la première à établir en 1925 une description de la symptomatologie en utilisant le terme de « psychopathologie schizoïde » qu'elle remplacera par « psychopathologie autistique » un peu plus tard^{4,5}.

Malgré cette description précoce, les deux cliniciens considérés comme les pionniers de la recherche sur l'autisme sont Hans Asperger et Leo Kanner⁶.

Leo Kanner est un pédopsychiatre autrichien, qui immigre aux Etats-Unis sous la poussée du nazisme. En 1943, il publie « *Autistic Disturbance of Affective Contact* », une série d'observations de onze enfants avec des difficultés d'interaction sociale et d'adaptation aux changements de routine, une bonne mémoire, une sensibilité accrue à certains stimuli, des atypies alimentaires, un potentiel intellectuel normal voir important et des écholalies (tendance à répéter systématiquement tout ou partie des phrases de l'interlocuteur)⁷.

Hans Asperger est un pédiatre autrichien qui publie en 1938 dans un journal hebdomadaire Viennois « *Das psychisch abnorme Kind* », une description précoce de ses travaux de recherche. Il soumet la totalité de son étude pour publication 5 ans plus tard sous le nom « *Die Autistischen Psychopathen* ». Il y décrit des enfants ressemblant beaucoup à ceux de Kanner, sans écholalies mais plutôt des enfants « petits professeurs ». Il décrit une maladresse anormale et des défauts de motricité fine⁸.

On sait aujourd'hui que la publication rapprochée de ces deux descriptions n'est pas une coïncidence et que Leo Kanner se serait grandement inspiré des idées et du travail d'Asperger. Cependant, les travaux de Sukhareva et d'Asperger ne seront que très peu diffusés jusqu'à leur traduction en anglais au profit de ceux de Kanner qui deviendront influents dès leur publication et resteront la référence pendant 40 ans⁹. C'est ainsi qu'à partir de 1944, apparaît le syndrome d'«

autisme infantile précoce » ou autisme de Kanner. Ce dernier considérait ce trouble comme un phénomène rare et nouveau d'apparition récente nécessitant une investigation et intervention urgente alors qu'au contraire, en observant la succession de personnes très douées et d'autres très déficientes dans les arbres généalogiques, Asperger décrivait les traits autistiques comme faisant partie d'un **spectre** et que ces traits étaient communs dans la population.

C'est en 1981, que le travail de Hans Asperger est traduit en anglais. Il faut cependant attendre 1994 pour que les caractéristiques décrites par Asperger un demi-siècle auparavant soient inclus aux critères officiels de diagnostic et à la classification internationale des maladies de l'OMS à travers le spectre autistique, vision qu'il avait de ce trouble.

2. Symptomatologie et critères diagnostiques

De manière générale, il existe théoriquement autant de formes cliniques qu'il existe de patients atteints. Le diagnostic est établi de manière multidisciplinaire après observation d'un certain nombre de critères parmi la liste établie par le DSM-V (**Table 1**) et repose sur deux groupes de symptômes principaux (« *core* » en anglais) concernant d'une part des **anomalies de la communication** et des **interactions sociales** et d'autre part le **caractère restreint et répétitif des comportements, des intérêts et des activités**^{2,10}. Certains de ces signes peuvent être décelés très précocement alors que d'autre nécessitent d'attendre l'âge du développement cognitif et verbal. Ainsi, comme pour la plupart des troubles neurodéveloppementaux, le diagnostic est très difficile avant l'âge de deux ans³.

En plus des symptômes principaux décrits précédemment, les individus atteints de TSA présentent fréquemment des **comorbidités**. Par exemple, la présence de déficience intellectuelle est retrouvée dans 40% des cas de TSA et a conduit historiquement à définir l'autisme infantile traditionnel de Kanner alors que son absence caractérisait le syndrome d'Asperger¹¹. Les comorbidités consistent également en d'autres troubles neurodéveloppementaux comme des troubles de l'attention avec hyperactivité (TDAH, 30%), des troubles de l'acquisition du langage oral (>20%) ou de la coordination motrice ainsi que des troubles spécifiques de l'apprentissage, des comportements auto- ou hétéro-agressifs, de l'épilepsie (20%), des troubles gastro-intestinaux ou des troubles du sommeil. De plus, des troubles psychiatriques tels que des troubles anxieux (phobies spécifiques, anxiété sociale et anxiété généralisée), des symptômes obsessionnels compulsifs, des épisodes dépressifs et des syndromes catatoniques sont communément observés^{12,13}.

A noter que d'autres maladies génétiques comme le syndrome de Rett, le syndrome de l'X fragile ou la sclérose tubéreuse d'une part, et métaboliques comme la phénylcétonurie d'autre part, y sont souvent associés ; on parle alors d'**autisme syndromique**³.

Anomalies de la communication et des interactions sociales	
Déficits de la réciprocité sociale ou émotionnelle.	
Absence ou rareté des sourires réponse.	<i>L'individu ne sourit pas en réponse au sourire d'autrui.</i>
Absence ou pauvreté de l'attention conjointe.	<i>L'individu ne partage pas l'attention d'une personne sur un objet ou une situation ou ne cherche pas à attirer l'attention d'autrui sur un objet ou une situation. Il ne répond pas quand on l'appelle même de façon insistante en l'absence de troubles auditifs.</i>
Difficultés à avoir des échanges réciproques.	<i>Les conversations ont tendance à être centrées sur les intérêts de l'individu atteint.</i>
Difficultés pragmatiques du langage.	<i>L'individu rencontre des difficultés à avoir accès à l'implicite et au langage figuré.</i>
Déficit des comportements de communication non verbaux utilisés au cours des interactions sociales.	
Absence/pauvreté de l'usage de geste à valeur sociale.	<i>L'individu ne fait pas oui ou non de la tête, ne salue pas avec la main, ne lève pas les bras pour réclamer d'être porté...</i>
Absence ou pauvreté de l'utilisation du pointage	<i>L'individu ne pointe pas du doigt en direction d'un objet qui l'intéresse.</i>
Absence, rareté ou caractère fluctuant du contact oculaire	<i>L'individu ne regarde pas dans les yeux la personne avec laquelle il interagit.</i>
Pauvreté de la communication non verbale	<i>L'individu a une faible variété d'expressions faciales et n'utilise la gestuelle que rarement de façon spontanée et adaptée au contexte social au cours de la communication.</i>
Anomalies des relations sociales.	
Absence ou anomalie du jeu	<i>L'individu ne participe pas à des jeux sociaux réciproques, il ne partage pas ou très peu de jeux fonctionnels avec ses pairs, il ne joue pas à faire semblant (la dinette, scénarios avec ses figurines...).</i>
Difficultés de compréhension des conventions sociales.	<i>Une maladresse sociale : Les propos de l'individu sont centrés sur ses propres centres d'intérêt et ne prennent pas en compte le point de vue ni les propos de l'interlocuteur pour s'inscrire dans un tour de rôle. Présence d'un isolement relationnel (l'individu a des difficultés à se faire des amis).</i>
Déficit de motivation sociale.	<i>L'individu est peu intéressé par les relations sociales avec ses pairs.</i>
Caractère restreint et répétitif des comportements, des intérêts et des activités	
Stéréotypies ou caractère répété des mouvements, de l'utilisation d'objet ou du langage.	
Les stéréotypies motrices	<i>L'enfant a des mouvements répétitifs du tronc, de la tête, du buste ou des membres supérieurs. Parfois les stéréotypies peuvent occasionner des lésions graves lorsque le patient se mord ou se frappe ; on parle alors d'automutilation.</i>
L'utilisation répétitive des objets	<i>L'enfant a tendance à aligner ses jouets ou d'autres objets, à faire tourner la roue d'une petite voiture, etc.</i>
Les stéréotypies verbales	<i>L'enfant produit des sons de manière répétitive sans intention de communication.</i>
Les écholalies	<i>L'enfant répète un son ou un mot après l'avoir entendu de manière immédiate ou différée.</i>
Un langage idiosyncrasique	<i>L'enfant invente un langage qui lui est propre (mot ou structure verbale) et l'utilise de façon stable.</i>
Adhésion inflexible à des routines et intolérance au changement.	
L'adhésion inflexible à des routines, même mineures	<i>L'enfant a besoin de faire les mêmes itinéraires chaque jour, de manger la même nourriture, de porter des vêtements de la même couleur, etc.</i>
Comportements verbaux ou non verbaux ritualisés	<i>L'enfant a des questionnements répétitifs, des déambulations autour d'un périmètre de marche, etc.</i>
L'intolérance au changement ou besoin d'immuabilité	<i>L'enfant est en détresse à la suite d'un changement mineur de son environnement comme le changement de tapisserie de la maison, la modification d'un emballage, etc</i>
Intérêts restreints et fixes, anormaux soit dans leur intensité, soit dans leur but.	
Attachement idiosyncratique à des objets insolites	<i>L'enfant peut être fortement attaché à des objets, tels qu'une casserole, une tige métallique, un caillou, etc.</i>
Peurs inhabituelles au regard de l'âge chronologique	<i>L'enfant peut craindre les rideaux soulevés par le vent, d'entendre quelqu'un qui tousse ou qui chante ou qu'on lui coupe les cheveux, etc.</i>
Intérêts excessivement circonscrits et persévérants	<i>L'enfant a un intérêt excessif pour les chiffres, les lettres, les lignes de métro, le système solaire, les sous-types de coléoptères, etc</i>
Particularités sensorielles.	
Hypo ou hyperréactivité à certaines stimulations sensorielles ou intérêt inhabituel pour les aspects sensoriels de l'environnement.	<i>L'enfant a une apparente indifférence à la douleur ou à la température, une sensibilité excessive aux bruits même très discrets, des comportements de flairage des objets, une fascination pour certains stimuli lumineux, etc</i>

Table Grille Diagnostique des Troubles du Spectre Autistique et exemples de comportements. Adaptée d'après^{2,10}.

3. Epidémiologie

La prévalence des TSA varie selon les estimations mais elle est estimée à 1 sur 132 individus par la *Global Burden of Disease* (GDB) et à **1 sur 100** par l’OMS¹⁴. Certaines estimations récentes suggèrent qu’elle pourrait même s’élever à 1 sur 44¹⁵. Bien que certaines études rapportent de faibles variations de la prévalence dans certains groupes ou certaines minorités ethniques, il existe de manière générale peu de variations de la prévalence selon la géographie, l’ethnicité, le statut socio-économique, et l’accès à certains services ou ressources¹⁶⁻¹⁹. Il est cependant bien établi que la prévalence des TSA est plus importante (~4-10%) chez les patients ayant un profil psychiatrique²⁰.

Il est important de remarquer qu’un nombre important d’études suggèrent que la **prévalence** des TSA est **plus importante** chez les individus de **sexe masculin** avec un ratio variant de 2 à 5 hommes pour une femme avec une estimation de 4 pour 1 par la GBD²¹. Ce point sera développé de manière plus détaillée ci-après.

4. Etiologie

Beaucoup de théories psychologiques ont essayé d’expliquer les symptômes comportementaux et développementaux des TSA^{22,23}. Par exemple des théories « sociales » ont mis les déficits de sociabilité comme facteur explicatif, d’autres suggèrent un déficit global d’intégration ou, au contraire, une augmentation de l’intégration perceptuelle.

Par exemple, une des hypothèses les plus diffusées repose sur la **théorie de l’esprit** qui regroupe les processus cognitifs et neurobiologiques nécessaires pour interpréter son propre état mental ou celui d’autrui et qui permet aux individus de faire des considérations raisonnables concernant le comportement d’autrui, ce qui est souvent observé comme modifié dans les TSA²⁴. La théorie dite du « **miroir cassé** » (*broken mirror* en anglais) a essayé d’expliquer ces modifications. Elle décrit des dysfonctions de circuits neuronaux responsables d’une perception efficace du mouvement. Ces altérations sont suggérées comme ayant un impact négatif sur la capacité à encoder les intentions derrière certaines actions et perturbent les mécanismes qui sous-tendent l’imitation, l’attention conjointe, l’empathie et d’autres processus de la théorie de l’esprit²⁴.

Bien que ces hypothèses aient joué un rôle descriptif utile et apporté des arguments tentant d’expliquer comment des individus atteints de TSA pouvaient vivre et intégrer le monde qui les entoure, elles sont souvent généralisables à plusieurs TND et manquent de spécificité pour l’autisme. Bien que l’étiologie exacte des TSA ne soit toujours pas connue aujourd’hui, il est bien établi qu’il s’agit d’un ensemble de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux qui créent les conditions nécessaires à l’apparition de la pathologie.

4.1. Facteurs environnementaux

► *Pour une revue détaillée* ²⁵

Un certain nombre de facteurs environnementaux a été associé au risque de TSA. Par exemple, l'âge parental avancé, un traumatisme à la naissance comme une hypoxie, l'obésité maternelle, un faible intervalle entre des grossesses successives, un diabète gestationnel mellitus ainsi que **l'exposition à du valproate comme traitement antiépileptique**, à certains pesticides ou métaux lourds pendant la grossesse sont corrélés à une augmentation du risque de TSA^{25,26}. Cependant, bien que corrélés, ces facteurs ne sont en rien démontrés comme causaux de la pathologie³.

4.2. Facteurs génétiques

► *Pour une revue détaillée* ²⁷

La présence de maladies génétiques associées ainsi que la concordance d'apparition des TSA entre vrais jumeaux (70 à 80 %), font fortement envisager des facteurs de risques génétiques²⁸. Aujourd'hui, on considère qu'environ **un quart des TSA a une origine génétique**, du moins en partie (mutations de régions codantes, variants du nombre de copies, réarrangements chromosomiques...) ^{29,30}.

La plupart des gènes dont les altérations sont associées aux TSA codent pour des protéines impliquées dans la structure ou la **fonction synaptique** ainsi que dans le **remodelage de la chromatine** et l'**expression génique (Figure 1)**^{31,32}.

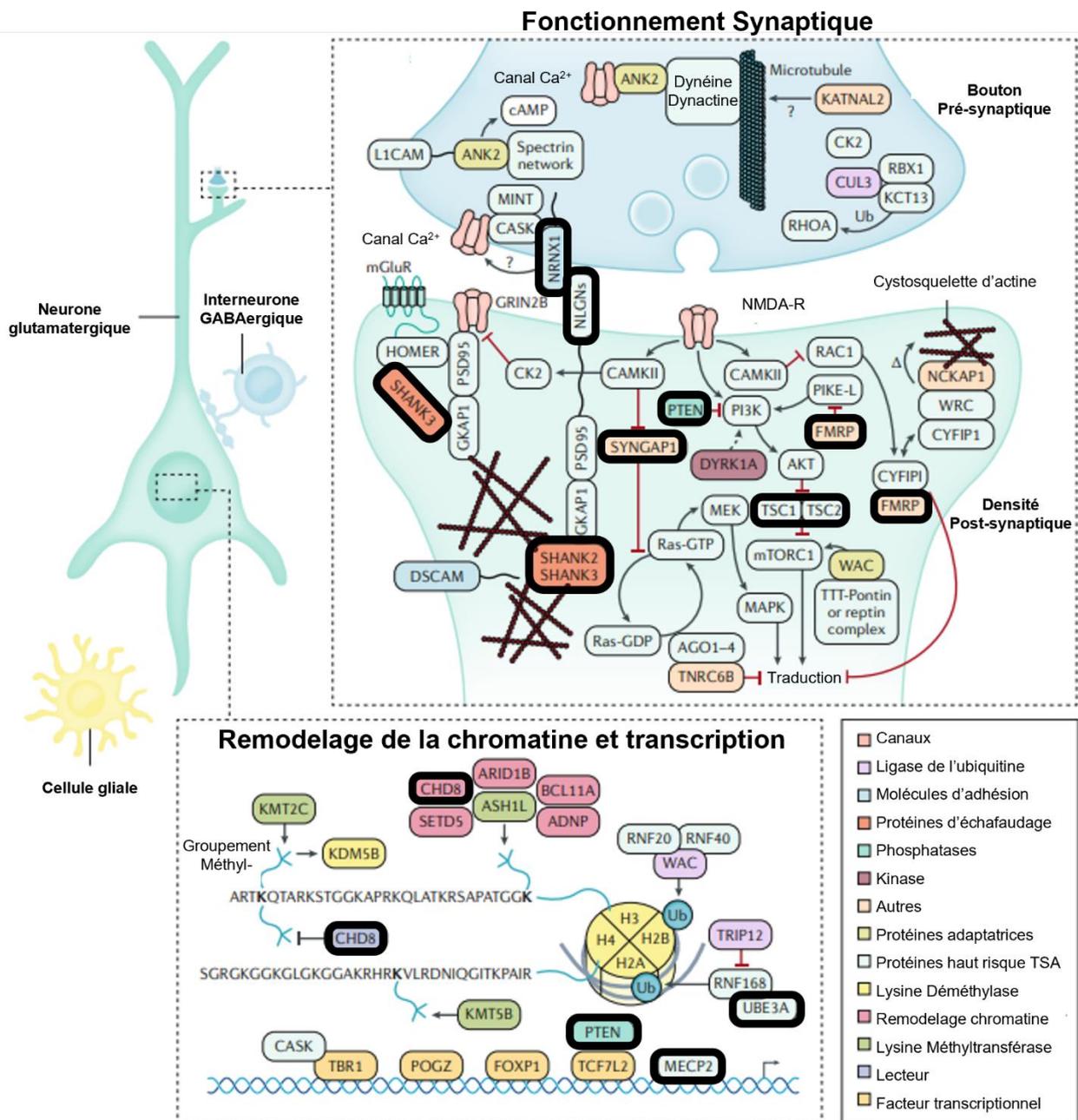


Figure 1. Schéma des acteurs du système nerveux dont la modification augmente le risque de TSA.

Les protéines en question sont impliquées dans le fonctionnement synaptique ou le remodelage de la chromatine et de la transcription. Cependant, bien que certaines mutations augmentent de manière conséquente le risque de TSA, elles ne démontrent en aucun cas une causalité claire. En effet, l'autisme monogénique représente de moins de 10% des cas et est majoritairement représenté par l'autisme syndromique et donc associés à d'autres troubles neurodéveloppementaux à cause génétiques dont certaines protéines sont représentées ci-dessus comme FMRP (Syndrome de l'X fragile), TSC1 et TSC2 (Sclérose tubéreuse), UBE3A (Syndrome d'Angelman, Syndrome Prader-Willi), MECP2 (Syndrome de Rett)³³. Il est intéressant de noter que les gènes des protéines encadrées en gras sont souvent utilisés comme cibles pour générer des modèles animaux d'étude des TSA. Modifiée d'après ^{3,34}.

4.3. Neurobiologie

Les études en imagerie par résonance magnétique (IRM) dévoilent des altérations structurelles corticales et sous-corticales de la substance grise et blanche ainsi que de la connectivité globale du cerveau ou même plus spécifiquement entre des structures impliquées dans des aspects sociaux^{3,35,36}. Il est intéressant de préciser que certaines de ces différences peuvent être détectées précocement et prédisent le diagnostic de TSA plus tard dans la vie de l'enfant ainsi que l'apparition de certains symptômes comme des comportements restreints et répétitifs³⁷⁻⁴¹. De plus, des modifications de l'activation de certaines zones cérébrales lors des tâches de production ou de compréhension du langage ou d'analyse d'expressions faciales sont aussi retrouvées^{40,42}.

Les études par électroencéphalographie (EEG) démontrent au repos des modifications de l'activité oscillatoire⁴³. Certains auteurs avancent même que le développement du profil EEG d'enfants à haut risque de TSA pourrait représenter un endophénotype^{44,45}. De manière intéressante, lors de stimulations sensorielles, plusieurs études rapportent des modifications dans les réponses corticales⁴⁶⁻⁴⁸.

Schématiquement, les résultats d'imagerie, d'électroencéphalographie et de magnétoencéphalographie pointent en direction de deux mécanismes communs pour les TSA⁴⁹. Premièrement, un **déséquilibre de la balance excitation/inhibition** dans certains réseaux neuronaux par un défaut d'inhibition^{50,51}. Deuxièmement, une **diminution de la connectivité** à grande échelle entre différentes **régions cérébrales**⁵².

Récemment, les données de transcriptomique de cortex d'individus avec TSA démontrent que les voies les plus dérégulées sous-tendent des mécanismes de **transmission synaptique** notamment **GABAergique** et des **phénomènes développementaux** tels que la migration neuronale et la guidance axonale. Il est intéressant de noter que, les altérations touchent aussi des **acteurs non neuronaux**. En effet, une augmentation de l'activation microgliale ou du nombre d'astrocytes protoplasmiques sont déjà décrits. Cependant, le niveau de dérégulation n'est pas corrélé avec la sévérité de la pathologie⁵³.

5. Traitement

Les traitements des TSA ne sont **pas curatifs** et comprennent principalement des traitements non-pharmacologiques associées à des adaptations de l'environnement cohérentes avec les compétences de l'enfant. Ils consistent en des programmes thérapeutiques développementaux visant l'amélioration de la trajectoire développementale et des méthodes utilisant la stimulation, la répétition et le renforcement positif, pour favoriser un apprentissage des comportements utiles à la communication et adaptés socialement¹⁰.

L'association à des **traitements pharmacologiques** est possible. Ils sont **symptomatiques** et permettent de traiter certains symptômes TSA et les comorbidités fréquemment associées. Par exemple des antipsychotiques pour traiter l'irritabilité ou les comportements hétéro- et auto-

agressifs sévères, des antidépresseurs pour traiter certains symptômes obsessionnels et compulsifs sévères ou certains épisodes dépressifs mais aussi de la mélatonine pour les troubles du sommeil¹⁰.

6. Focus sur les différences sexuelles

Note : dans ce manuscrit, les termes mâles et femelles seront utilisés pour décrire les différences sexuelles quelle que soit l'espèce animale en question (humain, rat et souris) car ils se réfèrent à la valeur biologique de sexe et non sociale de genre.

► Pour une revue détaillée ⁵⁴

Elucider les différences sexuelles dans les TSA est un défi important. En effet, une des données de la littérature très répliquée démontre la **prévalence plus importante de ce trouble chez les mâles** avec un ratio de 4-5:1 (♂:♀). Cependant, la plupart des TND possèdent ce biais de prévalence en faveur des mâles comme les TDAH et les déficiences intellectuelles⁵⁵. Il est à noter que le *sex-ratio* augmente à 6-16:1 lors de l'absence de déficience intellectuelle mais est réduit à 1-2:1 lors de la présence de déficiences intellectuelles modérées à sévères^{55,56}. Ainsi les **femelles sont moins atteintes mais le sont plus sévèrement**.

Il y a plusieurs hypothèses pour expliquer la prévalence plus importante chez les mâles. Premièrement, cette différence est sur-rapportée du fait d'une symptomatologie qui est différente entre les mâles et les femelles et que les mâles sont plus diagnostiqués car leur symptomatologie correspond plus aux critères actuels. Deuxièmement, cette différence est réelle et reflète un effet protecteur des femelles ou une vulnérabilité accrue des mâles.

6.1. Une symptomatologie différente

Cette idée stipule que la prépondérance des mâles dans les TSA est due à un défaut de diagnostic chez les femelles. En effet les femelles atteintes de TSA sont plus à même d'avoir des formes sévères avec des déficiences intellectuelles mais aussi plus de comorbidités sensorielles, d'épilepsie, de troubles du sommeil de l'anxiété et de la dépression⁵⁷⁻⁶⁰. De ce fait le diagnostic d'un autre trouble co-occurent peut mener à une sous-estimation du diagnostic de TSA⁶¹.

Cependant, des différences entre les structures cérébrales, la connectivité ou le fonctionnement du système nerveux en général entre les mâles et les femelles atteints de TSA suggèrent que la pathologie pourrait s'exprimer de manière différente en fonction du sexe^{54,62,63}. En effet, certaines études rapportent des symptômes plus fréquents chez les mâles⁶⁴⁻⁶⁹ et d'autres chez les femelles^{70,71}. Mais certains auteurs précisent que globalement il n'y a pas de différence dans les scores de TSA mais seulement des variations subtiles⁷²⁻⁷⁴. Globalement, la plupart des études ne rapporte pas ou seulement de **faibles différences** dans la manifestation des TSA en fonction du **sexe** notamment avec **plus de comportements répétitifs chez les mâles**⁷⁵⁻⁸².

De plus, certains facteurs socio-culturels peuvent influencer ces différences sexuelles. En effet, les mâles sont plus démonstratifs et donc attirent plus l'attention alors que les femelles avec

TSA essaient souvent de camoufler leurs symptômes ce qui peut entraîner un biais de diagnostic⁸³⁻⁸⁶. Une étude récente a montré qu'il était plus difficile pour les femelles de remplir les critères diagnostiques du DSM-V alors qu'un diagnostic avait été posé utilisant la version précédente (DSM-IV)⁸¹. En effet, du fait qu'historiquement une majorité des descriptions et de la recherche sur les TSA s'est effectuée chez des mâles, les critères actuels pourraient ne pas convenir à l'expression de ces troubles chez les femelles.

6.2. L'effet protecteur femelle ou vulnérabilité mâle

Ces hypothèses ont été décrites comme faisant partie du modèle des trois « *Hit* » reposant sur des facteurs (épi)génétiques, environnementaux et de différences sexuelles⁸⁷. Ce modèle est décrit ci-après (**Table 2**). D'une part, les faits que les **mâles** possèdent une **variabilité génétique** plus importante, que les **gènes** nécessaires au **développement masculin soient souvent altérés** dans les TSA et une exposition précoce à de la **testostérone** peuvent expliquer que la **prévalence plus élevée**. D'autre part, chez les **femelles** l'apparition de ces troubles nécessite l'altération de voies biologiques complètes, ce qui induit que lorsqu'elles sont diagnostiquées, elles le sont **plus sévèrement**⁵⁴.

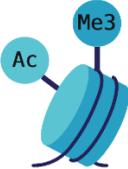
Facteur	Effet protecteur ♀	Vulnérabilité ♂	Mixte
 Génétique	Nécessité d'avoir plus d'altérations génétiques pour avoir une symptomatologie	Variabilité génétique plus élevée (incidence plus importante mais sévérité réduite)	Existences d'altérations génétiques sexe-spécifiques
	Les personnes partageant la génétique de femelles TSA sont plus à risque d'être diagnostiqués et présentent plus de traits autistiques	Les gènes plus exprimés chez les mâles sont souvent ceux dont les mutations sont associées avec les TSA	Les gènes mutés dans les TSA affectent des voies sexe-dépendantes
	Diploïdie du chromosome X	Haploïdie chromosome Y	
 Epigénétique	Nécessité d'avoir plus d'altérations épigénétiques pour avoir une symptomatologie	Mecp2, important pour les processus de méthylations de l'ADN, est diminué chez des mâles exposés au VPA (modèle de TSA chez l'animal)	Différences sexuelles de transcriptome
 Environnement	Testostérone fœtale faible	Testostérone fœtale interagit avec des voies, des protéines et des mécanismes altérés dans les TSA	Différence sexuelle dans les neurotransmetteurs et neuropeptides
		L'activation immunitaire maternelle affecte les mâles de manière plus importante	Différences sexuelles dans les fonctions immunitaires
		Activation immunitaire (microgliale) plus importante chez mâles avec TSA	Le diagnostic est basé sur des critères étudiés chez les mâles

Table 2. Les différences sexuelles dans les TSA, interventions de différents facteurs.

Du point de vue génétique, les mâles possèdent une variabilité plus importante ce qui laisse place à une incidence plus importante des TSA mais à une sévérité réduite⁶¹. Au contraire, les femelles nécessitent des modifications génétiques plus importantes, avec modifications de voies biologiques intégrales, pour atteindre les critères diagnostiques mais de fait sont plus sévèrement atteintes^{54,88}. De plus, les femelles diagnostiquées possèdent un nombre de mutation et d'altérations épigénétiques plus important que les mâles diagnostiqués et les personnes partageant leur génétique sont plus à risque d'être diagnostiqués à leur tour et possèdent des scores pour traits autistiques plus important^{55,89}. Lors du développement, les gènes les plus exprimés chez les mâles sont aussi souvent ceux dont les mutations sont associées avec les TSA^{90,91}. Ainsi la modification de l'expression de gènes très important pour le développement du cerveau mâle pourrait avoir un impact plus important. Finalement, posséder un chromosome Y représenterait un facteur de risque et un deuxième chromosome X un facteur protecteur. En effet, un certain nombre de gènes dont l'altération est liée aux TSA sont situés sur le chromosome X (Fmr1, Mecp2, Nlgn3 et Nlgn4). L'altération de ces gènes entraîne des syndromes plus délétères chez les mâles comme avec Mecp2 et le Syndrome de Rett qui est retrouvé principalement chez les femelles car les mâles atteints ne survivent que très peu. D'un point de vue environnemental, lors de la grossesse, le pic de testostérone fœtal est important pour les processus de masculinisations lors du développement. Celui-ci, lorsque qu'il est augmenté, est corrélé avec la présence de traits autistiques ainsi qu'avec un diagnostic de TSA⁹². Le rôle de l'activation immunitaire pourrait aussi influencer avec par exemple une activation microgliale plus importante chez mâles avec TSA⁹³. *Adaptée d'après* ^{54,87}.

7. Focus sur les altérations sensorielles

► *Pour une revue détaillée* ⁹⁴

Bien que les premières descriptions de l'autisme incluent déjà des altérations sensorielles, ce n'est que récemment qu'elles ont été considérées comme un critère diagnostique sous l'intitulé d' « hypo ou hyper-réactivités à des entrées sensorielles ou un intérêt inhabituel pour certains aspects sensoriels de l'environnement »^{2,7}. Ces altérations peuvent affecter toutes les modalités sensorielles et sont souvent multimodales^{94,95} (**Table 3**). De manière intéressante, ces anomalies sensorielles sont plus prévalentes dans les TSA que dans d'autres TND et sont parfois corrélées à la sévérité de l'atteinte autistique ou y contribuent⁹⁵⁻⁹⁷.

Il est important de considérer que bien que certaines observations décrivent des performances augmentées, celles-ci peuvent entraîner des problèmes d'intégration et de filtrage des stimuli dans des environnements complexes et dynamiques⁹⁴. De plus, ces données peuvent être à relativiser du fait que des problèmes non sensoriels peuvent impacter l'évaluation de paramètres sensoriels. Par exemple, la vision peut être influencée par les troubles oculomoteurs qui sont fréquemment décrits chez les sujets autistes^{98,99}.

A noter que certaines de ces atypies, notamment visuelles, peuvent être présentes dès le bas-âge et prédictives du niveau d'atteinte et de la symptomatologie TSA¹⁰⁰⁻¹⁰³. De plus, certaines études identifient différents profils d'altérations sensorielles avec des mécanismes potentiellement différents, ce qui pourrait permettre d'affiner la classification des TSA¹⁰⁴.

Modalité sensorielle	Exemples d'observations dans le cadre des TSA	Références
 Vision	Recherche ou évitement de stimulations visuelles intenses, faible perception des couleurs. Altérations du champ visuel, de la détection des contours, de la perception du mouvement. Performances supérieures pour la recherche visuelle de détails.	95,105–112
 Audition	Sensibilité augmentée aux sons intense, diminution des capacités d'orientation auditive Altération de la perception de la prosodie (variations de rythme ou de mélodie du langage) Difficulté à isoler les caractéristiques d'un son lors d'informations auditives concurrente Diminution de la capacité à concentrer son attention sur des sons saillants	113–118
 Olfaction	Modifications de la détection ou de l'identification d'odeurs	119–121
 Gustation	Préférences alimentaires sélectives, détection du goût modifiée et difficultés à identifier des saveurs acides ou amères.	120,122
 Tact	Certaines textures vestimentaires sont difficilement tolérées, hypo et hyper-réactivités, détection anormale de stimuli tactiles, défaut d'accoutumance à certains stimuli tactiles.	123–129
Autres	Mauvais ajustements posturaux, difficultés à situer son corps dans l'espace, Recherche de stimulations vestibulaires par balancements, tournoissements. Altération du seuil de détection thermique, Sensations de chaleur paradoxales	130–133

Table 3. Exemples d'altérations sensorielles retrouvées dans les TSA.

Les spécificités sensorielles sont fréquentes dans les TSA, peuvent concerner tous les sens et sont souvent multimodales. Bien qu'elles soient décrites comme des « hypo ou hyper-réactivités à des entrées sensorielles ou un intérêt inhabituel pour certains aspects sensoriels de l'environnement » dans les critères diagnostiques il semble que la sensorialité des sujets autistes ne puisse être réduite à un talent ou un déficit.

CONCLUSION SUR LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

Les troubles du spectre autistique sont un ensemble de troubles neurodéveloppementaux caractérisés par des déficits dans la communication et l'interaction sociale et la présence de comportements restreint et répétitifs. Ils atteignent 1% de la population et sont plus fréquent chez les individus mâles. Leur étiologie est multifactorielle et implique des déficits de la transmission synaptique et de l'expression génique se traduisant hypothétiquement chez l'humain par des déséquilibres excitation/inhibition et une connectivité réduite des réseaux neuronaux. Il est important de constater qu'une intégration sensorielle modifiée semble être un critère universel si bien que certains auteurs suggèrent que l'autisme serait avant tout une pathologie sensorielle.

De toutes les modalités sensorielles, la douleur est indispensable à la préservation de l'intégrité de l'organisme. Cependant, celle-ci est souvent mal évaluée du fait de la symptomatologie complexe des individus atteints TSA. Dans la partie qui suit, après une description des voies neuronales qui sous-tendent la douleur nous aborderons comment elle est évaluée ainsi que les différences sexuelles déjà décrites.

I. NOCICEPTION ET DOULEUR

La **douleur** est définie comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, en réponse à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en de tels termes (*International Association for the Study of Pain*)¹³⁴. Elle est le plus souvent physiologique avec pour but de maintenir l'intégrité des tissus. Elle résulte de l'**interprétation consciente et subjective de l'information nociceptive**, on parle alors de **douleur nociceptive**. En effet, elle repose sur une fonction appelée la **nociception**, qui regroupe l'ensemble des phénomènes de la **transduction** à la **transmission** et l'**intégration** des **stimuli nocifs** ou potentiellement nocifs pour l'organisme.

Note : La douleur nociceptive est souvent opposée à la douleur dite neuropathique qui résulte de lésion ou maladies du système nerveux somato-sensoriel (IASP). Dans ce manuscrit, le terme générique de douleur se réfère à la douleur nociceptive, dans le cas inverse le type de douleur sera précisé.

1. Neurobiologie

L'ensemble des processus nociceptifs qui sous-tendent la sensation de douleur implique différents acteurs interconnectés constituant le « **circuit de la douleur** » (**Figure 2**). Notons que des changements plastiques au sein de ce circuit sont décrits comme pouvant entraîner des **hypo/hyperalgésies** (*i.e.* douleur diminuée/augmentée pour un stimulus normalement douloureux) et des **allodynies** (*i.e.* douleur provoquée par un stimulus normalement indolore)^{134,135}.

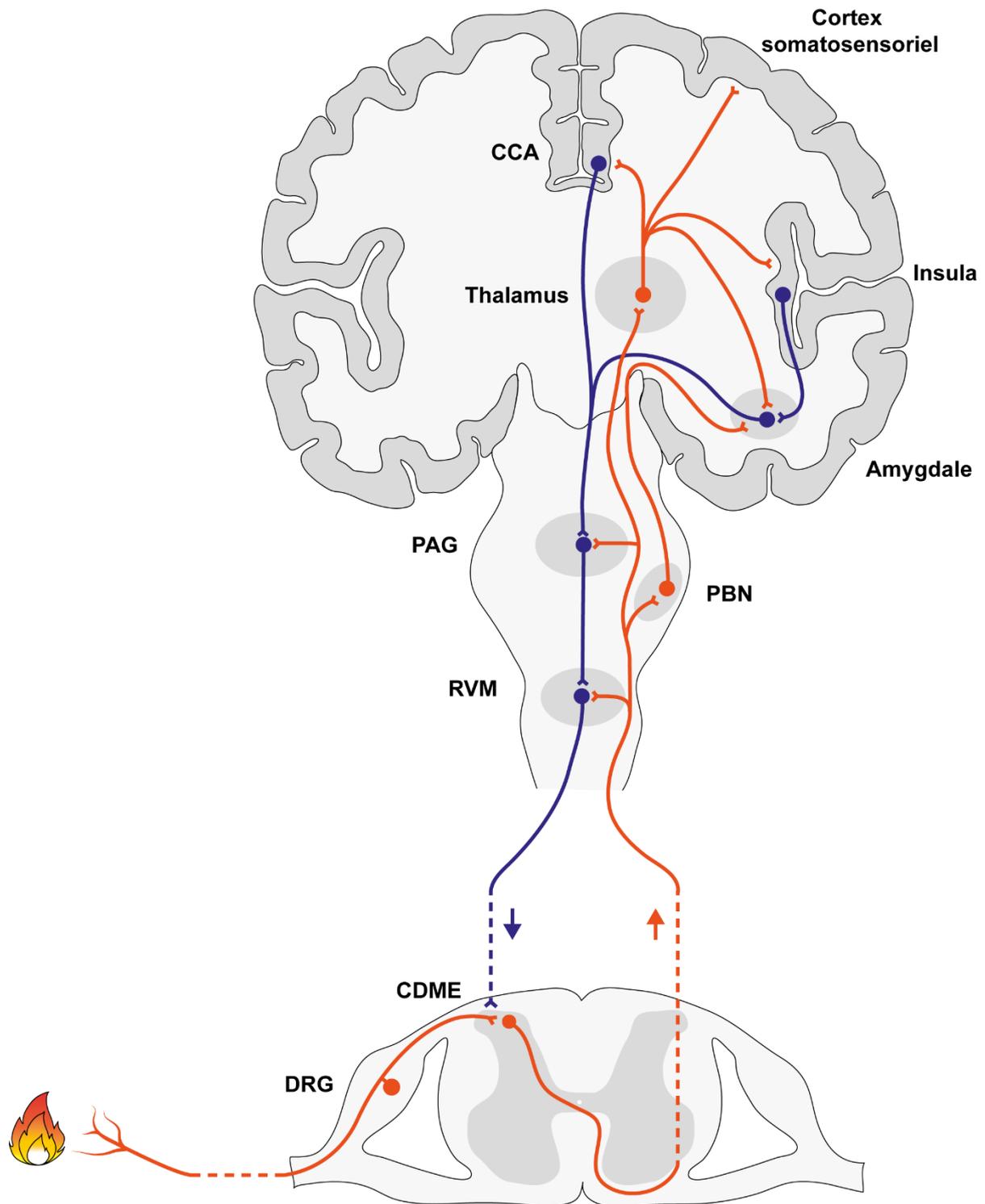


Figure 2. Schéma simplifié du système nociceptif ou « circuit de la douleur ».

Les nocicepteurs détectent les stimuli nocifs en périphérie et transmettent l'information aux neurones du réseau de la corne dorsale de la moelle épinière. L'information qui en résulte est transmise à l'encéphale et notamment au thalamus via la voie spinothalamique mais aussi au noyau parabrachial (PBN). S'ensuit un traitement cérébral complexe mettant en jeu différentes structures (cortex somato-sensoriel, CCA : cortex cingulaire antérieur, insula, amygdale...), donnant potentiellement lieu à la sensation de douleur. En retour, les structures cérébrales envoient des projections sur la substance grise périaqueducale (PAG) et la moelle rostro-ventrale (RVM), deux structures modulant via les terminaisons de leur neurones l'intégration spinale du message nociceptif.

1.1. Détection et transduction des signaux nocifs

► *Pour une revue détaillée*¹³⁶

Le message nociceptif est initialement produit par l'activation de **neurones sensoriels** primaires spécifiques dits « **nocicepteurs** » innervant la périphérie (peau, muscles...) ainsi que les organes internes¹³⁶. Ces nocicepteurs font partie des **fibres sensorielles** périphériques dont le corps cellulaire est situé dans les ganglions rachidiens (DRG) pour la sensibilité du corps et dans le ganglion trigéminal pour celle de la tête. Ces fibres sensorielles sont souvent classées en fonction des propriétés de leur réponse (modalité les activant et ainsi que leur seuil d'activation), de leur vitesse de conduction (reflet du diamètre et du degré de myélinisation de l'axone) ainsi que de leur neurochimie¹³⁶⁻¹³⁸ (**Figure 3**). Au sein de ces neurones sensoriels, l'expression de certaines protéines définit leurs modalités d'activation (thermique, mécanique ou chimique). Ces protéines, des récepteurs-canaux, sont responsables de la **transduction** des stimuli potentiellement nocifs en signal électrique¹³⁹. Elles sont plus ou moins spécifiques d'une modalité et conduisent à la dépolarisation de la terminaison périphérique et à la genèse de potentiels d'action. Un nombre important de ces protéines a été décrit, comme les canaux TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) pour les stimuli nocifs chauds, aussi accessoirement activés par un composant du piment, la capsaïcine^{139,140}. L'information nociceptive résultante est codée sous forme de trains de potentiels d'action, dont la fréquence dépend de l'intensité de la stimulation¹³⁶. Elle est ensuite acheminée via les racines dorsales à la **corne dorsale de la moelle épinière** (CDME)^{141,142}.

1.2. Intégration spinale

► *Pour des revues détaillées*^{142,143}

L'intégration des messages nociceptifs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME) avant leur transmission vers les centres supérieurs est un processus complexe mettant en jeu un dense réseau neuronal (**Figure 3**). Ce réseau est composé de **neurones de projection** (10%) dont les axones projettent vers des structures supra-spinales et d'**interneurones** (90%) dont les axones restent dans la moelle épinière (ME)¹³⁷. Chez la souris et le rat, les neurones de projection ainsi que la **majorité des interneurones** (60-70%) sont **excitateurs** et utilisent le **glutamate** comme neurotransmetteur alors que les interneurones qui sont **inhibiteurs** (30-40%) utilisent l'acide γ -aminobutyrique (**GABA**) et/ou la **glycine**¹⁴²⁻¹⁴⁶.

Les neurones de projections sont répartis dans la couche (ou *lamina*) la plus superficielle (I) ainsi que les couches plus profondes (III-VII). Ils projettent vers des structures supra spinales du tronc cérébral (substance grise périaqueducale, noyau parabrachial) ainsi que vers l'encéphale notamment le thalamus^{147,148}.

Les interneurones sont présents dans toutes les couches mais sont particulièrement denses dans la lamina II et leurs interactions intègrent et filtrent les informations nociceptives venant des neurones sensoriels primaires avant leur transmission aux neurones de projection. Il est important de considérer que l'**équilibre** entre la **composante excitatrice et inhibitrice** constitue un élément capital dans l'intégration et le filtrage des entrées nociceptives¹⁴².

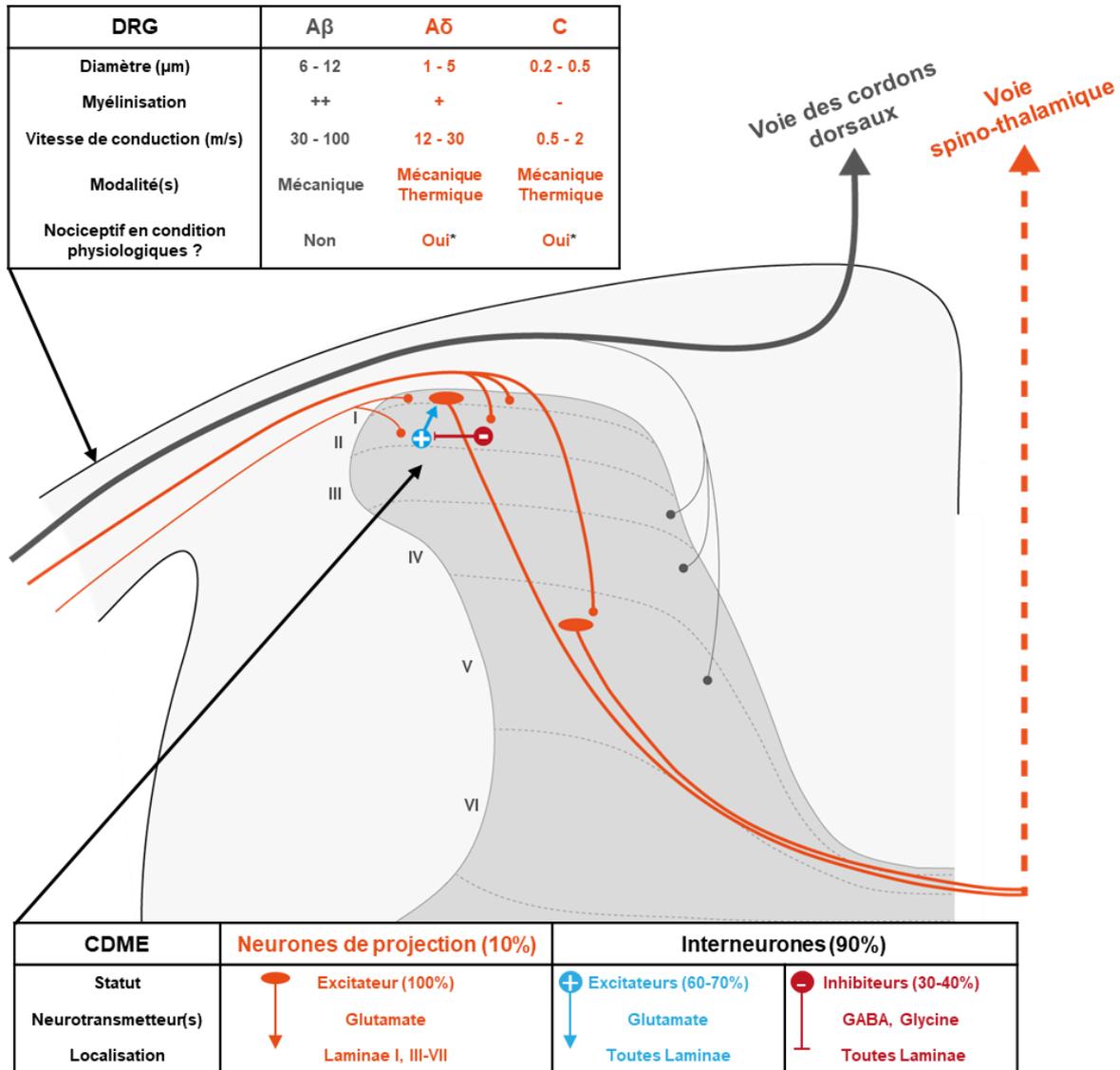


Figure 3. Les fibres périphériques et le réseau de la corne dorsale de la moelle épinière.

Les fibres A β sont des fibres de gros diamètre, myélinisées avec une vitesse de conduction élevée. Elles représentent des fibres mécanosensibles non-nociceptives à bas seuil¹³⁸. Leurs terminaisons périphériques sont encapsulées et constituent différents mécanorécepteurs de la peau¹⁴⁹. Bien qu'une petite proportion de leurs terminaisons centrales soient dans les couches (*laminae*) profondes de la CDME (III-V), elles projettent principalement au niveau thalamique et emprunte la voie des cordons dorsaux. Les fibres A δ ont un diamètre moyen, sont faiblement myélinisées avec une vitesse de conduction moyenne alors que les fibres C ont un petit diamètre, ne sont pas myélinisées avec une vitesse de conduction faible. Les terminaisons périphériques A δ et C sont libres et réparties dans l'épiderme ou les organes internes et sont principalement activés par des stimuli nocifs de nature thermique ou mécanique. Leurs terminaisons centrales sont au niveau de la CDME, principalement dans les couches superficielles (I-II) et vont faire synapse avec des interneurones ainsi que des neurones de projections^{141,150}. Au sein du réseau de la CDME, les neurones de projections ne représentent qu'une faible proportion de neurones totaux. Ils sont localisés dans la lamina la plus superficielle et certaines plus profondes et constituent la voie de sortie du réseau, projetant vers des structures supra-spinales comme le thalamus par exemple par la voie spino-thalamique¹⁵¹. La majorité des neurones de la CDME sont des interneurones glutamatergiques pour la plupart mais aussi GABAergiques et glycinergiques. Ils sont responsables du filtrage et de l'intégration de l'information nociceptive avant sa transmission aux neurones de projections puis aux centres supérieurs.

*Simplification, parmi les A δ et C on retrouve aussi des fibres thermosensibles et des mécano-sensibles non-nociceptives^{138,152}.

Le message nociceptif est modulé au cours de son trajet de la périphérie vers le cortex cérébral. Cette **modulation** est particulièrement importante dans la corne dorsale de la moelle épinière. Deux types de modulations peuvent être distingués à ce niveau. L'une par les fibres sensorielles tactiles non nociceptives et décrite par le concept du « *gate control* », théorisant **l'interaction entre les voies neuronales tactile et nociceptive**, rendant compte de l'observation qu'un léger toucher peut diminuer la sensation de douleur aiguë^{153,154}. L'autre met en jeu des voies descendantes provenant de nombreuses régions **supra-spinales** et notamment du tronc cérébral¹⁵⁵ détaillé ci-après.

1.3. Intégration cérébrale

► *Pour une revue détaillée*¹⁵⁶

Après cette intégration spinale complexe, le message nociceptif, véhiculé par les neurones de projection, atteint l'encéphale par différentes voies. Chez l'humain il s'agit notamment de la **voie spinothalamique** et accessoirement de la **voie spino-parabrachiale**^{151,156}. Au niveau du **thalamus**, les informations ascendantes sont intégrées et filtrées, principalement dans les noyaux ventro-postéro-latéraux, -inférieurs et -médiants^{157,158}. Elles sont ensuite transmises à différentes structures cérébrales constituant la « **matrice de la douleur** ». Cette matrice est en réalité un ensemble de structures qui interagissent entre elles pour donner lieu à la sensation de douleur consciente et subjective qui possède des composantes sensori-discriminative, cognitive et affective¹⁵⁸. Ces processus sont très rapides et la sensation de douleur consciente apparaît avec un délai inférieur à une seconde dans des conditions physiologiques.

Dans un premier temps la **matrice de premier ordre** ou **matrice nociceptive** est constituée de structures sensori-motrices qui reçoivent des projections directes de la voie spinothalamique. Elle regroupe schématiquement l'insula postérieure ainsi que le cortex somatosensoriel primaire (SI), des régions pariétales postérieures, le cortex cingulaire (médian) postérieur (CCP) et l'aire motrice supplémentaire (SMA)¹⁵⁹⁻¹⁶¹. L'activation de cette matrice nociceptive est responsable de **l'aspect sensori-discriminatif** de la douleur physique et peut entraîner des processus pré-moteurs et d'orientation rapides.

Dans un second temps, un ensemble de régions corticales est quasi invariablement activé par un stimulus nociceptif mais ne reçoit pas d'entrée somato-sensorielles directes. Cette **matrice de deuxième ordre** inclut l'insula antérieure, la partie médiane du cortex cingulaire antérieur (CCA) et les aires préfrontales (PFC) et pariétales postérieures (PPC). À la différence de la matrice nociceptive, ces régions ne sont pas spécifiques des modalités véhiculées par la voie spino-thalamique et peuvent être activées par des stimuli sensoriels non nociceptifs. Cette matrice est ainsi supposée responsable de **l'attribution de la saillance** des stimuli nocifs notamment dans le but d'entraîner des contrôles attentionnels descendants. Elle est donc souvent appelée **matrice de la saillance**.

Bien sûr cette expérience initiale de douleur provenant de ces différents réseaux peut être modifiée en fonction des croyances, des émotions et des processus attentionnels. Des régions liées à un plus haut niveau de **cognition** et d'affect comme les cortex antéro-latéral et orbitofrontal, l'aire tegmentale ventrale ainsi que le système limbique sont entre autres

impliquées et sont parfois considérées comme constituant une **matrice de troisième ordre**. L'activité de cette sous-matrice, y compris précédant un stimulus nocif, peut modifier l'intégration par les deux autres.

La douleur, ensuite encodée dans le système mnésique par exemple, est le résultat d'une interaction continue de ces différentes sous-matrices et ne peut pas être prédite par l'activité unique des aires sensorielles et associatives^{158,162-165}.

1.4. Les contrôles descendants

► *Pour une revue détaillée*¹⁵⁵

En retour, les **centres supra-spinaux** peuvent **moduler** les informations nociceptives ascendantes notamment par l'intermédiaire de projections plus ou moins directes au niveau de la **CDME**. Les structures principales impliquées dans ces contrôles sont le PFC, l'hypothalamus, l'amygdale mais surtout des noyaux du pont comme le *Locus Coeruleus*, les noyaux parabrachiaux, les noyaux du raphé magnus, la moelle rostroventromédiale (RVM) et la substance grise périaqueducale (PAG)^{155,166}.

La PAG est centrale dans ces processus car elle possède des connections bidirectionnelles avec le PFC et l'amygdale et contrôle l'activité de la RVM. Cette dernière projette directement vers la CDME et permet d'inhiber l'intégration spinale ou de la faciliter.

Globalement, les projections descendantes peuvent être excitatrices ou inhibitrices via différents neurotransmetteurs et projettent sur des neurones et des cellules gliales du réseau de la CDME^{153,155,167}. Par exemple, les contrôles descendants inhibiteurs, potentielle source d'analgésie, peuvent s'effectuer via des projections **GABAergiques**, **glycinergiques** mais aussi **sérotoninergiques** et **noradrénergiques**^{155,168}.

2. Mesure de la Nociception de la Douleur chez l'Humain

Tous les acteurs du « circuit de la douleur » vont finalement par leurs interactions réciproques donner potentiellement lieu à une sensation de douleur dans ses aspects sensori-discriminatifs, cognitifs et affectifs. Chez l'humain, c'est cette douleur globale qui est ressentie et parfois exprimée dans un contexte médical. Cependant, bien qu'il semble évident qu'évaluer une douleur soit capital lors d'un examen clinique, cela peut parfois s'avérer délicat. Les méthodes utilisées peuvent être directes ou indirectes, objectives ou subjectives et dépendent de l'âge, de l'état physiologique et psychologique du sujet. Une liste exhaustive des outils disponibles en clinique peut être consultée sur le site de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur¹⁶⁹.

2.1. Auto-évaluation

L'auto-évaluation est la méthode la plus utilisée et repose sur le **jugement par l'individu de sa propre sensation de douleur**. Elle est méthodologiquement simple et inclut le patient ainsi que son expérience subjective mais implique une communication. En effet, cette communication permet de préciser beaucoup de paramètres comme la sévérité, la nature, l'origine ainsi que des informations rétrospectives sur les expériences passées.

Le plus souvent, chez l'adulte conscient et capable de s'exprimer et chez l'enfant âgé de plus de 6 ans, des **échelles unidimensionnelles** numériques verbales ou visuelles analogiques qui permettent au patient de préciser l'intensité de sa douleur ainsi que des schémas corporels pour indiquer sa localisation. Pour les jeunes enfants (4 à 6 ans), les méthodes utilisées chez l'adulte ont été adaptées, avec par exemple des échelles visuelles analogiques représentant des visages plus ou moins expressifs d'un certain degré de souffrance ou des schémas corporels grossiers (« bonhommes »). Ces méthodes simples permettent une première évaluation de la douleur d'un individu ainsi que le suivi de l'efficacité d'un traitement antalgique mais ne donnent pas ou peu d'informations sur les caractéristiques de la douleur.

Ainsi, des approches plus complexes sont parfois utilisées, comme des **échelles dites multidimensionnelles**, à la fois quantitatives (intensité) et qualitatives (type de douleur, modalité, impact psychologique...). Elles tiennent compte de la composante sensori-discriminative mais aussi affective de la douleur. En France, le questionnaire douleur de l'hôpital Saint-Antoine, version française du *McGill Pain Questionnaire*, est l'un des plus utilisés^{170,171}.

2.2. Hétéroévaluation

Il est cependant des cas où ces méthodes ne sont pas appropriées, notamment lorsque la communication est impossible ou que les capacités cognitives nécessaires à l'introspection sont insuffisantes (nouveau-né, déficit intellectuel, état végétatif...). De nombreuses méthodes d'évaluation alternatives ont donc été développées. Elles reposent sur l'**observation** par un autrui de **certains signes cliniques** ; on parle alors d'**hétéroévaluation**.

Ces méthodes reposent sur l'observation de signes indirects comme des vocalisations paralinguistiques (pleurs, grognements...), des expressions faciales, la posture du corps ou de toute action dont le but est de minimiser ou de se protéger de la douleur. Schématiquement, tous les signes liés aux efforts de la personne pour faire face de manière efficace ou non à l'inconfort de la douleur doivent être pris en compte^{172,173}.

Il est intéressant de noter que l'expression indirecte non verbale de la douleur est souvent considérée comme plus spontanée et automatique, c'est pourquoi les observateurs lui accordent généralement une importance considérable et la décrivent comme plus crédible¹⁷⁴.

2.3. Méthodes alternatives physico-chimiques

D'autres méthodes de mesure se voulant plus objectives ont cependant été développées. Certaines, comme le test sensoriel quantitatif (QST), utilisent des stimulations thermiques et mécaniques standardisées pour évaluer la modalité somato-sensorielle dans son ensemble mais nécessitent l'absence de déficience intellectuelle majeure chez le sujet¹⁷⁵. Finalement, des outils plus indirects, principalement utilisés en anesthésie, analysent des paramètres autonomes, notamment l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique lors d'une expérience nociceptive. Ainsi, la fréquence cardiaque et sa variabilité, la pression artérielle, le degré de dilatation de la pupille, la conductance électrodermale sont de bons indices du niveau de nociception¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

3. Focus sur les différences sexuelles

► *Pour une revue détaillée*¹⁷⁹

Chez l'humain, des différences dans la prévalence mais aussi l'intensité sont décrites entre les sexes pour différentes formes de douleurs¹⁸⁰⁻¹⁸⁴. Quantitativement, la littérature chez l'humain semble s'accorder sur le fait que les **femelles sont plus sensibles à la douleur mais aussi plus tolérantes**¹⁸⁵. Chez l'animal, la même donnée est retrouvée avec une sensibilité plus importante des rongeurs femelles à la douleur aigue ou chronique¹⁷⁹.

Cependant, il serait erroné de réduire les différences sexuelles à un **aspect quantitatif**.

En effet, un certain nombre de mécanismes biologiques semblent exister pour un sexe mais pas pour l'autre, ce qui ajoute un **aspect qualitatif**. En effet, bien qu'un certain nombre de processus biologiques concernant la nociception et la douleur soient partagés par les deux sexes, des spécificités sexuelles importantes sont présentes. Les observations chez l'humain ainsi que la modélisation chez l'animal montrent l'implication d'acteurs cellulaires et moléculaire. Ceux-ci, concernent les **phénomènes neuro-immuns** ainsi que certains neuromédiateurs comme les **opioïdes** ou **catécholamines**¹⁷⁹.

Ces différences peuvent être expliquées par des aspects génétiques et épigénétiques ou par l'effet des hormones sexuelles. Par exemple, les œstrogènes, la progestérone ou les androgènes peuvent moduler certains mécanismes bien qu'il soit difficile de les classer en hormones pro- ou anti-nociceptives^{186,187}. Cependant, le fait que certaines différences soient observées avant

la puberté suggère que les hormones ne sont pas responsables de la totalité des différences sexuelles relevées¹⁷⁹.

En effet, certaines données de la littérature suggèrent que ces différences biologiques n'expliquent seraient seulement responsables de 0.4% de la variance liée au sexe dans le cadre de la douleur et la nociception mais que la majorité cette variance (7.9%) proviendrait des interactions entre le facteur environnement et le facteur sexe¹⁸⁸. Par exemple, le contexte environnemental, le stress, régime alimentaire ou mêmes les interactions sociales ont tous été montrés comme pouvant moduler les phénomènes nociceptifs et douloureux et cette influence est parfois décrite comme dépendant du sexe¹⁷⁹.

Dans le cadre de notre étude, il est important de remarquer que les interactions sociales qui sont différentes en fonction du sexe peuvent affecter la réponse à la douleur^{189,190}. En effet, ceci apparait comme capital concernant les TSA dans lesquels ces aspects sont altérés.

CONCLUSION SUR LA DOULEUR ET LA NOCICEPTION

La douleur résulte de l'interprétation consciente et subjective de l'information nociceptive. Cette information résulte de la transduction de stimuli potentiellement nocifs pour l'organisme par les nocicepteurs en signaux électriques ensuite intégrés et filtrés au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière puis au niveau cérébral. L'interaction entre ces acteurs peut donner lieu à une sensation de douleur dans ses aspects sensori-discriminatifs et cognitivo-affectifs. Cette sensation peut ensuite être évaluée dans un contexte médical, le plus souvent avec de l'auto-évaluation mais parfois le recours à l'hétéroévaluation est nécessaire lorsque les capacités de communication, d'interactions sociales ou de cognition sont altérées. Cela est notamment le cas dans le cadre des troubles du spectre autistique, ce qui fait de l'évaluation de la douleur chez ces individus un défi majeur.

II. TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE ET DOULEUR

Pendant longtemps, les sujets autistes étaient **considérés comme insensibles à la douleur**. Des observations de réactions inhabituelles lors d'une situation douloureuse et d'automutilations conjuguées à certaines descriptions cliniques anecdotiques et quelques récits autobiographiques ont longtemps renforcé cette position^{191,192}. A tel point, qu'aujourd'hui, les critères diagnostiques des TSA incluent une « apparente insensibilité à la douleur »². Cependant, il semble nécessaire de mettre ce critère en perspective et de disséquer plus précisément la question de la douleur dans le cadre des TSA. En effet, du fait des déficits dans la communication et les interactions sociales qui caractérisent les sujets autistes ainsi que des potentiels déficits intellectuels associés, il est très difficile d'évaluer la douleur chez ces individus¹⁹³. Cette question reste importante car ils sont **statistiquement plus** amenés à expérimenter des **situations douloureuses** au cours de leur vie du fait des nombreuses comorbidités (épilepsie, troubles gastro-intestinaux...), et car ils présentent un risque de blessure plus élevé¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Tous ces biais peuvent entraîner une mauvaise prise en charge de la douleur et entraîner des conséquences à long terme telles que des troubles du sommeil, de l'anxiété ou de la dépression, déjà très prévalentes dans les TSA¹⁹⁷.

1. Evaluation de la douleur dans le cadre des TSA

1.1. Le défi de la symptomatologie TSA

Les altérations dans la communication et les interactions sociales inhérentes aux TSA peuvent sans aucun doute influencer l'expérience douloureuse de l'individu mais aussi de ceux qui l'entourent. En effet, la douleur est une expérience sociale à part entière et la relation entre sensation de douleur et aspects sociaux est maintenant bien décrite dans le modèle social de la douleur¹⁷³. D'une part la situation douloureuse peut influencer la manière dont l'individu va interagir avec ses pairs. Par exemple, dans le cadre d'une maladie source de douleur, il est souvent observé une détérioration des relations sociales et un certain isolement ce qui mène ensuite à un renforcement de la douleur en elle-même et des comportements liés à la maladie¹⁷³. D'autre part, lors d'une situation douloureuse, l'interaction sociale et la communication sont capitales pour prévenir autrui et ainsi entraîner les réactions d'empathies ou de soins nécessaires pour diminuer l'inconfort de cette situation.

Ainsi, les personnes qui sont moins efficaces dans leurs **interactions sociales** ou leur **communication**, comme les individus atteints de TSA, peuvent avoir du mal à convaincre autrui (famille, soignants, éducateurs...) de leur souffrance ou inconfort et leurs douleurs

peuvent être ignorées ou mal traitées. En conséquence, le fait que cette douleur soit adressée de manière adéquate repose en grande majorité sur l'évaluation de celle-ci par autrui. L'association internationale pour l'étude et le traitement de la douleur précise que « l'incapacité à communiquer verbalement n'exclut en rien la possibilité qu'un individu éprouve une douleur et ait besoin d'un traitement antalgique » (IASP).

Cependant, savoir si un changement dans l'expression de la douleur reflète un changement dans son expérience ou est le reflet d'une modulation par la symptomatologie TSA est un défi considérable. La douleur est une expérience très complexe dont les paramètres peuvent être très difficiles à traduire en mots. Ceci s'avère donc particulièrement difficile lorsque la compétence de **langage n'est peu voire pas disponible** chez certains individus avec des troubles cognitifs ou de communication verbale^{173,198}. De plus, bien qu'une part des individus TSA ne présentent pas de **déficience intellectuelle**, cette comorbidité pose des défis concrets auprès du corps médical et des proches^{11,193,198}. En effet, la douleur étant une sensation subjective intégrée qui repose sur une composante cognitivo-affective importante, elle nécessite des capacités cognitives et introspectives intactes, ce qui n'est pas toujours le cas dans le cadre des TSA.

1.2. Les outils utilisés

Du fait de sa symptomatologie, l'évaluation de la douleur d'un sujet atteint de TSA que ce soit au quotidien ou dans un contexte clinique peut s'avérer compliquée et les méthodes d'auto-évaluation utilisées traditionnellement sont peu adaptées. Cependant, il n'y a pas encore de protocole validé permettant de mesurer la douleur chez l'ensemble des patients TSA. Néanmoins, des échelles d'**hétéroévaluation**, validées chez des enfants incapables de communiquer verbalement ou ayant des déficits cognitifs importants, peuvent être utilisées chez certains enfants autistes. Récemment, l'échelle NCCPC (*Non-communicative Children Pain Checklist*) a été validée en français sous le nom de Grille d'Évaluation Douleur-Déficience Intellectuelle¹⁹⁹. À l'origine, cette grille a été conçue pour quantifier la douleur post-opératoire chez des enfants non communicants. Après quelques ajustements prenant en compte les réactions émotionnelles, l'hypervigilance ainsi que les expressions idiopathiques et douloureuses spécifiques des TSA, elle est également utilisable pour quantifier la douleur au quotidien chez la plupart des enfants autistes²⁰⁰. Elle évalue six catégories d'items : les expressions vocales, l'activité sociale, les expressions faciales, le tonus et la réactivité ainsi que des signes physiologiques.

Il est important de noter que ces échelles comportementales d'évaluation de la douleur doivent être appliquées prudemment dans le cadre des TSA dont les individus sont connus pour avoir des expressions atypiques. Les parents et observateurs doivent être familiarisés avec le comportement ordinaire de la personne pour espérer être capable de détecter les signaux anormaux et de reconnaître ceux-ci comme une réponse à la douleur^{193,201}.

Finalement, comme chez les sujets neurotypiques, les outils de mesure de l'activité du système nerveux autonome peuvent également être utilisés^{202,203}.

2. Sensibilité nociceptive et douloureuse des individus TSA

► *Pour des revues détaillées*^{191,204}

Bien qu'un certain nombre d'éléments suggèrent que la réaction à la douleur des sujets autistes est altérée par rapport à la population neurotypique, les observations ne font pas consensus. De manière générale, la sensibilité et les réactions comportementales lors d'une expérience douloureuse sont souvent analysées selon des protocoles très divers. Dans le cadre des TSA, ceux-ci prennent en compte les rapports faits par les parents, par les éducateurs spécialisés ou des observations antérieures faites à la suite d'interventions médicales potentiellement douloureuses (prise de sang, soins dentaires) et lors de tests expérimentaux. Par conséquent, les résultats sont très hétérogènes et dépendent en grande partie de la méthodologie utilisée ainsi que du contexte dans lequel des évaluations ont été réalisées.

2.2. Les interviews et questionnaires

A travers des interviews avec des proches d'individus atteints de TSA ou la lecture de récits autobiographiques, un certain nombre d'informations suggèrent une **sensibilité diminuée** à la douleur^{191,205,206}. Par exemple, des descriptions mentionnent des enfants prenant un poêle à frire brûlant sans réponse douloureuse, des auto-extractions dentaires sans anesthésie, ou des abcès dentaires normalement très douloureux passant inaperçus en l'absence de manifestations de douleur^{205,207-209}.

De plus, les évaluations via des questionnaires distribuées aux parents ou au personnel médico-social décrivent une proportion importante d'insensibilité à la douleur (40%)²¹⁰. Bien que la plupart des études décrivent un hypo-réactivité, d'autres retrouvent un hyper-réactivité ou une réactivité non altérée^{202,210-212}. Cependant, une grande différence est retrouvée entre les observations par les parents, les éducateurs ou le personnel médical ce qui limite la portée de ce genre d'approche^{202,211}.

2.3. Les observations cliniques

Lors d'une prise de sang ou de soins dentaires, des études démontrent une diminution de réactivité comportementale à la douleur par rapport au groupe témoin, d'autres une augmentation alors que certaines ne démontrent aucune différence^{192,201,202,211,213}.

Il est important de considérer, qu'une réactivité comportementale diminuée, chez les sujets TSA par rapport aux sujets témoins, n'indique pas nécessairement une sensibilité moindre, mais un **mode d'expression de la douleur potentiellement différent** faisant suite aux troubles de communication, de représentation du corps et aux déficits intellectuels associés^{192,202}. Par exemple, lors de la mesure de paramètres indirects plus objectifs, comme l'activité du système nerveux autonome, des études retrouvent une augmentation plus importante de la fréquence cardiaque lors de la réalisation d'une prise de sang, indiquant une hyper-sensibilité, alors que l'échelle comportementale réalisée en parallèle démontrait une hyposensibilité²⁰².

Encore une fois, ces approches sont très dépendantes de l'observateur, notamment dans le cadre des TSA. En effet de degré de discordance entre les observations par le corps médical ou par les parents lors d'une prise de sang de la sensibilité douloureuse est plus importante dans la population TSA que chez les neurotypiques²¹¹.

2.4. Les études physico-chimiques

Des études se voulant plus standardisées utilisent des stimulations nociceptives calibrées comme dans le QST (Table 4). La plupart de ces études ne retrouvent **aucune différence systématique de sensibilité à la douleur** entre les sujets TSA et les sujets neurotypiques. Cependant, en distinguant les différentes modalités nociceptives, certaines différences semblent apparaître, mais elles sont loin d'être consensuelles entre les études. Par exemple, concernant la sensibilité nociceptive thermique au chaud et au froid, à la fois une hyper-sensibilité et une absence de différence sont décrites^{127,132,203,214-216}. Quant aux études relatives à la modalité nociceptive mécanique, elles indiquent des normo-, des hypo- ou des hyper-sensibilités^{132,215,217,218}.

Les méthodes de seuil de douleur ou même de tolérance ne permettent pas toujours de mettre en évidence des différences dans le ressenti de la douleur car elles n'évaluent que peu de paramètres. Cependant, certaines études utilisant des questionnaires multidimensionnels afin d'évaluer différents aspects de la douleur, décrivent une **diminution des aspects affectifs et subjectifs** sans modification de l'aspect sensori-discriminatif et du seuil global de sensibilité à la douleur. Ces données suggèrent donc une potentielle altération des voies/structures responsable de l'aspect cognitif et affectif de la douleur²¹⁶. Néanmoins, ces méthodes nécessitent des capacités introspectives et cognitives intactes ce qui n'est pas toujours le cas chez les patients TSA. Par exemple, il apparaîtrait que les **sujets décrits comme hypo-sensibles soient ceux ayant les symptômes autistiques les plus sévères**²¹⁹. Ceci est d'autant plus important à prendre en compte que la quasi-totalité des études évaluant la sensibilité douloureuse et nociceptive des patients autistes a été réalisée chez des sujets sans déficience intellectuelle.

Néanmoins, il est intéressant de noter que certains patients autistes présentent des **sensations paradoxales de chaleur** (*i.e.* sensation de chaleur ou de brûlure lors d'autres stimulations que des stimulations thermiques chaudes) et des **allodynies mécaniques dynamiques** que l'on ne retrouve pas chez les sujets témoins^{132,214,215}. Ces particularités peuvent laisser penser que l'encodage des signaux nociceptifs conduisant à la sensation de douleur peut être altéré chez certains sujets autistes.

Population TSA	Modalités				Autres observations	Références
	Thermique chaud	Thermique froid	Mécanique	Autres		
Effectif = 18 Age = 36,4 ♂/♀ = 18/0 QI = 115,8				●**	De faibles stimulations sont considérées comme plus inconfortables.	220
Effectif = 8 Age = 29,0 ♂/♀ = 7/1 QI > 70	●*	●				127
Effectif = 15 Age = 25,8 ♂/♀ = 2/3 QI = 101,8	●	●		●**	Hyposensibilité sur l'aspect subjectif et affectif de la douleur.	216
Effectif = 20 Age = 14,6 ♂/♀ = 15/5 QI = 104,1	●	●			Sensations paradoxales de chaleur (30%)	214
Effectif = 31 Age = 20,5 ♂/♀ = 29/3 QI = 101,4	●				Diminution de l'amplitude de la réponse cérébrale.	203
Effectif = 15 Age = 27,53 ♂/♀ = 14/1 QI = 102,27	●				Diminution de la réponse cérébrale lors d'une douleur soutenue	221
Effectif = 13 Age = 31,7 ♂/♀ = 7/6 QI = 111,6	●	●	●		Allodynie mécanique dynamique (15%) Sensations paradoxales de chaleur (30%)	132
Effectif = 13 Age = 27,22 ♂/♀ = 7/6 QI > 70	●	●	●		Allodynie mécanique dynamique Sensations paradoxales de chaleur (35%)	215
Effectif = 34 Age = 20,4 ♂/♀ = 32/2 QI > 90			●			218
Effectif = 27 Age = 6,3 ♂/♀ = 20/7 QI = « non altéré »			●			217
Observations en faveur d'une sensibilité préservée (●), d'une hypo-sensibilité (●) et d'une hyper-sensibilité (●).						

Table 4. Sensibilité douloureuse des patients TSA évaluée avec des méthodes physico-chimiques.

Chez l'humain, la sensibilité douloureuse est souvent mesurée par l'application d'une stimulation d'intensité variable, le sujet indique lorsque celle-ci devient douloureuse. Pour la modalité thermique, le sujet est exposé à une température croissante pour le chaud et décroissante pour le froid. La sensibilité douloureuse mécanique est mesurée sur le même principe, en appliquant une force croissante à l'aide d'un dynamomètre calibré. La stimulation électrique stimule directement les fibres périphériques de la peau en utilisant un courant sinusoïdal d'intensité croissante. Cette méthode diffère de l'échelle verbale dans laquelle le sujet score sur une échelle numérique l'intensité d'une stimulation donnée. Il est important de noter que la plupart des études sont réalisés chez des individus avec TSA sans déficiences intellectuelles ce qui peut grandement biaiser les résultats. * Résultats variables entre 2 sessions. ** Stimulations de nature électrique.

2.5. Les hypothèses pour une douleur modifiée

Schématiquement, l'« apparente indifférence à la douleur » décrite dans le DSM-V pourrait être expliquée par différents éléments²²². Premièrement, des modifications sensorielles généralisées plus ou moins marquées sur certaines modalités comme la nociception et la sensation de douleur qui lui est associée. Deuxièmement, la symptomatologie TSA en elle-même. Les déficits dans la communication et l'interaction sociale, les comportements restreints et répétitifs ou les comorbidités psychiatriques telles que l'anxiété et la dépression pourraient modifier la perception et compréhension de l'environnement et ainsi la sensation ou l'expression de la douleur. Finalement, des modifications spécifiques du système dédié à la nociception et douleur pourraient donc expliquer les observations comportementales. Vraisemblablement, tous ces éléments sont impliqués et interagissent ensemble pour donner le tableau clinique si hétérogène observé concernant la douleur dans le cadre des TSA.

2.5.1. Dysfonction globale des systèmes sensoriels

L'altération globale de l'intégration sensorielle pas seulement restreinte au système nociceptif et à la douleur pourrait expliquer certaines observations mais ne sera pas détaillé dans cette partie (*cf* ci-avant « Focus sur les altérations sensorielles »).

2.5.2. Une réponse à la douleur modifiée

Les réactions à la douleur sont bien décrites et elles constituent un élément important dans la communication de sa souffrance, notamment dans le cadre des TSA. En effet elles constituent les signes non-verbaux de douleur.

2.5.2.1. Les réponses motrices

Les réactions motrices consistent en retrait vis-à-vis de la source de douleur ou certaines expressions faciales spécifiques. De manière générale, l'activité motrice est sujette au contrôle des systèmes moteurs volontaires et involontaires. D'une part le réflexe moteur involontaire permet le retrait de la source de douleur pour éviter des dommages tissulaires. D'autre part une expression motrice volontaire contrôlée peut chercher à convaincre autrui de la gravité ou non gravité de sa souffrance. Cependant, ces contrôles nécessitent des systèmes somatiques, cognitifs, émotionnels et comportementaux compétents et intacts. De plus, en sachant que les **altérations motrices sont fréquentes** dans le cadre des TSA, elles pourraient influencer la réaction face à une situation douloureuse et ainsi l'évaluation de celle-ci par un observateur extérieur²²³.

En effet, les réponses motrices, que ce soient les réactions corporelles ou les expressions faciales à la douleur des sujets TSA sont souvent décrites comme retardées ou aberrantes par les parents ou le personnel médical²⁰⁰. Par exemple, certaines descriptions incluent l'absence de protection du corps ou d'évitement de la source de douleur, des réactions déviantes tel que des rires paradoxaux, de l'agressivité, des comportements stéréotypés et d'automutilation ou bien une expression de l'inconfort sans précision de la localisation de la source de douleur. De plus, les expressions faciales sont souvent considérées comme bizarres ou atypiques dans le cadre des TSA²²⁴. En effet, les individus sont décrits comme ayant des expressions émotionnelles plus

courtes, moins fréquentes et de moins bonne qualité (moins précises et moins intenses) que les neurotypiques. Ce signe est décrit comme de **l'amimie** dans les rapports cliniques et certains outils diagnostiques incluent les « expressions faciales inappropriées » comme un signe précoce de TSA²²⁵.

2.5.2.2. Les réponses physiologiques

La douleur entraîne un certain nombre de réponses physiologiques contrôlées par les systèmes nerveux sympathiques et parasympathique¹⁷⁸. Ces réponses peuvent être mesurées indirectement via les modifications de la fréquence cardiaque ou respiratoire, de la conductance électrodermale, de la pression artérielle, de diamètre de la pupille et reflètent une activation du système nerveux sympathique.

Les études concernant ces réponses dans le cadre des TSA ne démontrent aucune différence pour ce qui est de la conductance électrodermale ou de la fréquence cardiaque^{201,226}. Une seule étude démontre une augmentation plus importante de la fréquence cardiaque lors d'une prise de sang chez des individus autistes²⁰². Mais il est à noter que des procédures telles qu'une prise de sang ou des soins dentaires peuvent entraîner du stress ce qui pourrait altérer la réelle réponse à la douleur. En effet la fréquence cardiaque lors d'une prise de sang était déjà plus élevée chez les individus TSA par rapport aux contrôles avant même la procédure²⁰².

Ainsi, des méthodes prédictives utilisant un ensemble de paramètres physiologiques (conductance électrodermal, fréquence cardiaques) dont les réponses semblent préservées dans les TSA pourraient être utilisées pour compléter les approches comportementales et les biais qui leur sont liés²²⁷.

2.5.3. Modifications de l'encodage nociceptif

Il y a cependant certaines observations qui suggèrent fortement que l'encodage nociceptif pourrait être altéré chez les individus TSA.

2.5.3.1. La détection et l'encodage des stimuli nociceptifs

Certaines observations suggèrent des modifications des fibres périphériques responsables de la transduction et transmission des stimuli potentiellement nocifs. En effet, la densité de terminaison libres intra-épidermiques est réduite dans les TSA et est corrélée avec les symptômes autistiques²²⁸. De plus, certaines données de transcriptomique suggèrent des modifications dans l'expression de canaux sodiques voltage dépendant Nav1.7, capitaux dans la fonction des neurones sensoriels nociceptifs^{229,230}. Il est intéressant de noter que les mesures du seuil de douleur reflètent les mécanismes de détections des stimuli en périphérie et que ces seuils semblent être majoritairement intacts dans les TSA^{132,214,215}. Cependant, ces mesures sont à relativiser du fait de la potentielle implication de facteurs externes et internes (contexte, historique personnel de douleur, état émotionnel...).

2.5.3.2. L'encodage nociceptif central

Bien qu'il ait été suggéré que des modifications au niveau de la moelle épinière pourraient être responsables des observations comportementales²³¹, aucune étude ne vient corroborer ces suppositions. Ceci est largement attribuable à la difficulté de l'étude de cette structure chez l'Humain avec des procédures non-invasives. Ainsi la majorité des études évaluant l'intégration centrale de la nociception se concentre sur l'intégration supra-spinale décrite par le concept décrit précédemment de matrice nociceptive.

Ces études révèlent des contradictions très intéressantes. Par exemple, la réponse corticale observée en électroencéphalographie à la suite d'une stimulation nociceptive chaude, appelée potentiel évoqué thermique, est diminuée chez les individus TSA par rapports aux témoins, et ceci même si l'intensité n'est pas évaluée comme différente sur l'échelle verbale²⁰³. Ainsi, l'absence de différences dans la sensibilité douloureuse comportementale retrouvée dans certaines études n'indique pas forcément l'absence de différences dans l'encodage central des stimulations nociceptives. De plus, alors qu'initialement la réponse cérébrale « signature » de la douleur n'est pas différente chez les sujets TSA par rapports aux témoins, elle est grandement réduite lors d'une douleur soutenue²²¹. Ceci alors même, qu'une fois encore, l'intensité évaluée à l'aide d'une échelle verbale n'est pas différente. Cette observation suggère que la sensibilité douloureuse n'est pas forcément altérée mais que la manière de faire face à une douleur sur le plan cognitivo-affectif pourrait être différente entre les sujets TSA et neurotypiques et pourrait expliquer en partie la coexistence des hypo- et hyper-sensibilités.

Plusieurs structures cérébrales de la « matrice de la douleur » ont été décrites comme modifiées chez les individus TSA ce qui pourrait entraîner de modification dans l'intégration nociceptive et douloureuse.

Le thalamus, considéré comme le noyau majoritaire qui distribue les informations nociceptives aux différentes structures corticales et sous corticales, est décrit comme modifié sur les plans morphologiques et fonctionnels dans le cadre des TSA²³²⁻²³⁵. De plus, le thalamus des sujets TSA est activé de la même manière initialement lors d'une stimulation nociceptive chaude mais devient moins activé lorsque la stimulation est soutenue chez les sujets TSA par rapports aux témoins²²¹. Ceci suggère que la phase nociceptive de courte durée serait intacte au niveau du thalamus mais que des modifications apparaissent lorsque la stimulation se poursuit. Le thalamus étant un noyau important pour diriger les informations nociceptives vers les aires appropriées il est nécessaire d'évaluer sa connectivité notamment avec les aires corticales car celle-ci nécessite d'être intacte pour entraîner une sensation de douleur complète. Chez les individus TSA, certaines études décrivent une hypo-connectivité thalamo-corticale alors que d'autres une hyper-connectivité^{233,234,236}. Les modifications de la connectivité du thalamus pourraient donc être responsables de l'attribution à tort de douleur pour des stimulations bénignes tactiles (allodynie mécanique) chez certains individus TSA^{132,204,215}.

Le cortex somatosensoriel est souvent considéré comme responsable des aspects sensori-discriminatifs (localisation, intensité...) de la douleur. Des altérations de cette structure sont déjà décrites dans le cadre des TSA^{46,237}. La réduction du volume de la substance grise dans les régions somato-sensorielles et une possible altération de la substance blanche thalamo-

corticale est ainsi associée avec la présence de comportements automutilateurs, sources potentielles de douleur²³⁸. De plus, lors d'une douleur soutenue, des auteurs rapportent une activation réduite du cortex somato-sensoriel primaire (S1) controlatéral à la stimulation mais des réponses bilatérales dans le cortex somatosensoriel secondaire (S2) chez les individus TSA²²¹.

Le cortex cingulaire, notamment antérieur (CCA) est décrit comme modifié dans les TSA^{239,240}. Encore une fois, lors d'une stimulation nociceptive chaude soutenue, il est moins activé chez les TSA par rapport aux contrôles²²¹. De même, l'amplitude et la latence des potentiels évoqués dans le gyrus cingulaire est réduite lors d'une stimulation nociceptive chaude²⁰³.

L'insula des patients TSA a déjà été décrite comme présentant des altérations structurelles et fonctionnelles^{241,242}. De manière similaire aux structures précédentes, lors d'une stimulation nociceptive chaude soutenue, elle est moins activée chez les TSA par rapport aux contrôles²²¹.

Le cortex préfrontal (PFC) est décrit comme important pour les aspects cognitifs et la mise en place des contrôles descendants antinociceptifs à court et moyen terme, modulant ainsi la sensation et la réaction à la douleur²⁴³. Dans certaines études, la réponse du PFC est observée comme réduite chez les sujets TSA lors d'une stimulation douloureuse brève alors que d'autres ne retrouvent aucune différence lors d'une stimulation nociceptive soutenue^{221,244}. Il est intéressant de remarquer que son activation est négativement corrélée au score de douleur chez les individus TSA²²¹.

2.5.4. Les contrôles internes de la douleur

Le réseau PFC-Amygdale-Hippocampe est connu comme étant impliqué dans l'intégration cérébrale de la douleur et sa modulation par l'activation de contrôles descendants facilitateurs ou inhibiteurs via des structures du tronc cérébral (PAG, *Locus Coeruleus*, RVM...). Des altérations structurelles et fonctionnelles de ce réseau ont déjà été décrites dans les TSA^{245,246}. En effet, la réduction de la connectivité entre l'amygdale et le PFC lors d'un stimulus désagréable pourrait entraîner des conséquences lors d'une situation douloureuse²⁴⁷. De plus, la théorie de « l'amygdale faible » qui sous-tend une mauvaise régulation émotionnelle dans les TSA pourrait avoir des conséquences sur la douleur²⁴⁸.

Cependant, ces systèmes inhibiteurs internes, évalués chez l'Humain par des protocoles de modulation d'une douleur conditionnée (*conditioned pain modulation*), ne semblent ne pas être altérés chez les individus TSA^{215,222}.

L'aspect social de la modulation de la douleur ne doit pas là aussi être sous-estimé dans l'intégration globale de la sensation de douleur particulièrement dans le cadre des TSA. Très souvent, une manière de réagir à la douleur d'autrui est de donner un toucher « affectif ». Ces stimulations sont transmises au cerveau via un type spécifique de fibre C tactiles non nociceptives²⁴⁹. Elles entraînent une activation de l'insula mais pas des aires somato-sensorielles et sous-tendent l'effet positif de ce type de toucher sur la douleur via une

modification de l'activation des aires nociceptives, de la sous-matrice de la saillance et des régions sous corticales comme l'amygdale, l'hypothalamus et la PAG²⁵⁰.

Cependant, ce type de stimulation tactile est souvent décrite comme étant stressant voir désagréable par les sujets TSA et entraînant parfois des réactions aversives²⁵¹. Des données montrent que l'activation cérébrale à la suite du « toucher social » est modifiée dans le cadre des TSA et était corrélé avec la sévérité de l'autisme²⁵²⁻²⁵⁴. En effet, l'activation de l'insula est d'autres régions cérébrales socio-émotionnelles sont réduites mais l'activation du cortex somatosensoriel primaire est augmentée, consistant avec une hyper-sensibilité tactile. Ceci pourrait expliquer le côté désagréable du toucher social et le mauvais fonctionnement des mécanismes de l'analgésie induite par ce type de toucher²⁵⁴.

Cependant, des stimulations répétitives périphériques non nociceptives (tactiles, vibratoires...) sont observées comme réduisant la sensibilité douloureuse mécanique de patients TSA, démontrant que ces mécanismes de modulation de la douleur par des voies non-nociceptives restent fonctionnels, au moins chez certains individus²⁵⁵.

2.5.5. L'apport des mécanismes empathiques

L'empathie vis à vis de la douleur d'autrui est liée à la subjectivité de l'individu ainsi que sa propre expérience de situations douloureuses. De plus, l'observation de quelqu'un en situation douloureuse entraîne une réponse cérébrale proche de celle lors que sa propre situation douloureuse ainsi que les réactions physiologiques qui y sont liées²⁵⁶⁻²⁵⁸. Ces mécanismes constituent un moyen d'étudier indirectement la douleur en focalisant plus sur des aspects cognitivo-affectifs. Cependant, les résultats observés dans le cadre des TSA sont contradictoires.

En effet, certaines études montrent des réponses cérébrales et physiologiques similaires entre les individus TSA et neurotypiques, suggérant une intégration cérébrale de la douleur et de sa contagion émotionnelle intactes dans les cadres du TSA^{220,259,260}. Au contraire, certains résultats révèlent une activation cérébrale atypique ainsi que des réponses physiologiques et comportementales modifiées^{260,261}.

Ces résultats sont à modérer car il est possible que les difficultés à reconnaître ou à reporter ses propres émotions où celles des autres (alexithymie), présentes dans les TSA, soient responsables de ces modifications d'empathie à la douleur²⁶².

2.5.6. Mécanismes attentionnels et anticipation de la douleur

La comparaison du motif d'activité cérébrale avant un stimulus douloureux entre TSA et contrôles démontre une activation plus importante du CCA chez les TSA alors que les réponses au stimulus douloureux n'étaient pas différentes²²⁶. Cette augmentation de la phase anticipatoire était accompagnée d'une sensibilité comportementale à la douleur anticipée augmentée. Il est intéressant de remarquer que dans l'étude de *Gu et collaborateurs*, les individus pouvaient, lors d'une session expérimentale précédant l'imagerie, choisir l'intensité de la stimulation pour constituer une douleur à 3 sur une échelle de 1 à 5. Les individus TSA choisissaient systématiquement un niveau de douleur plus faible que les contrôles.

Ces résultats suggèrent que la perception attendue de la douleur pourrait être augmentée du fait d'un engagement attentionnel plus important.

2.5.7. Les déséquilibres neurochimiques

2.5.7.1. Le système opioïdérique

Un certain nombre de symptômes de TSA chez l'humain ou dans les modèles animaux ressemblent à ceux observés lors de l'administration d'opiacés : sociabilité réduite, comportements répétitifs, hyperactivité et diminution de la sensibilité à la douleur ce qui a mené à une hypothèse opioïdérique des TSA²⁰⁴. Etant donné l'implication des opioïdes dans le fonctionnement du système nociceptif et le fait que les opiacés constituent des molécules de référence dans le traitement de la douleur, il semble intéressant d'évaluer cet aspect. Par exemple, la concentration de certains opioïdes dans le sang ou liquide cérébro-spinal a été observé comme altérée chez certains individus TSA et certains antagoniste opioïdériques démontre des potentiel thérapeutique intéressant bien que ces études se heurtent à un gros problème de répliation²⁶³⁻²⁶⁸. De plus, la concentration sanguine en opioïdes est augmentée chez les sujets TSA après une situation douloureuse et corrèle avec la sévérité de l'autisme²⁰². Il a longtemps été suggéré que la douleur chronique dans le cadre des TSA pouvait entraîner des comportements automutilateurs avec l'objectif de stimuler la sécrétion d'opioïdes et avoir un effet calmant²⁰¹.

2.5.7.2. Le GABA

L'hypothèse GABA dans les troubles du spectre autistique suggère des dysfonctions précoces du système GABAergique qui pourrait entraîner des modifications de la balance excitation/inhibition, potentiellement responsable des symptômes TSA²⁶⁹⁻²⁷¹. Un certain nombre d'études rapportent des concentrations en GABA réduites chez des sujets TSA et qui sont parfois corrélées avec des hyperréactivités sensorielles²⁷²⁻²⁷⁵. Ces altérations pourraient se produire dans des structures impliquées dans l'encodage nociceptif et douloureux et perturber les processus neuronaux comme suggéré dans l'insula²⁷⁶.

2.5.7.3. Le système des endocannabinoïdes

Ce système participe notamment au développement cérébral, à la plasticité synaptique, à l'encodage sensoriel et module les interactions sociales, l'anxiété ou le stress^{277,278}. Sa dérégulation a été proposée comme hypothèse physiopathologique des TSA²⁷⁹⁻²⁸¹. En effet, une diminution de la concentration en endocannabinoïdes est observée chez les individus autistes²⁸². Etant donné le rôle de ce système dans les processus nociceptifs, il est possible que sa dérégulation puisse modifier la sensibilité et la réponse à la douleur dans le cadre des TSA²⁸³.

CONCLUSION SUR LA NOCICEPTION ET LA DOULEUR DANS LES TSA

Avoir accès aux soins lors d'une situation douloureuse peut se révéler très complexe pour les individus autistes du fait des altérations d'interaction sociale, de communication et de la présence de déficits intellectuels. Cependant, les études comportementales chez l'homme suggèrent qu'il n'est pas encore possible de répondre à une question globale de différence de sensibilité nociceptive en termes d'hyper-, de normo- ou d'hyposensibilité des sujets TSA par rapport à la population neurotypique. C'est pourquoi les critères diagnostiques des TSA ont évolué sur cette question passant d'une « indifférence à la douleur » (DSM-III), à un « seuil de douleur élevé » (DSM IV) puis à une « apparente indifférence à la douleur » aujourd'hui (DSM-V). Cependant, il est aussi possible que la manière de faire face à une situation douloureuse soit différente pour les individus atteints de TSA et qu'elles soient interprétées à tort comme une sensibilité modifiée par un observateur extérieur.

Les observations concernant l'intégration cérébrale sont limitées mais suggèrent un motif d'activation atypique durant une situation douloureuse avec notamment une diminution de l'activation de la « matrice de la douleur » durant la phase tardive mettant en jeu des processus plus cognitifs et affectifs de modulation alors que la phase initiale de détection et de l'encodage nociceptif semble intacte.

Il ne faut cependant pas exclure des altérations qui seraient propres au système nociceptif, son organisation et son fonctionnement qui sont difficilement étudiables chez l'humain et pourraient sous-tendre voire provoquer des modifications plus intégrées par des mécanismes de compensation ou d'adaptation. Ainsi pour explorer ces aspects, s'affranchir de certains biais dans l'évaluation de la douleur, réaliser des mesures standardisées et caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués il apparaît intéressant d'avoir recours à des modèles animaux.

3. L'apport des modèles animaux

3.2. Les modèles d'études des TSA chez l'animal

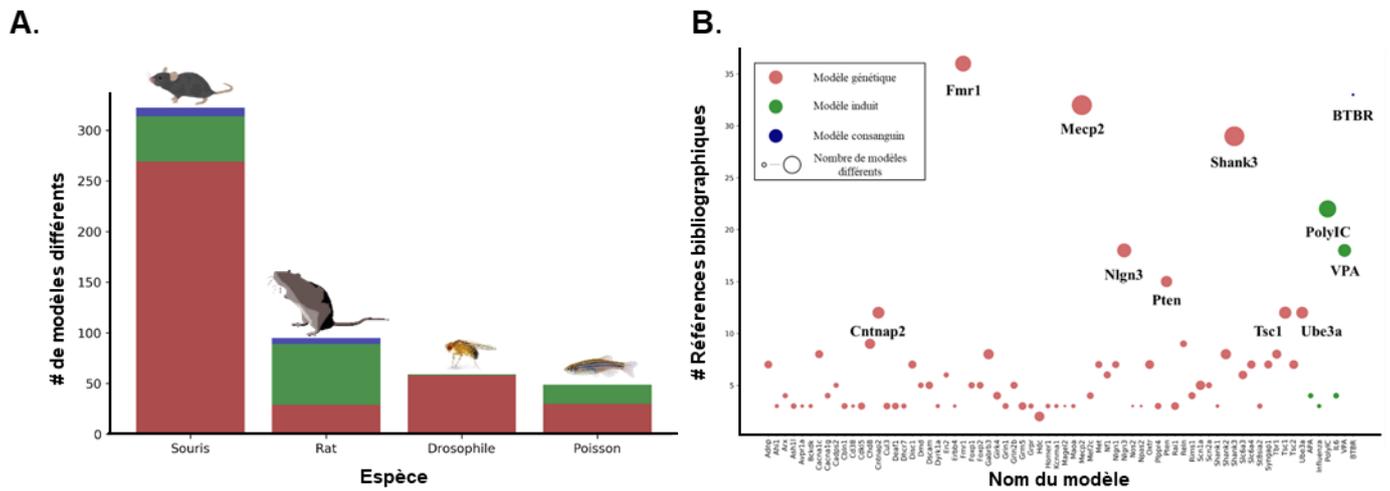
► Pour une revue détaillée²⁸⁴.

Dans le but d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les TSA humain, de nombreuses études utilisent des modèles animaux²⁸⁴. D'une manière générale, la plupart des modèles est réalisée chez le rongeur (rat, souris) bien que quelques modèles existent chez la drosophile ou le poisson-zèbre, des oiseaux, et même des primates non humains (**Figure 5A**)^{3,284}. A noter qu'en neurosciences, un modèle animal doit réunir un certain nombre de critères pour être valide. Premièrement, avoir une étiologie proche de la pathologie humaine ou validité de construction. Deuxièmement, avoir une symptomatologie proche de la pathologie humaine ou isomorphie des symptômes. Finalement, répondre de la même manière aux traitements efficaces chez l'humain ou validité prédictive²⁸⁵. Cependant, dans le cadre des TSA, l'étiologie étant mal connue et en l'absence de traitement efficace, ces modèles animaux sont validés uniquement par **l'isomorphie des symptômes**. Ainsi, l'observation de **déficits** dans les comportements **sociaux**, la présence de **comportements stéréotypés**, **d'altérations sensorielle** ou de **comorbidités** des TSA (épilepsie, troubles du sommeil) est la manière la plus répandue de valider ces modèles expérimentaux²⁸⁶⁻²⁸⁸.

Les modèles peuvent être séparés en plusieurs catégories en fonction de leur étiologie (**Figure 5B**). On distingue ainsi les modèles génétiques, les modèles « consanguins » et les modèles induits.

Chez la souris, les plus utilisés sont les **modèles génétiques** qui sont basés sur des approches par *knock-out*, dans lesquelles le gène d'intérêt est inactivé, ou par *knock-in* dans lesquelles une mutation particulière est introduite au sein d'un locus d'intérêt (**Figure 5C**). Parmi les modèles génétiques fréquemment utilisés, on retrouve d'une part des modèles génétiques dit **non-syndromiques**, dans lesquels divers gènes associés avec les TSA humains (Shank3, Shank2, PTEN, Chd8) ou des modèles génétiques dits **syndromiques** pour lesquels des gènes dont les mutations sont responsables d'autres troubles neurodéveloppementaux (Mecp2, Fmr1, Tsc1, Tsc2, Syngap1, Ube3a) ont été mutés ou invalidés^{284,286}. Cependant, il est important de comprendre que « bien que la manipulation d'un seul gène puisse mener à des phénotypes intéressants, sur le comportement social, chez des espèces éloignées d'un point de vue évolutif, elle n'apporte pas nécessairement de contribution à la pathologie humaine »³.

C'est pourquoi certains modèles avec des étiologies multifactorielles peuvent apporter des informations intéressantes. Par exemple, certaines **souches murines consanguines** comme les souris **BTBR** sont utilisées²⁸⁹ (**Figure 5D**). Ce modèle repose sur l'utilisation d'une souche de souris particulière (BTBR T+Itpr3tf/J) qui était originalement élevée pour des études de la résistance à l'insuline ou de certaines néphropathies et a été décrite comme présentant des comportements pouvant être mis en relation avec les TSA^{289,290}.



C.

Modèles génétiques	Gène	Protéine	Fonction(s)
Non - Syndromiques	Cntnap2	Contactin-associated protein-like 2	Neurexine (adhésion cellulaire pré-synaptique en formant des complexes trans-synaptiques avec les neuroligines)
	Nlgn3 et Nlgn4	Neuroigin 3 and 4	Neuroigine (adhésion cellulaire post-synaptique en formant des complexes trans-synaptiques avec les neurexines)
	Shank2 et 3	SH3 and multiple ankyrin repeat domain proreïn 2 and 3	Protéines d'assemblage aux densités post-synaptiques glutamatergiques
	Pten	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase	Croissance cellulaire
	Gabrb3	GABA-A receptor subunit beta-3	Signalisation GABAergique
Syndromiques	Fmr1	Fragile X mental retardation protein	Régulation transcriptionnelle au sein des neurones
	Tsc1 et 2	Tuberous sclerosis protein 1 and 2	Inhibition de la voie signalisation mTOR
	Mecp2	Methyl-CpG-binding protein 2	Méthylation de l'ADN et remodelage de la chromatine
	Syngap1	Synaptic Ras GTPase activating protein 1a	Signalisation intracellulaire des récepteurs glutamatergiques
	Ube3a	Ubiquitin-protein ligase E3A	Dégradation protéique au seins de protéasomes

D.

Modèle consanguin	Altérations supposées
BTBR (BTBR T+Itpr3tf/J)	Modifications génétiques multiples touchants des gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus développementaux (cycle cellulaire, guidance axonale, neurogenèse, adhésion cellulaire, cytosquelette d'actine), des protéines synaptiques et des protéines immunitaires.

E.

Modèles induits	Molécule utilisée	Effet supposé
Inflammation materno-foetale	Acide polyinosinique:polycytidylique (Poly:IC)	Activation du système immunitaire maternel
	Lipopolysaccharide (LPS)	Activation du système immunitaire maternel
VPA	Valproate de sodium	Altérations épigénétiques par inhibition des histone désacétylases (HDAC)

Figure 5. Les modèles d'étude des TSA chez l'animal.

A. La plupart des modèles sont réalisés chez le rongeur (rat, souris) bien que quelques modèles existent chez la drosophile ou le poisson-zèbre. B. Les modèles murins principaux chez la souris sont les modèles génétiques basés sur des mutations des gènes Mecp2 et Fmr1, Shank3 et Nlgn3, le modèle idiopathique consanguin BTBR ainsi que les modèles induits VPA et PolyIC. C. Les modèles génétiques (en brun) peuvent être séparés en modèle non-syndromiques et syndromiques. Les modèles génétiques non-syndromiques sont basés sur la reproduction des mutations fréquemment associés avec les TSA chez l'humain dans des gènes comme Cntnap2, Nlgn3, Nlgn4, Shank2, Shank3, Pten ou Gabrb3 par exemple. Les modèles syndromiques reproduisent d'autres troubles neurodéveloppementaux dont une partie de la symptomatologie est représentée par un syndrome autistique. Parmi les plus utilisés, Fmr1 (syndrome de l'X fragile), Mecp2 (syndrome de Rett), Tsc1 et Tsc2 (sclérose tubéreuse), Ube3a (syndrome de Prader-Willi et le syndrome d'Angelman) et syngap1 (déficiences intellectuelles). D. Le modèle consanguin BTBR repose sur l'utilisation d'une souche de souris particulière dont les comportements peuvent être mis en relation de certains symptômes TSA de manière idiopathique. E. Les modèles induits reposent principalement sur l'exposition prénatale à des agents pro-inflammatoires (Poly : IC, LPS) ou tératogènes (VPA). Ces modèles ont été validés en vérifiant l'isomorphie des comportements des animaux avec certains symptômes TSA. Par exemple, l'observation de déficits dans les comportements sociaux, la présence de comportements stéréotypés, d'altérations sensorielle ou de comorbidités des TSA (épilepsie, troubles du sommeil) sont des manières répandues de valider ces modèles. Figure réalisée d'après ^{284,286,290,291}.

Finalement, les **modèles induits** reposent sur l'utilisation de conditions inductrices de différents types (**Figure 5E**). On retrouve l'inoculation d'agents biologiques (virus, bactéries, protéines recombinantes...) ou de substances chimiques bioactives soit chez l'animal utilisé comme modèle directement soit chez la mère lors de la gestation. On peut notamment citer ceux obtenus par exposition in utero à des **agents inflammatoires** comme les lipopolysaccharides (LPS) ou l'acide polyinosinique: polycytidylique (Poly I:C)²⁹², ainsi qu'à des **agents tératogènes** tels que le valproate de sodium (VPA)^{285,293}.

3.3. Focus sur le modèle valproate

Le modèle valproate qui a été utilisé dans cette étude est un modèle construit sur l'exposition prénatale à du valproate.

L'acide valproïque ou **valproate (VPA)** est synthétisé pour la première fois par le chimiste Beverly Burton et est considéré pendant presque un siècle comme pharmacologiquement inerte, jusqu'à ce que ses propriétés anticonvulsives soient découvertes un siècle plus tard²⁹⁴. Il est aujourd'hui utilisé pour le traitement de l'épilepsie principalement mais conduit à certaines indications pour le traitement des migraines ou des troubles de l'humeur^{293,295}.

Il est intéressant de préciser que l'exposition prénatale au VPA **augmente le risque de TSA par quatre**²⁹⁶. Cet effet serait lié à l'action tératogène du VPA, notamment mais pas seulement, lors de la période de fermeture du tube neural du fœtus.

À la suite de ces observations chez l'humain, des études évaluent l'effet de l'injection de VPA chez des rongeurs et démontrent l'induction de comportements pouvant être mis en relation avec les TSA²⁹⁷. Parmi les **symptômes principaux** de TSA, des déficits d'interactions sociales directes et indirectes, de communications (anomalies de vocalisations), une inflexibilité cognitive (réponse à la nouveauté) et des mouvements stéréotypés (toilettages, ébrouements, enfouissements, etc.) ont notamment été décrits^{293,297,298}. De plus, certains **symptômes auxiliaires** comme un retard développemental, des déficits moteurs, des altérations sensorielles, des perturbations du sommeil, et une dérégulation du système neuro-immunitaire sont également décrits^{293,297,298}.

Cependant, les mécanismes par lequel le VPA induit ce phénotype est encore peu connu. En effet, en dépit de sa structure moléculaire plutôt simple il possède une pharmacologie complexe et est loin d'avoir une cible spécifique. Plusieurs actions sont décrites, notamment la potentialisation de la transmission GABAergique via une augmentation de sa synthèse et une diminution de sa dégradation d'où son utilisation pour le traitement de l'épilepsie, mais aussi une inhibition de la transmission excitatrice NMDA-médiée, le blocage de canaux sodiques dépendants du voltage ou de canaux calciques, une modulation de la transmission sérotoninergique et dopaminergique ainsi qu'une **inhibition des histones désacétylases (HDAC)** impliquée dans les phénomènes épigénétiques²⁹⁹. Cette dernière cible est supposée comme étant responsable de l'effet tératogène du VPA, entraînant des comportements « autistiques » chez les animaux³⁰⁰.

Ces modèles animaux de TSA, et notamment le modèle VPA, peuvent être utilisés dans certaines études pour étudier la sensibilité somatosensorielle nociceptive au niveau comportemental mais aussi pour explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement altérés

3.4. Nociception et douleur chez des modèles animaux de TSA

Du point de vue des particularités somatosensorielles, des anomalies de la sensibilité tactile ont déjà été mises en évidence dans certains de ces modèles animaux et indiquent des altérations périphériques et centrales³⁰¹.

Ces modèles présentent également un intérêt pour l'étude des anomalies nociceptives dans le cadre de l'autisme.

3.4.1. Observations comportementales

De manière générale, il semble que les résultats dépendent de la modalité testée (chaud, froid, mécanique, viscérale) (**Table 5**). Un consensus semble apparaître concernant la sensibilité **nociceptive au chaud** pour laquelle la majorité des études conclue à une **hyposensibilité**³⁰²⁻³¹². Pour la sensibilité nociceptive thermique au froid, mécanique et viscérale les résultats des études sont plus variables et dépendent du modèle expérimental utilisé. Notons l'intérêt de l'utilisation de modèles de douleurs pathologiques qui indiquent une **réduction du développement d'hyperalgésies et d'allodynies** lors de la réalisation de modèles de **douleurs aiguës et chroniques**, qu'elles soient d'origine inflammatoire ou neuropathique (lésion du système nerveux somatosensoriel)^{304,309,313}.

Cependant, réduire les différences à un aspect quantitatif masquerait la possibilité que des mécanismes différents entrent en jeu pour amener à un fonctionnement des réseaux neuronaux dont les sorties comportementales pourraient être les mêmes dans certaines situations mais pourraient différer dans d'autres.

Modèle	Espèce	Sexe	Non-Nociceptif		Nociceptif		Autres modalités nociceptives/douloureuses	Références
			Mécanique		Thermique chaud	Thermique froid		
<i>Cntnap2</i>	Souris	♂♀	●		●●		Augmentation de la réponse douleur aiguë induit par la capsaïcine ou la formaline	314,315
<i>Syngap1</i>	Souris	♂			●			311
<i>Shank2</i>	Souris	♂	●		●		Diminution Allodynie mécanique induite par des modèles de douleurs inflammatoire et neuropathique	309
	Souris	♀					Diminution Douleur spontanée induite par l'injection intrathécale de NMDA.	310
<i>Shank3</i>	Rat	♂	●		●			302
	Souris	♂	●		●	●	Diminution de la réponse à une douleur aiguë induite par la capsaïcine et de l'hyperalgésie thermique induite par des modèles de douleurs inflammatoires et neuropathiques.	313
	Souris	♂♀	●					314
<i>Mecp2</i>	Rat	♂	●		●	●		312
	Rat	♀	●		●	●	Diminution de la réponse à une douleur viscérale	316
<i>Mecp2**</i>	Souris	?	●		●		Diminution allodynie mécanique induite par un modèle de douleur neuropathique	317
<i>Fmr1</i>	Souris	♂			●	●	Augmentation de la réponse à une douleur viscérale	306
	Souris	♂	●		●		Diminution de la douleur inflammatoire aiguë à la formaline, de l'allodynie mécanique liée aux douleurs chroniques neuropathiques ainsi que des comportements nociceptifs spontanés et de l'hyperalgésie thermique induite par une injection d'un agoniste mGluR1/5.	318
	Souris	♂	●		●	●	Sensibilité viscérale préservée Diminution de la réponse douleur aiguë induit par la capsaïcine ou la formaline et de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgie thermique au chaud lors de douleur inflammatoire	304
	Souris	♂♀	●					314
<i>Gabrb3</i>	Souris	♂	●		●			319
	Souris	♀	●		●			319
	Souris	♂♀	●					314
BTBR	Souris	♂♀			●	●	Augmentation de la réponse à une douleur viscérale	306
	Souris	♂	●		●	●	Augmentation de la réponse à une douleur viscérale Diminution réponse douleur aiguë induit par la capsaïcine ou la formaline ainsi que de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgie thermique au chaud induites par un modèle de douleur inflammatoire	304
VPA	Rat	♂	●*		●			297,307,308
	Souris	♂	●		●			303,305,320
<i>PolyIC</i>	Souris	♂♀	●					314

Observations en faveur d'une sensibilité préservée (●), d'une hypo-sensibilité (●) et d'une hyper-sensibilité (●).

Table 5. Sensibilité nociceptive d'animaux modèles de TSA.

La sensibilité nociceptive thermique est testée par l'observation de comportements nociceptifs (retrait de la patte ou de la queue, léchage, secousse) lors d'exposition à une température fixe (52°C ou 0°C) ou croissante (30-52°C) pour le chaud et décroissante (25-0°C) pour le froid. Le seuil de sensibilité mécanique est mesuré en appliquant au niveau de la patte arrière de l'animal une force croissante à l'aide de filaments en nylon de diamètre calibrés (filaments de von Frey) ou à l'aide de pinces calibrées en observant un éventuel retrait du membre. La sensibilité viscérale peut être évaluée en observant les comportements consécutifs à une injection intrapéritonéale d'acide acétique (grattages abdominaux, étirement des pattes postérieures, torsions de la musculature dorso-abdominale) ou par distension colorectale à l'aide d'un ballon et enregistrement électromyographique de la réponse viscéro-motrice. Le modèle de douleur aiguë évoquée par la capsaïcine consiste en l'injection intraplantaire d'un agoniste des récepteurs TRPV1, et à l'observation des comportements nociceptifs spontanés. Le modèle de douleur inflammatoire aiguë à la formaline repose sur un principe similaire avec l'injection d'un agent chimique pro-inflammatoire qu'est la formaline. La réponse présente deux phases, la première mettant en jeu une activation directe des fibres périphériques et la deuxième phase plus tardive mettant en jeu des phénomènes de sensibilisation centrale au niveau de la moelle épinière. Le modèle de douleur chronique de type inflammatoire repose sur l'injection intraplantaire d'un agent pro-inflammatoire comme l'adjuvant complet de Freund alors que le type neuropathique nécessite une chirurgie préalable pour procéder à une ligature, une compression ou une section de certaines racines nerveuses du nerf sciatique. * Observé chez animaux juvéniles seulement. ** Modèle réalisé par duplication du gène *mecp2*

3.4.2. Hypothèses et mécanismes

L'utilisation de ces modèles a permis de mettre en lumière certains des phénomènes cellulaires et moléculaires mis en jeu.

3.4.2.1. Mécanismes non localisés

Des mécanismes généraux pouvant impacter le système nociceptif dans son ensemble comme l'implication du **système nicotinique** ou une hyper-activation des **récepteurs NMDA** du glutamate sont décrits^{306,308}.

Mais des phénomènes plus localisés au sein de structures impliquées dans l'intégration nociceptive ont aussi été observés.

3.4.2.2. Mécanismes périphériques

Au niveau périphérique, des différences dans les **seuils d'excitabilité des fibres C** ont été rapportées chez les animaux BTBR et *fmr1*^{-/-}³⁰⁶. En outre, la mutation de la protéine *shank3* dans les neurones pourrait modifier l'expression membranaire des **canaux TRPV1** dans les neurones sensoriels et ainsi diminuer la sensibilité thermique au chaud³¹³. Concernant l'hypersensibilité mécanique, elle pourrait être liée à une augmentation de l'innervation au niveau de la peau³¹² ou à une diminution d'expression des **canaux potassiques** de la famille HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) qui augmenterait l'excitabilité des fibres mécano-sensibles³¹⁴.

3.4.2.3. Mécanismes centraux

Certaines études suggèrent également des altérations au sein du système nerveux central. Par exemple, après l'injection périphérique de formaline (agent inflammatoire) dont la réponse est constituée de plusieurs phases dont une tardive impliquant des **phénomènes de sensibilisation centrale**. Seulement cette phase est **diminuée** chez les animaux *fmr1*^{-/-}, *cntnap2*^{-/-} et BTBR^{304,315,318}.

Au niveau spinal, la sensibilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière à un agoniste des **récepteurs NMDA** du glutamate semble être **diminuée**, réduisant les comportements de douleur chez les souris *shank2*^{-/-}³¹⁰. Par ailleurs, une **diminution** d'expression des **récepteurs du GABA** est observée dans la corne dorsale de souris *mecp2*^{-/-}³¹⁴. Ces modifications pourraient perturber ainsi la **balance excitation/inhibition** au niveau du réseau nociceptif spinal, entraînant des modifications majeures dans l'intégration des stimuli périphériques.

Au niveau cérébral, des études décrivent également des atypies de **transmission et de plasticité synaptiques** mettant potentiellement en jeu des changements morphologiques et fonctionnels et des déséquilibres de la balance excitation/inhibition au niveau du **cortex somato-sensoriel** ou de **l'amygdale**^{307,321,322}. Ces changements pourraient modifier les processus d'intégration et d'encodage des stimuli nociceptifs et perturber l'élaboration de la sensation de douleur.

CONCLUSION SUR LA NOCICEPTION DANS DES MODELES ANIMAUX D'ETUDE DES TSA

Les modèles animaux d'études des TSA sont validés par l'observation d'isomorphies comportementales avec les symptômes de pathologie humaine comme des déficits de sociabilité ou des comportements restreints et répétitifs. Ils consistent en des mutations ciblées qui chez l'humain augmentent le risque de TSA, des souches consanguines présentant naturellement des comportements *TSA-like* ou l'exposition prénatale à certains agents inflammatoire ou tératogènes comme le valproate. L'utilisation de ces modèles pour explorer la problématique de la sensibilité nociceptive et douloureuse dans le cadre des TSA semble intéressante. En effet, un certain nombre d'animaux démontrent des altérations comportementales lors de situations nociceptives comme une hyposensibilité au chaud mais aussi lors de la réalisation de modèles de douleur avec une réduction du développement d'hyperalgésie ou d'allodynies. Certaines observations chez ces animaux démontrent des modifications de certains acteurs cellulaires et moléculaires du système nociceptif comme des canaux TRPV1 des neurones sensoriels ou des récepteurs NMDA de la corne dorsale de la moelle épinière. Des effets généraux suggèrent des cibles thérapeutiques intéressantes comme ciblant le système nicotinique par exemple.

CONCLUSION DOULEUR ET AUTISME

Ainsi pour envisager une recherche sur le processus de la douleur dans le cadre des TSA, il est nécessaire de comprendre que bien que ces individus ne soient pas forcément en capacité d'intégrer l'expérience de la douleur dans sa totalité, c'est-à-dire d'évaluer sa nature, sa source ou son intensité, d'en prédire les conséquences ou d'exercer des contrôles cognitifs, leurs comportements démontrent des réponses sensorielles affectives et cognitives spécifiques de leur condition. Le traitement de l'information nociceptive et la sensation de douleur qui peut en découler présentent des particularités chez les sujets autistes. Sachant qu'ils sont plus souvent confrontés à des situations douloureuses que la population générale, ces particularités sont pleinement à prendre en compte pour améliorer leur qualité de vie. La diversité des observations et de leurs conclusions est vraisemblablement liée à la sévérité de l'autisme, aux capacités intellectuelles et au profil sensoriel très variable de chaque individu.

Ainsi, des tests standardisés et plus adaptés aux particularités cognitives et sensorielles des patients TSA et à l'hétérogénéité de cette pathologie pourraient permettre d'éclaircir la nature de ces altérations. Bien qu'il soit actuellement difficile d'établir des corrélations entre l'Humain et les modèles animaux, ces derniers apparaissent pertinents. En effet, ils permettraient de préciser les modalités nociceptives altérées, de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués et de tester des molécules susceptibles de corriger ces altérations sensorielles.

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Il ne fait aucun doute que les spécificités sensorielles des individus atteints de TSA peuvent aussi concerner la modalité nociceptive et la sensation de douleur qui y est liée.

Les individus autistes sont plus enclins à expérimenter des situations sources de nociception et potentiellement douleur du fait de certaines comorbidités. Cependant, du fait de certains symptômes inhérents aux TSA (troubles de la communication, de l'interaction sociale, déficiences intellectuelles...), ces douleurs sont fréquemment mal diagnostiquées et mal traitées.

L'objectif de cette étude est d'essayer de comprendre les altérations somatosensorielles dans le cadre des TSA et plus précisément celles concernant le système nociceptif et la sensation de douleur qui y est liée.

Pour répondre à cette problématique, nous avons décidé d'utiliser un modèle animal de TSA afin de pouvoir réaliser des mesures standardisées dans environnement contrôlé de la sensibilité nociceptive et de la douleur souvent associée ainsi que pour pouvoir étudier les mécanismes moléculaire et cellulaires qui pourraient sous-tendre certaines altérations. Le modèle que nous avons choisi est basé sur l'exposition prénatale au VPA d'une souche de souris génétiquement variable, la souris CD1. Ceci dans le but de nous rapprocher de la situation clinique où les TSA chez l'humain n'ont que rarement de cause monogénique et s'expriment de manière variable sur un spectre chez des individus génétiquement différents. Nous avons aussi souhaité ajouter à cette étude la question des différences sexuelles inhérentes à la plupart des questions biologiques et notamment à l'étude des TSA et de la nociception/douleur pour lesquelles un certain nombre de différences sont déjà décrites.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons généré ces animaux modèles, évalué l'isomorphie des symptômes avec les TSA et réalisé des tests comportements évaluant la sensibilité somatosensorielle et plus particulièrement la modalité nociceptive.

Dans un second temps, nous avons exploré au niveau cellulaire le fonctionnement de certains des acteurs du système nociceptif que sont les neurones sensoriels des ganglions rachidiens ainsi que les neurones du réseau de la CDME.

METHODES

Les expériences ont été autorisées par le comité local d'éthique de l'Université de Strasbourg et le ministère français de l'enseignement supérieur de la recherche et de l'innovation (autorisation n° 23670-2020010611519791) en accord avec la réglementation européenne pour les bonnes pratiques en expérimentation animale.

I. ANIMAUX

1. Génération du modèle VPA

Des couples de souris SWISS mâles et femelles pubères sont regroupés sur une nuit pour accouplement. Le matin, la fécondation est constatée par observation d'un bouchon vaginal et le couple séparé (E0). Nous avons commandé les animaux à E6 auprès de l'éleveur (Janviers Lab, Saint-Brevin, France). Douze jours et demi après fécondation (E12,5), les femelles gestantes sont injectées avec une solution de valproate de sodium (i.p. VPA 600mg/kg) ou une solution saline (i.p. NaCl 0.9%). L'injection de VPA entraîne une sédation ainsi qu'une hypothermie transitoire, c'est pourquoi les animaux sont ensuite placés sous une lampe chauffante pendant 4 à 5h. Les femelles gestantes ne sont ensuite pas dérangées jusqu'à la mise-bas. Les souriceaux issus de ces portées sont les animaux sur lesquels cette étude est réalisée. Les animaux mâles et les femelles issus de ces naissances à l'animalerie sont séparés juste avant l'âge de 4 semaines et regroupés par groupes de 2 à 5.

2. Stabulation

Les animaux sont stabulés au sein de l'animalerie du Chronobiotron (UMR3415) dans une pièce à température contrôlée (22-25°C) sous un cycle lumière-obscurité de 12h avec accès à de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. De la frisure et du coton sont ajoutés pour leur permettre la réalisation d'un nid et des bâtons de bois pour leur permettre de ronger.

II. COMPORTEMENT

Les expériences de comportement sont effectuées sur les animaux mâles et femelles lors de la période lumineuse et à un âge précis (**Figure 6**). L'âge des souris lors des tests est indiqué par le terme P_X, où « X » représente l'âge post natal en jours ou par S_X où « X » représente l'âge post natal en semaines.

1. Développement

1.1. Tests sensori-moteurs

Pour le test du retournement (*righting reflex*), les souriceaux sont placés sur le dos et le temps pour se remettre sur les quatre pattes est mesuré à l'aide d'un chronomètre. Pour le test de la géotaxie négative, les souriceaux sont placés sur une pente (45°) tête dirigée vers le bas et le temps nécessaire pour se retourner de 180° (tête dirigée vers le haut de la pente) est mesuré à l'aide d'un chronomètre. Lors de ces tests, la séparation entre les souriceaux et la mère est réduite au minimum (<1min) pour éviter l'établissement d'un stress de séparation maternelle.

1.2. Préférence pour l'odeur maternelle

Le test a été réalisé comme décrit précédemment avec quelques modifications³²³. Deux boîtes remplies de sciure (12 x 8 x 6cm) sont placées sous une grille (30x30cm), séparées d'une zone intermédiaire (2.5cm). Une des boîtes contient de la sciure fraîche et neutre, l'autre contient de la sciure provenant de la cage maternelle non changée depuis la mise-bas. Le souriceau est placé dans la zone intermédiaire et peut explorer l'enceinte durant une minute. Le temps total passé avec la tête au-dessus de la boîte de sciure maternelle à la suite de cinq essais est mesuré à l'aide d'un chronomètre.

1.3. Ouverture des yeux

De P11 à P15, les souriceaux sont observés tous les jours à midi et un index est défini en fonction de l'ouverture des yeux (+ 0.5 œil à demi ouvert, +1 œil complètement ouvert). L'addition pour chaque œil permet d'obtenir l'index d'ouverture des yeux de chaque jour.

1.4. Suivi du poids

Les animaux sont pesés chaque début de semaine pour évaluer leur croissance pondérale.

2. Test symptomatologie TSA-like

2.1. Test de préférence sociale ou test des trois chambres

Le test est réalisé comme originalement décrit³²⁴. Le dispositif consiste en une enceinte (60 x 40 x 22cm) séparées en 3 chambres de tailles égales par des parois opaques contenant une ouverture (8x5cm) pouvant être obstruée à l'aide d'une porte. Le protocole de test comporte une première phase d'habitation (5min) durant laquelle l'animal est placé dans la chambre centrale, portes latérales fermées. Puis, une seconde phase d'exploration (10min) durant laquelle l'animal peut explorer librement les trois chambres. Cette deuxième phase a été filmée et les comportements de toilettage ont été quantifiés à posteriori durant le visionnage des vidéos. Finalement, une troisième phase de sociabilité (10min) durant laquelle un congénère inconnu d'âge proche (+/-1 semaine) et de même sexe est placé dans une cage cylindrique à laquelle il a préalablement été habitué dans l'une des chambres latérales. Une cage contenant un objet neutre en plastique est placée dans une cage identique dans la chambre opposée. Durant toute la procédure, les localisations spatiales de la tête et du corps de l'animal ont été relevées grâce au logiciel ANYMAZE (Stoelting, Irlande). Le temps pendant lequel la tête de l'animal est en contact proche (< 3cm) avec la cage « congénère » ou « objet » lors de la phase de sociabilité est quantifié. L'index de sociabilité est calculé comme décrit précédemment³⁰⁵ :

$$\text{Index de Sociabilité} = \frac{T_{\text{animal}} - T_{\text{objet}}}{T_{\text{animal}} + T_{\text{objet}}}$$

Avec T_{animal} le temps passé en contact proche avec la cage du congénère et T_{objet} avec la cage contenant l'objet.

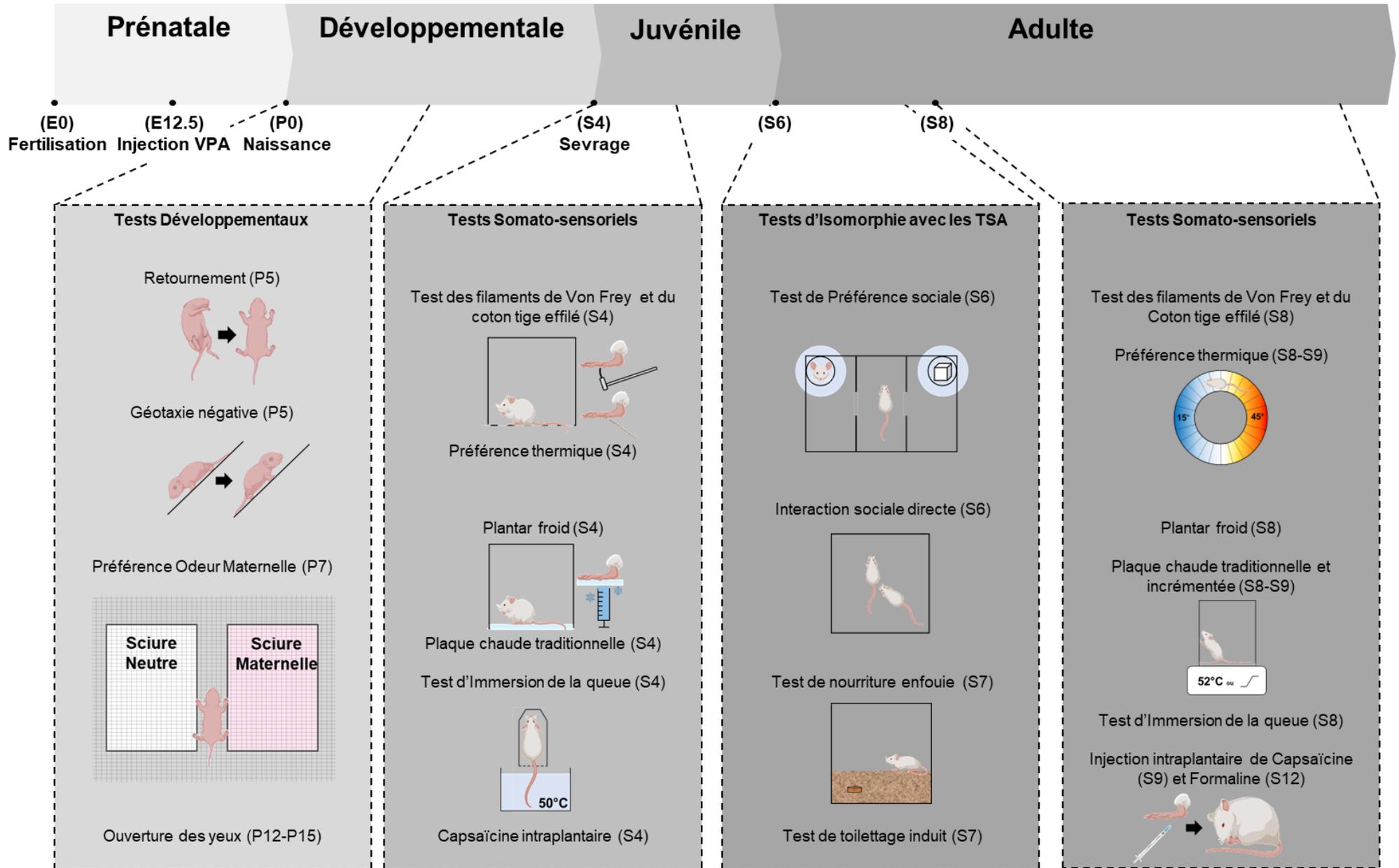


Figure 6. Chronologie de l'étude comportementale.

2.2. Interaction sociale directe

Les animaux sont placés dans une enceinte d'*open field* avec un congénère inconnu d'âge proche (+/-1 semaine) de même sexe qui a préalablement été habitué à l'enceinte. Ils sont filmés pendant 5 minutes. Le nombre de poursuites initiées par l'animal « test » est déterminé à posteriori sur les enregistrements vidéo.

2.3. Test de nourriture enfouie

Ce test évalue l'olfaction et certaines capacités cognitives et a été réalisé comme décrit précédemment avec certaines modifications^{325,326}. Les animaux sont laissés à jeun 12h avant le test. Durant le test, les animaux sont isolés dans une cage (22 x 16 x 14 cm) contenant de la sciure (3cm) et une croquette avec une odeur spécifique (Bacon Rodent BLT's, Bio-Serv) à laquelle les animaux ont été préalablement habitués est enfouie sous 1cm de sciure fraîche. Les latences pour trouver la croquette et pour la manger sont déterminées à l'aide d'un chronomètre.

2.4. Test de toilettage induit par le sucrose

Les animaux sont isolés dans une cage (22 x 16 x 14 cm) contenant de la sciure et sont aspergés avec une solution de sucrose (10%, Saccharose 10 g/100 mL), ce qui provoque généralement un comportement de toilettage³²⁷. Le nombre de toilettages est mesuré et leur durée est quantifiée à l'aide d'un chronomètre durant 5min.

3. Tests somato-sensoriels

3.1. Test des filaments de VonFrey

Ce test évalue la sensibilité mécanique statique. Il repose sur l'application sous la voûte plantaire de l'animal (territoire du nerf tibial) de différents filaments en nylon de tailles calibrées (Bioseb, France), représentant ainsi différentes forces et sur l'observation d'un retrait de la patte par l'animal. Concrètement, les animaux sont habitués à la grille ainsi qu'aux cages en plexiglass (7 x 9 x 7 cm) au moins 20min avant le test. Les filaments sont appliqués successivement en suivant la méthode *up-down* : si l'animal ne répond pas à un filament, celui représentant une force supérieure est ensuite appliqué alors qu'au contraire si l'animal répond, c'est le filament de force inférieure^{328,329}. Cette méthode permet l'approximation arithmétique du seuil mécanique nécessaire pour avoir un retrait de la patte dans 50% des cas et est décrit comme le seuil mécanique (*threshold*) dans cette étude. Le test est réalisé en utilisant le protocole ainsi que le logiciel d'analyse semi-automatique *Up-Down Reader*³³⁰. La moyenne des valeurs obtenues pour les deux pattes postérieures a été calculée pour obtenir le seuil de sensibilité mécanique global de chaque animal.

3.2. Test du coton-tige effilé

Ce test évalue la sensibilité mécanique dynamique et est effectué comme décrit précédemment³³¹, à la suite du test des filaments de VonFrey. Schématiquement, un coton-tige dont la partie cotonneuse a été effilée est délicatement appliqué le long de la voute plantaire, du talon aux griffes. Le nombre de retraits de la patte sur dix applications est observé, moyenné entre les deux pattes et exprimé sous forme de probabilité de retrait (*withdrawal probability*).

3.3. Préférence thermique

Ce test évalue la température non-nociceptive de confort de l'animal et est réalisé comme originalement décrit³³². L'appareil consiste en un couloir circulaire dont la température du sol varie de 15 à 45°C à ses extrémités selon un gradient progressif. Précédemment au jour du test, les animaux sont habitués en groupe à l'enceinte avec sol à température ambiante (22-25°C) pendant 30 minutes. Durant le test, la position de l'animal est relevée en utilisant le logiciel ANYMAZE (Stoelting, Irlande) et le temps passé dans chacune des 12 zones de différentes températures durant une heure est quantifié. La température de préférence (PT) est la moyenne pondérée par le temps passé x_T dans chaque zone d'une température donnée T :

$$PT = \frac{\sum x_T T}{\sum x_T}$$

3.4. Test du Plantar au froid

Ce test évalue la sensibilité au froid et est réalisé comme décrit précédemment³³³ mais en réduisant l'habituatation à 30min. Les animaux sont placés dans des boîtes de tests en plexiglass (7 x 9 x 7 cm) sur une surface en verre borosilicaté de 8mm d'épaisseur. Une seringue modifiée (2,5ml, Terumo) est remplie de carboglace pilée de manière à former un bloc compact pouvant être appliqué sous le verre à l'endroit où se situe la patte de l'animal. La latence de retrait de la patte est déterminée en moyennant les latences mesurées lors de 3 applications successives sur chaque patte postérieure. Il est important de noter que certains animaux ne s'habituent pas aux boîtes de test et au sol en verre même après une durée importante (2h) et des habituations séquentielles les jours précédant le test. Ces animaux ont été exclus du test et des analyses.

3.5. Plaque chaude

Ce test évalue la sensibilité nociceptive au chaud et deux types de protocoles ont été utilisés.

Le premier est un protocole de plaque chaude traditionnel. Les animaux sont placés sur une surface chauffée à 52°C (Bioseb, France) et retirés dès l'observation de la première réponse nociceptive (retrait, léchage ou secouement d'une patte, saut). Un point limite (20s) est défini pour éviter des dommages tissulaires pour l'animal. La moyenne des trois latences de réponse consécutives est calculée.

Le second protocole repose sur une incrémentation progressive de la température. Les animaux sont placés sur une plaque à 30°C et laissés pour habituatisation (1min) à l'enceinte. La température est ensuite augmentée jusqu'à 52°C à une vitesse de 10°C/min et les animaux filmés. La

température correspondant à la première réponse nociceptive (retrait, léchage ou secouement d'une patte, saut) est prise comme une indication de l'atteinte du seuil nociceptif thermique au chaud.

3.6. Test d'immersion de la queue

Les animaux sont habitués durant la semaine précédant le test à la contention dans un tube (50mL, Falcon) modifié pour avoir 3 petites ouvertures à son apex. Le jour du test les animaux sont introduit dans le tube de contention et la queue plongée aux 2/3 dans l'eau stagnante d'un bain marie à 50°C. La latence du retrait de la queue est mesurée à l'aide d'un chronomètre. Trois mesures sont réalisées sur 3 jours consécutifs afin d'éviter l'introduction d'une erreur de mesure de la latence de retrait due à une augmentation de la température de la queue dans le cas de tests rapprochés dans le temps.

3.7. Modèles de douleur aigue

3.7.1. Test de douleur induite par la capsaïcine

Les animaux reçoivent une injection dans la voûte plantaire d'une patte postérieure d'une solution capsaïcine (s.c. 1µg/10µL), un agoniste des canaux TRPV1 impliqués dans la détection du chaud nociceptif. Ils sont ensuite directement placés dans un bécher transparent et filmés pendant 5 minutes. Le temps passé à lécher la patte injectée est quantifié à posteriori sur les enregistrements vidéo et considéré comme un signe indirect de nociception/douleur pour l'animal. Il est important de noter que la solution stock de capsaïcine est conservée dans du diméthylsulfoxyde à 4°C, ainsi une injection de ce solvant dilué dans une solution saline a été réalisée comme contrôle chez ces mêmes animaux, sans observation de réponse.

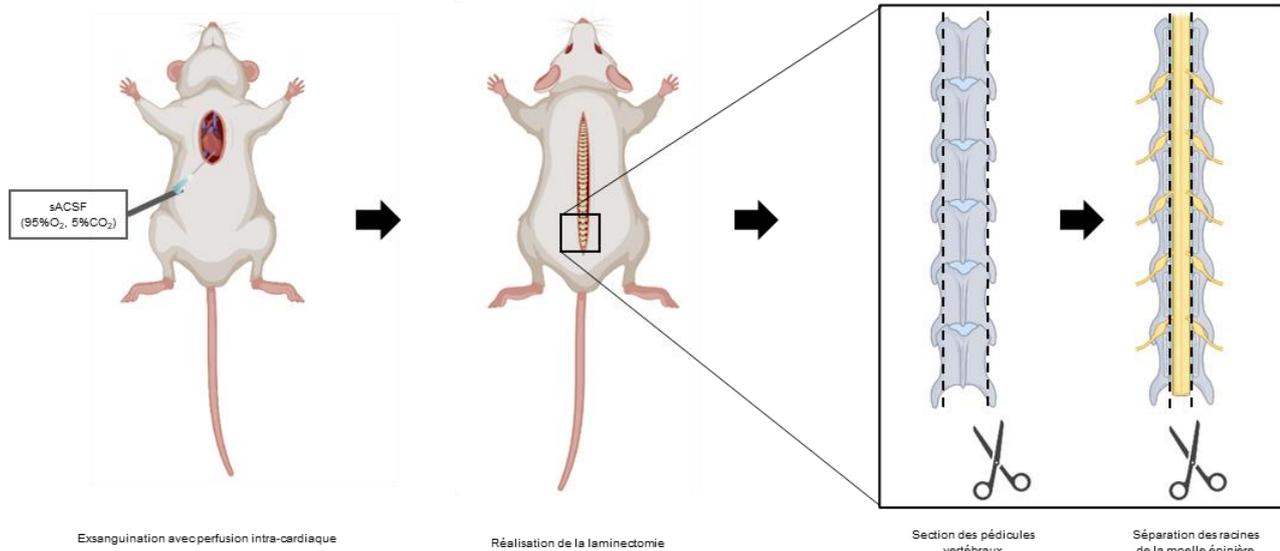
3.7.2. Test de douleur induite par la formaline

Les animaux sont injectés avec une solution de formaline (s.c. 2%) dans la patte (face plantaire) puis mis dans une cage transparente sans sciure et filmés pendant 45 minutes. Le temps passé à se lécher la patte injectée est quantifiée à posteriori et est considéré comme un indice de douleur pour l'animal. Il est important de remarquer que la réponse à une injection de formaline comporte plusieurs phases. Une première phase précoce (*early*, 0-5min) dite nociceptive reflétant l'activation directe des fibres sensorielles périphériques, une seconde phase tardive (*late*, 10-45min) dite centrale qui reflète la mise en place d'un phénomène de sensibilisation centrale³³⁴. Ces 2 phases sont séparées d'une phase dite intermédiaire (*intermediate*, 5-10min) qui peut être modulée par les contrôles internes de la nociception (contrôles inhibiteurs ou facilitateurs)³³⁵.

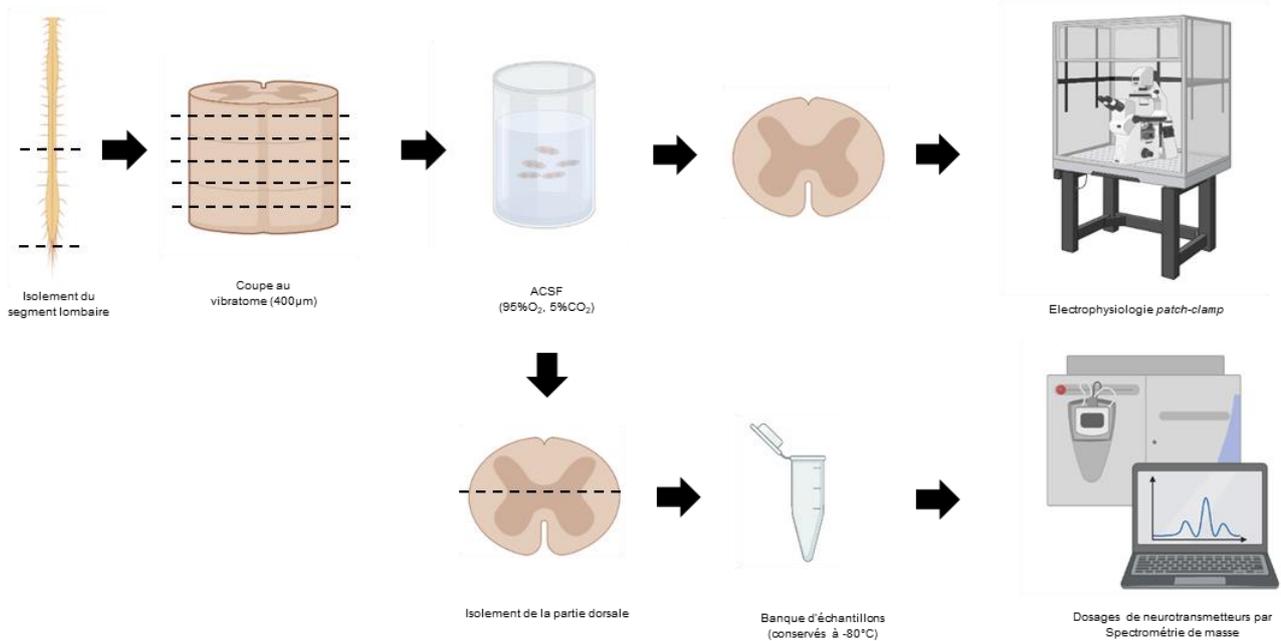
4. Analyse vidéo

Tous les tests comportementaux filmés ont été analysés hors-ligne, à l'aveugle, en utilisant le logiciel BORIS (Université de Turin, Italie).

Dissection et extraction des tissus d'intérêt



Réalisation de tranches de moelle épinière



Culture de cellules de ganglions rachidiens

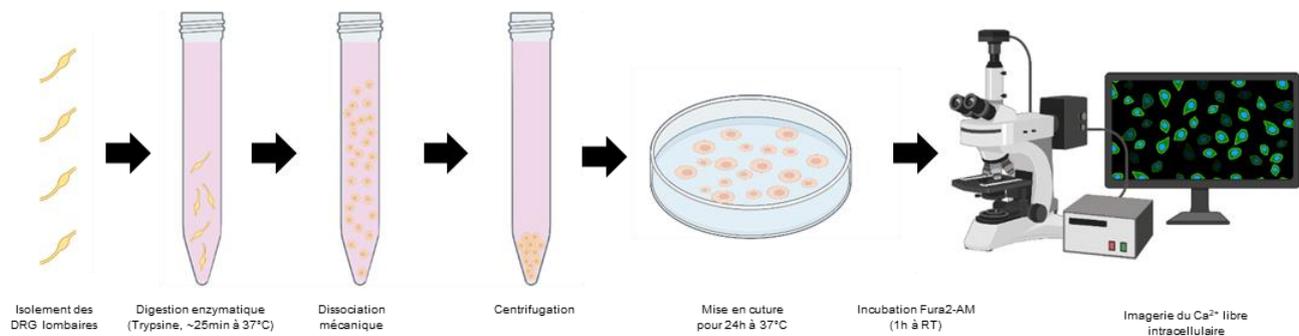


Figure 7. Schéma simplifié des procédures *ex-vivo*

III. *EX-VIVO* PATCH CLAMP

1. Laminectomie et prélèvement de la moelle épinière

Premièrement, la procédure est réalisée avec une solution cérébro-spinale artificielle enrichie en saccharose (sACSF) afin de maintenir l'apport nutritionnel et les équilibres ioniques des tissus tout au long de la procédure. Cette solution est composée de (en mM) : 248 Sacrose ; 26 NaHCO₃ ; 11 Glucose ; 2 KCl ; 2 CaCl₂ ; 1.3 MgSO₄ ; 1.25 KH₂PO₄ et 2.5 d'acide kyurénique. Le sACSF est refroidi (~4°C) et bullé avec du Carbogène (95% O₂, 5% CO₂) permettant ainsi l'oxygénation des tissus le maintien du pH aux environs de 7,3. Il est important de noter que dans le sACSF, le NaCl normalement présent dans le liquide cérébro-spinal est remplacé par du saccharose afin de limiter la genèse de potentiels d'action et ainsi de réduire ainsi la libération synaptique de glutamate. De plus, la solution contient de l'acide kyurénique (2,5mM, Sigma), un antagoniste des récepteurs canaux du glutamate. Ces deux paramètres vont permettre de réduire les phénomènes d'excitotoxicité.

Concrètement, les animaux sont injectés avec de l'uréthane (i .p. 1,9g/kg) qui induit anesthésie stable et profonde, vérifiée par l'absence de réflexes nociceptifs et oculo-palpébraux. Une thoracotomie est réalisée afin d'exposer le cœur encore battant. L'oreillette droite est sectionnée et une perfusion de sACSF dans le ventricule gauche est réalisée avec une aiguille (26-gauge) afin d'exsanguiner l'animal. La perfusion est maintenue tout au long de la procédure. Ensuite, une laminectomie est réalisée. Schématiquement, après que la peau eu été incisée, la colonne vertébrale est sectionnée transversalement au niveau sacré. A l'aide de micro-ciseaux, les pédicules vertébraux sont coupés de chaque côté en remontant jusqu'au niveau cervical afin d'exposer la ME. Tout au long de ce procédé, la moelle est régulièrement aspergée avec du sACSF.

2. Réalisation des tranches de moelle épinière

Après la laminectomie, la ME est prélevée et plongée dans une solution de sACSF. Puis, les méninges sont retirées pour favoriser l'oxygénation du tissu lors de la réalisation des tranches et seul le renflement lombaire est gardé. La ME est incluse dans une gouttière taillée dans un bloc d'agarose polymérisé (5%) afin de la maintenir en place lors de la réalisation de tranches transversales. L'ensemble est collé sur la platine du vibratome (Leica VT1200S), et rapidement placé dans la chambre de coupe remplie de sACSF froid. Des tranches transversales de 400µm sont réalisées avec une vitesse de coupe de 0.1mm/s et une amplitude de vibration de 2.5mm. Les tranches sont ensuite laissées pour récupération (1-2h) à température ambiante dans une cuve remplie de solution cérébro-spinale artificielle (ACSF, composition en mM : NaCl 126 ; 2,5 KCl ; 2 CaCl₂ ; 2 MgCl₂ ; 26 NaHCO₃ ; 1,25 CaH₂PO₄ ; 10 Glucose) bullée avec du Carbogène.

3. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental consiste schématiquement en un microscope droit (Eclipse FN1, Nikon) assisté d'une caméra infrarouge (ccdIR XC-FI50, Sony) avec une chambre d'enregistrement, un préamplificateur (CV201A, Axon Instruments) monté sur un micromanipulateur (SM7 Luigs & Newman) le tout placé sur une table de Gibraltar (Technical Manufacturing Corporation, USA) ainsi qu'un amplificateur (Axopatch 200A, Axon Instruments), une interface de conversion analogique-digital (Digidata 1322A) et un ordinateur (**Figure 8A**).

Une tranche est disposée dans la chambre d'enregistrement montée sur la platine du microscope. Elle est maintenue immobile par une « harpe » de platine. La chambre est en permanence perfusée avec de l'ACSF bullé à l'aide d'une pompe péristaltique (Ismatec, débit ~0.85mL/min). L'ensemble des expériences est réalisé à température ambiante (20-25°C). L'électrode de référence, un fil d'argent chloruré, est placée dans le liquide de la chambre d'enregistrement.

Tous les enregistrements ont été réalisés dans la lamina II, facilement reconnaissable en lumière transmise car elle est la seule zone translucide à cause de la faible proportion de fibres myélinisées. La micropipette est placée au niveau de la lamina II à l'aide de l'objectif faible grossissement (Nikon 4x0,1) alors que la visualisation des neurones est réalisée avec l'objectif gros grossissement à immersion (Nikon 40x0,8).

4. Enregistrements

Nous avons enregistré les courants post synaptiques excitateurs (EPSC) et inhibiteur (IPSC) en utilisant technique *patch clamp* en configuration « cellule entière » (**Figure 8B**).

Les pipettes d'enregistrement sont réalisées à partir de capillaires de verre borosilicaté étirés avec une étireuse horizontale à filament (P1000, Sutter Instruments). Les résistances électriques des pipettes mesurées dans l'ACSF sont de 3-7 M Ω et sont remplies avec le milieu suivant (en mM) : CH₃CSO₃ 90, MgCl₂ 2, NaCl 2, ATP-Mg 2, GTP-Na 0.5, HEPES 10, EGTA 1. Le pH et l'osmolarité ont été ajustés respectivement à 7,3 avec du CsOH et 300 mOsm avec du sucre. Ce milieu fixe le potentiel d'inversion des ions chlorure théorique dans nos conditions à une valeur de -78mV. Ainsi en imposant un potentiel de membrane de -70mV, on observe les EPSCs sous forme de courants entrants, alors qu'avec un potentiel de membrane de 0 mV on observe des IPSCs sous forme de courants sortants. La micropipette est montée sur le porte-électrode du préamplificateur et le contact électrique est assuré par un fil d'argent chloruré. Le déplacement et le positionnement de la pointe de l'électrode sont contrôlés à l'aide du micromanipulateur permettant de diriger précisément l'électrode d'enregistrement. La pipette d'enregistrement placée au-dessus d'une zone cible est descendue dans le bain avec une pression positive appliquée à l'intérieur de la pipette pour éviter son obturation et pour « nettoyer » la zone autour du neurone des débris éventuel (grâce au flux sortant de milieu intra-pipette).

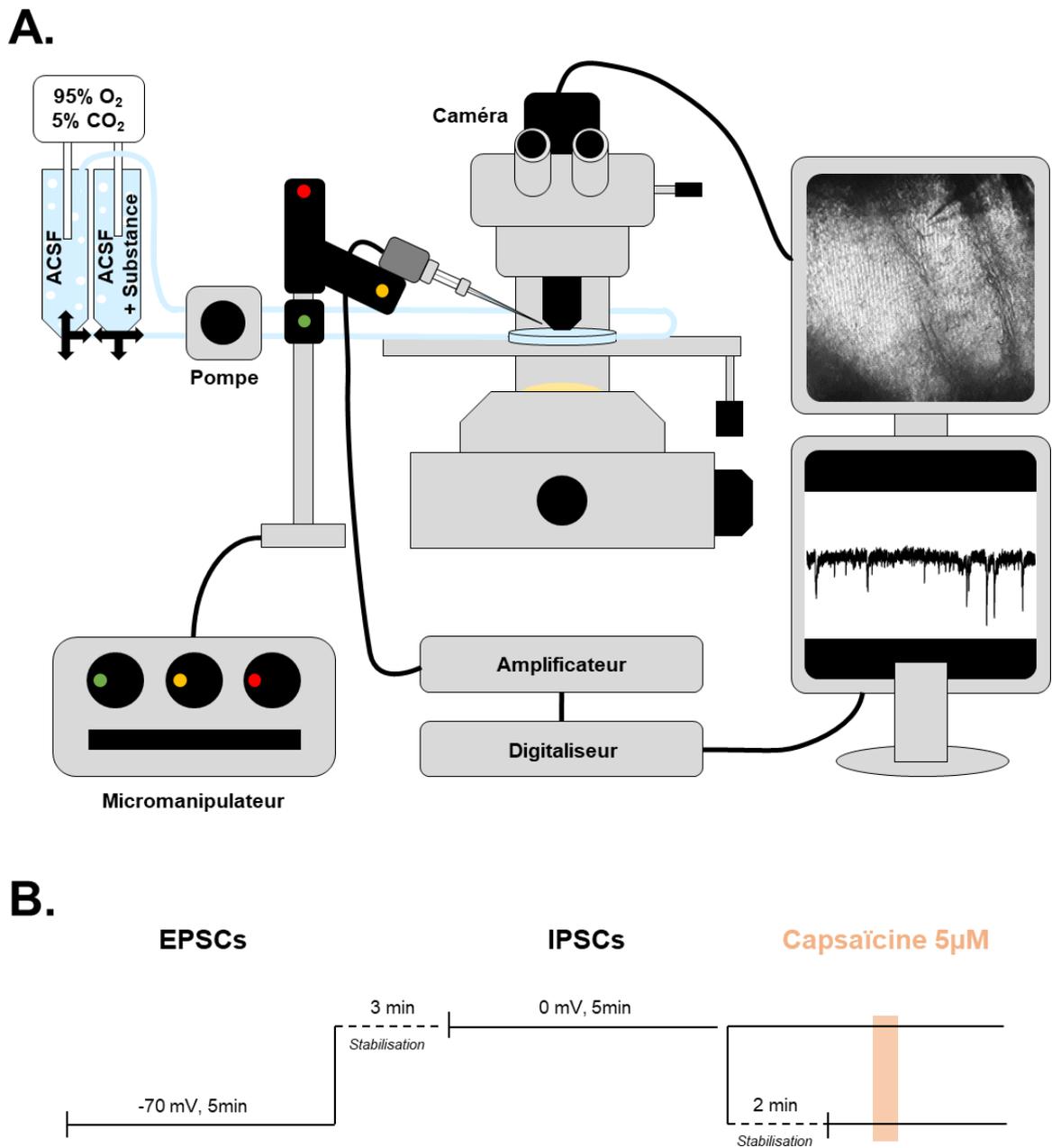


Figure 8. Dispositif expérimental et protocole d'électrophysiologie *patch clamp*.

Dispositif expérimental (A). Les enregistrements sont effectués en configuration cellule entière, mode voltage imposé. Dès l'ouverture de la cellule, le voltage est fixé à -70mV et les EPSCs enregistrés durant 5min. Le potentiel est ensuite fixé à 0mV, puis, après une période de 3min pour laisser le temps à la cellule de se stabiliser après le changement de potentiel, les IPSCs sont enregistrés durant 5min. Finalement, une solution de capsaïcine (5 μ M, 90s) est appliquée soit en restant à 0mV soit en retournant à -70mV, de manière randomisée (B).

L'application d'un créneau de dépolarisation de 5mV appelé « *seal test* » permet de calculer le courant $I = \Delta V/R$ qui en résulte et de mesurer la résistance de la pipette. L'extrémité de la micropipette est approchée de la surface d'un neurone d'intérêt à l'aide du micromanipulateur sous contrôle visuel. La proximité de la membrane entraîne une augmentation de la résistance mesurée, la pression est alors relâchée et l'application d'une légère succion ainsi qu'un potentiel négatif (-70mV) permet d'obtenir une jonction de haute résistance ($>1G\Omega$), le « *giga seal* », et la configuration dite cellule attachée. Les courants capacitifs de la pipette sont alors compensés à l'aide d'un dispositif interne à l'amplificateur. Pour passer en configuration cellule entière, le morceau de membrane dans la pipette est rompu par l'intermédiaire d'une brève succion. Les valeurs de résistance d'accès (R_a) de capacité membranaire (C_m) ainsi que du courant de fuite sont notées. La résistance sériée et la capacité du neurone sont ensuite compensées manuellement à l'aide de l'amplificateur. Les enregistrements réalisés sont filtrés à 5 kHz grâce à un filtre passe-bas intégré à l'amplificateur et digitalisés à 10 kHz (16bits) et stockés sur le disque dur de l'ordinateur. Les cellules dont la R_a était trop élevée ($>40M\Omega$) et avec un courant de fuite trop important ($>100pA$) ont été exclues pour limiter l'influence d'enregistrements de mauvaise qualité sur les paramètres étudiés.

L'étude de la transmission synaptique spontanée est réalisée en présence d'ACSF alors que pour la transmission synaptique miniature, l'ajout de tétrotoxine (TTX, 1 μM) permet de bloquer les canaux sodium voltage-dépendants ce qui empêche la genèse de potentiels d'action. Dans ces conditions la probabilité de synchronisation de plusieurs sites de libération de neurotransmetteurs est très faible. Les courants post synaptiques miniatures sont donc majoritairement dues à la libération d'une vésicule de neurotransmetteur au niveau d'un seul site synaptique. Ainsi l'étude des courants synaptiques miniatures apporte des informations importantes sur les mécanismes de libération unitaire des vésicules en absence d'activité électrique potentiel d'action-dépendante au sein du réseau.

Les résultats concernant la transmission synaptique miniature sont cependant préliminaires car tous les enregistrements ont été utilisés dans les analyses pour avoir un effectif suffisant, sans contrôler leur qualité (R_a et courant de fuite).

5. Analyse des courants post-synaptiques

Les événements synaptiques sont détectés par une méthode de seuil avec le logiciel Electrophysiology Data Recorder (WinEDR). Pour cela nous avons une méthode de ligne de base mobile cherchant des variations d'amplitude supérieures à un seuil donné pour un temps donné (-2pA/1,25ms pour les EPSCs et 3pA/1,75ms pour les IPSCs). Les événements détectés par le logiciel sont ensuite inspectés visuellement et seuls ceux possédant les caractéristiques d'un courant synaptique (temps d'activation rapide et une décroissance exponentielle). L'analyse individuelle des événements a été réalisée avec le logiciel Wind WCP en utilisant le mode « *waveform measurement* ».

IV. IMAGERIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

1. Culture de ganglions rachidiens fraîchement dissociés

Les ganglions rachidiens (DRG) lombaires ont été prélevés et mis dans une solution saline équilibrée de Earle froide (EBSS ; 0 Ca^{2+} , 0 Mg^{2+} , Gibco). Après élimination au scalpel des racines, les DRG sont mis dans un milieu Trypsine 0,25% - EDTA (Gibco) durant 20-25min à 37°C pour **digestion enzymatique**. La digestion enzymatique est ensuite stoppée par remplacement du milieu trypsine par le milieu de culture (DMEM- HEPES, 10% sérum de cheval et 2% d'une solution de pénicilline (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et Streptomycine (5 mg/mL)), préalablement chauffé à 37°C. Les DRG subissent une étape de **dissociation mécanique** dans le milieu de culture par aller-retours successifs dans un cône de pipette P1000. La suspension de cellule résultante est ensuite centrifugée (15min, 1000rpm). Après remise en suspension du culot, un volume de 30 à 50 μL contenant les cellules de DRG est déposé sur la boîte de culture/imagerie. Cette boîte consiste en une petite boîte de petri (\varnothing 35mm, Mat Tek USA) avec un fond en verre (\varnothing 9mm) préalablement traitée avec de la Poly-D-Lysine dans un tampon borate (acide borique 0,1mM, pH ajusté à 8,4 avec du NaOH) durant 2h à 37°C. Les cellules sont laissées pour adhérer durant 20-30min, puis, après ajout de milieu de culture, les boîtes sont mises dans l'incubateur (37°C, 95% O_2 , 5% CO_2 et hygrométrie contrôlée) et l'expérience d'imagerie est réalisée le lendemain.

2. La sonde calcique Fura-2

Les variations de concentration intracellulaire en calcium libre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sont déterminées à l'aide d'une sonde fluorescente ratiométrique, le Fura-2. La sonde pénètre dans les cellules de manière passive sous une forme acétoxy-méthyl estérifiée liposoluble (Fura2-AM, Invitrogen, stock 1mM à -20°C dans DMSO), elle est piégée dans le cytosol après modifications enzymatiques par les estérases intracellulaires. La longueur d'onde d'émission de cette sonde fluorescente est située entre 510-530nm et elle est excitée alternativement à 350nm et 380nm, et l'émission de fluorescence est mesurée à 510 nm. En effet, lorsque le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente dans la cellule, la fluorescence lors de l'excitation à 350nm (F_{350}) augmente alors qu'elle diminue lors de l'excitation à 380nm (F_{380}). Ainsi le ratio $\Delta F = F_{350}/F_{380}$, d'où le nom de sonde ratiométrique, reflète indirectement la concentration en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indépendamment de la concentration de Fura-2 dans le cytosol.

Concrètement, après rinçage du milieu de culture avec un milieu HEPES utilisé tout au long des enregistrements (en mM ; NaCl 135 ; KCl 5 ; CaCl_2 2,5 ; MgCl_2 1 ; HEPES 5 ; Glucose 5 ; pH = 7,3), les cellules sont incubées durant 1h à l'obscurité et à température ambiante dans une solution HEPES, auquel on a ajouté 4 μM Fura-2-AM et 4 μM d'acide pluronique (stocké à 200g/L dans du DMSO) qui est un détergent qui facilite la pénétration du Fura2-AM dans les cellules en déstabilisant les membranes. Les cellules sont ensuite rincées 2-3 fois puis placées sous le microscope dans le milieu HEPES avec température contrôlée à 37°C.

3. Dispositif expérimental

3.1. Le poste d'imagerie

Le poste d'imagerie (**Figure 9A**) consiste en un microscope inversé à épifluorescence (Axiovert 35, Zeiss) équipé d'un objectif (x40) à immersion à huile. La lumière d'excitation est fournie par une ampoule au mercure (SVX1530, Muller Elektronik Optik) avec des filtres interférentiels placés sur le trajet optique dans une roue porte-filtre à 10 positions (Sutter instruments, USA). Les changements de filtre pour une excitation séquentielle à 350nm et 380nm sont opérés à une fréquence de 1Hz par la roue, commandée par l'ordinateur et le logiciel Imaging Workbench 4.0 (Axon Instruments). Les photons de fluorescence sont détectés par une caméra numérique (CoolSnap HQ, Roper Scientific). L'acquisition et l'analyse des images sont effectuées avec le logiciel Imaging Workbench 4.0.

3.2. Le système d'application de substances

Dans la boîte contenant les cellules, le milieu extracellulaire est renouvelé en permanence par un système de perfusion/aspiration, créant ainsi un flux continu. Localement, le champ enregistré est soumis à une perfusion locale grâce à un dispositif à 13 voies convergentes vers une canule unique de sortie placée à l'aide d'un micromanipulateur mécanique à environ 100 micromètres des cellules enregistrées. Chaque voie est reliée à un réservoir de solution dont la libération est contrôlée par une valve manuelle et l'écoulement des solutions se fait par gravité. Le protocole utilisé est détaillé en **Figure 9B**.

4. Acquisition

L'acquisition consiste en une série d'images lors de l'excitation alternative à 350nm et à 380nm et du calcul du ratio ΔF pour chaque pixel. Des régions d'intérêt (ROI) sont sélectionnées manuellement et ajustées au contour de la cellule selon une image prise sur fond clair ce qui permet aussi d'apprécier la taille de la cellule étant donnée une résolution spatiale mesurée expérimentalement à 1,85 pixels/ μm . Le logiciel enregistre l'évolution au cours du temps de la moyenne spatiale de F_{350} et F_{380} et le ΔF pour chaque ROI. Chaque champ enregistré est réanalysé à posteriori après soustraction du bruit de fond et ajustement des ROIs pour éviter la contamination de la fluorescence de chaque cellule par une cellule voisine. Ces données sont ensuite exportées pour analyse.

5. Analyse

Les valeurs de ΔF au cours du temps ainsi que la surface des cellules enregistrées sont reportées dans un tableur et analysées à posteriori utilisant un script Python. Les paramètres étudiés sont la taille de la cellule, sa fluorescence de base (*Baseline*, BL), l'amplitude du pic de la réponse au potassium et à la capsaïcine ainsi que la cinétique de retour de pic pourcentage 100s post-application.

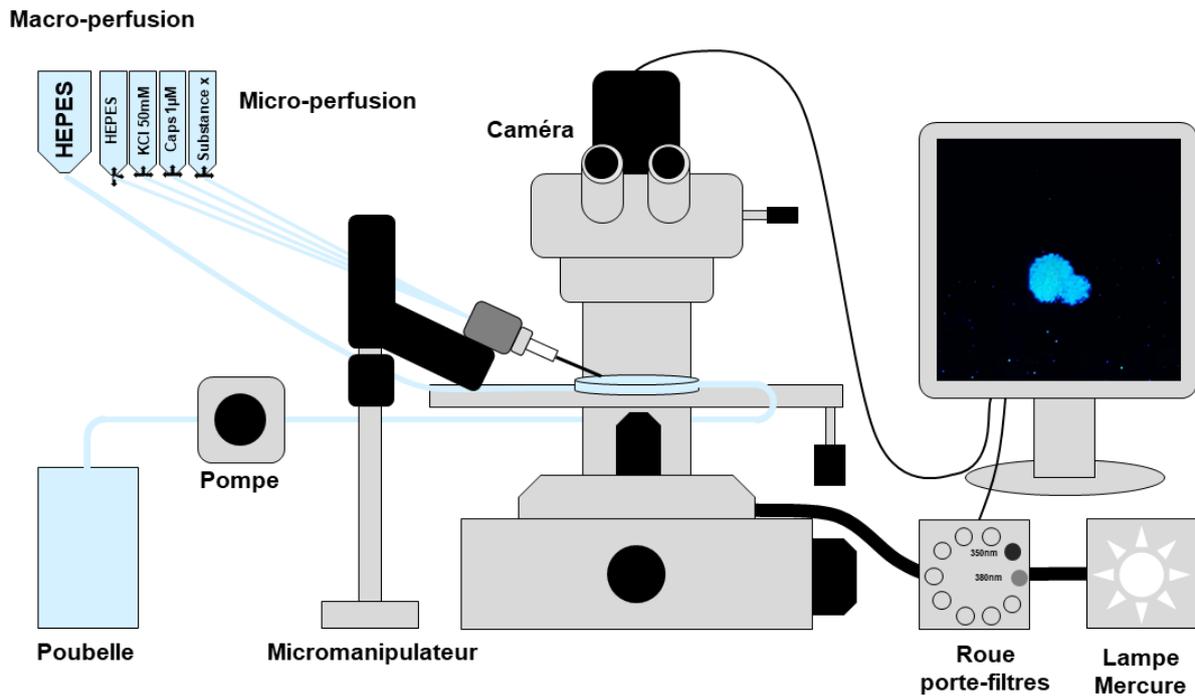
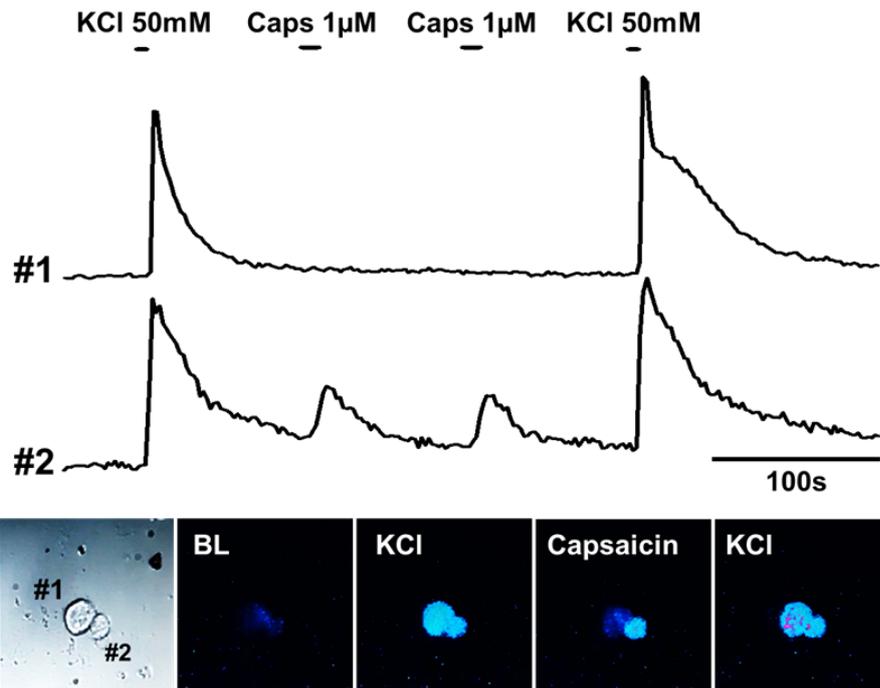
A.**B.**

Figure 9. Dispositif expérimental d'imagerie du calcium libre intracellulaire.

Dispositif expérimentale (A). Le protocole consiste en une première application de milieu HEPES plus concentré en potassium (KCl 50mM, 5s), ce qui entraîne une dépolarisation de cellules, et dans les neurones seulement une augmentation de calcium. Ensuite, deux applications successives de capsaïcine (Caps, 1µM, 10s) sont réalisées ainsi qu'une dernière application de potassium pour vérifier l'intégrité des cellules enregistrées. Toutes ces applications sont espacées de 100 secondes. Ci-dessus est présenté des traces du ΔF au cours du temps pour deux régions d'intérêt ainsi que les images représentatives. Ces régions d'intérêt représentent deux cellules, une ne répondant pas à la capsaïcine (#1) donc qui n'exprime probablement pas le récepteurs TRPV1 et une autre cellule répondante (#2) (B).

V. SPECTROMETRIE DE MASSE

Cette partie a été réalisée en collaboration et ne sera que très peu détaillée dans ce manuscrit.

1. Préparation des échantillons

La partie dorsale des tranches de moelle épinière (400µm) issues des expériences d'électrophysiologie est isolée à l'aide d'un scalpel sous control visuel au microscope. Le tissu est immédiatement placé dans un tube et est stocké à -80°C jusqu'à constitution de la banque complète des échantillons.

L'ensemble des échantillons sont homogénéisés (Bio-Gen PRO200 Homogenizer, ProScientific) dans 200µL d'acide ascorbique (0.1mM), soniqués (2 x 5s à 100W) puis centrifugés (20 000g, 30min à 4°C). Les surnageants sont récupérés et la concentration totale en protéines est déterminée (Protein Assay kit, Bio-Rad). Concrètement, 10µL de surnageant est mélangé avec 30µL d'un tampon borate et 10µL de standards internes contenant (en pmoles) 90 D5-glutamate, 25 D6-GABA, 40 D5-glycine, 20 C6-noradrenaline et D4-serotonine. Ensuite, 10µL d'*AccQtag* réactif est ajouté et laissé pour incubation (10min à 55°C) sur un agitateur. Quatre volumes d'acétonitrile (100%) sont ajoutés et mélangés (10s), puis les tubes sont centrifugés (20 000g, 5min à 20°C) et les surnageant sont analysés par chromatographie à phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

2. Chromatographie à phase liquide couplé à la spectrométrie de masse

L'analyse des surnageants a été réalisée comme décrit précédemment³³⁶. Le dispositif consiste en un système de chromatographie à phase liquide haute performance (HPLC, Dionex Ultimate 3000, Thermo Electron) couplé à un spectromètre de masse en tandem Endura doté d'une source électro-spray et d'un triple quadripôle contrôlé par le logiciel Xcalibur 2.0 (Thermo Electron) et le mode *multiple reaction monitoring*. Le système HPLC permet de séparer et de purifier les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques, dans notre cas leur profil d'hydrophobicité. Le spectromètre de masse permet d'identifier et de quantifier une molécule selon son rapport masse/charge (m/z). Il est composé de trois parties. Une source qui permet d'ioniser les molécules et de leur conférer une charge. Un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z. Un détecteur qui transforme la quantité d'ions présente en signal électrique. Concrètement, 5µL de chaque surnageant passe dans une colonne Zorbax SB-C18 en phase inverse (1 x 150mm, 3.5 µM ; 90µl/min ; Agilent technologies), permettant d'obtenir le temps de rétention de différentes fractions puis est analysé par le spectromètre de masse. L'identification des composés est basée sur le temps de rétention en HPLC, le rapport masse/charge de l'ion parent et son profil de fragmentation (**Table 6**). La quantification absolue de chaque composé est réalisée en utilisant le ratio de l'aire de la réponse d'ions fils du standard interne en accord avec la méthode de dilution isotopique³³⁷. Les quantités des neurotransmetteurs sont ensuite normalisées sur la quantité totale de protéines de l'échantillon.

Gradient d'élution en HPLC							
Temps (min)	0	2.5	9	11	12	12.5	18
Pourcentage de la phase mobile B	0	0	20	98	98	0	0
Paramètres du spectromètre de masse							
Mode							positif
Voltage de l'électrospray							3,500 V
Gaz de nébulisation							Azote
Gaz de désolvation							18 Arb
Gaz auxiliaires							7 Arb
Température du tube de transfert							297°C
Température de vaporisation							131°C
Résolution du Q1 et du Q3							0.7 FWHM
Pression du gaz de collision (Argon)							2 mTorr
Paramètres d'ionisation, de sélection, de fragmentation et d'identifications des composés							
Composé	Polarité	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Energie de collision (V)	Lentille RF (V)		
Serotonine	positive	347.13	145.05	18.49	232		
			160.07	20.82			
			171.00	27.54			
D4-Serotonine	positive	351.16	145.04	19.50	219		
			164.05	21.37			
			171.00	28.10			
Noradrenaline	positive	340.15	116.11	55.00	215		
			145.11	36.19			
			171.06	24.61			
C6-Noradrenaline	positive	346.15	145.11	36.04	226		
			158.11	18.34			
			171.06	25.62			
GABA	positive	274.11	116.04	46.35	157		
			128.11	43.47			
			171.05	19.66			
D6-GABA	positive	280.16	116.11	48.73	150		
			128.04	44.79			
			171.00	19.61			
Glutamate	positive	318.11	116.11	55.00	168		
			128.11	2.82			
			170.92	20.51			
D5-Glutamate	positive	323.12	116.11	55.00	160		
			128.05	48.67			
			171	20.76			
Glycine	positive	247.97	116.11	41.15	160		
			128.11	39.12			
			171.06	21.38			
D5-Glycine	positive	246.13	116.11	41.85	161		
			128.04	39.33			
			171.06	18.80			

Table 6. Paramètres de la LC-MS/MS pour le dosage des neurotransmetteurs

VI. ANALYSE STATISTIQUE

La manipulation des données a été réalisée en utilisant le langage Python et l'analyse statistique le langage R (*fonctions R indiquées pour chaque test*). Etant donné les contraintes de nos données comportementales (hétérogénéités de variances, non normalité des résidus, effectifs réduits et hétérogènes) nous avons décidé après conseil statistique d'utiliser une approche de comparaison deux à deux. Nous avons utilisé un test t de Welch (*t.test () in R, P_{Welch}*) dans le cas de données avec des résidus normalement distribués (Shapiro-Wilk $p > 0.05$, *shapiro.test () in R*) et un test de Wilcoxon (*wilcox.test () in R, P_{Wilcoxon}*) dans le cas contraire. Les données exprimées en proportions ont été comparées avec le test exact de Fisher (*fisher.test () in R, P_{Fisher}*). Les distributions ont été comparé en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov (*ks.test () in R, P_{K-S}*) associé à une comparaison de la tendance centrale en utilisant le teste de médiane de Mood (*median_test (), « coin » package in R, P_{Mood}*). Concernant les corrélations, les données ont été centrées et réduites (*Z-score*) pour les mâles et les femelles séparément puis des régressions linéaires (*P_{LR}*) ont été effectuées. Les graphs ont été réalisés à l'aide de GraphPad Prism (La Jolla, California, USA). Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), et $p < 0.001$ (***). A noter que certaines *p-value* proches du niveau de significativité ($p < 0.06$) sont indiquées en chiffres sur les graphiques.

RESULTATS

Les résultats seront présentés en anglais car faisant parti de l'écriture d'un article scientifique en cours de soumission dont les parties méthodes et discussion n'ont pas été incluses. De plus, des résultats non présents dans cet article sont présentés en annexe. Le tout sera discuté dans une discussion bien distincte en français ci-après.

Sex differences drive nociceptive alterations in a valproate-induced mouse model of autism.

L. Ruelle-Le Glaunec, V. Pallage, V. Andry, Y. Goumont, R. Schlichter, JL. Bossu.

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of developmental disorders defined by impaired communication and social interactions as well as restricted and repetitive behaviors. Most of ASD individuals display sensory anomalies, but description regarding pain and underlying nociception are sparse and heterogeneous. In this study, we used outbred CD1 male and female mice prenatally exposed to valproate (VPA) as a model of ASD and explored autism-like behavior as well as nociceptive sensitivity using behavioral approach. Our data show that VPA exposed animal display reduced sociability, increased grooming, hypo-reactivity to nociceptive heat as well as a diminished response to intra-plantar capsaicin and formalin. Interestingly, these alterations were mainly observed in adult male animals. Then using calcium imaging, we observed a faster calcium regulation in cultured sensory neurons from VPA animals in response to capsaicin. Finally, using patch-clamp recordings, we found synaptic transmission changes in neurons from Lamina II of the dorsal horn of the spinal cord without apparent change in excitatory/inhibitory balance. Thus, VPA exposed mice display sex-specific behavioral changes to nociceptive stimulation as well as alterations of sensory neurons and dorsal horn neuronal network.

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of developmental disorders defined by the core characteristics of impaired communication and social interactions as well as restricted and repetitive behaviors². Atypical sensory experience is estimated to occur in most autistic individuals and to affect all modalities^{94,95,338}. These are described as “hyper or hypo-reactivity to sensory inputs or unusual interest for sensory aspects of the environment”². Regarding nociception and pain, past autobiographic reports as well as clinical observation led to the belief that ASD individuals are less sensitive to pain¹⁹¹, described in the DSM-V as an “apparent indifference to pain”. However, it remains unclear whether this apparent insensitivity is related to difficulties in expressing the pain related to ASD symptoms, or changes in cellular and molecular actors underlying nociception and pain^{202,204}. However, reviews of available data on pain sensitivity in individuals with ASD reveals heterogeneity^{204,339}. Indeed, some observations suggest hypo-sensitivities, other hyper-sensitivities and some do not detect any changes^{127,132,214,215,340}. Interestingly, some electroencephalography and functional magnetic

resonance imaging experiments have shown altered neural response to painful stimuli even without changes in declared pain sensation^{203,221}. These observations highlight potential alterations in nociceptive system that do not always translate to clear behavioral outcome under certain context.

Animal models of ASD have been used for investigating the underlying features of these neurodevelopmental disorders. They rely on engineered genetic mutations known to be associated with ASD, inbred animal strains as well as some environmental and pharmacological manipulations^{284,286}. Alterations of these animals' behavior regarding social interaction, communication or repetitive and restrictive behaviors have been observed and replicate some symptoms described in ASD^{284,286,287,297}. Regarding nociception, several studies report altered behavioral responses, but results are highly heterogeneous between ASD models and between modalities (mechanical, heat, cold, visceral)^{304,308,312,313,315,339}. Interestingly, decreased allodynia and hyperalgesia are reported in some inflammatory and neuropathic pain models, suggesting cellular and molecular changes in underlying mechanism^{309,313}.

In this study, we have reinvestigated, the existence of core and auxiliary symptoms of ASD as well as possible alterations of somatosensory modalities with a focus on nociception in the VPA mouse model of autism. We used an outbred CD1 mouse strain to have a variable genetic background, getting closer to human ASD situation³⁴¹. We evaluated juvenile and adult animals and considered sex differences. We explored possible cellular and molecular alterations in dorsal root ganglia sensory neurons using calcium imaging. Finally, we looked at the dorsal horn of the spinal cord and the functioning of its network using a combined approach of neurotransmitter quantification with mass spectrometry and measured synaptic activity using patch clamp recordings.

Methods

Not fully written yet, please refer to previous "Méthodes" section.

Results

VPA affects pregnancy outcome but not sex ratio in exposed litters.

While gestation is complete in all saline-injected females, VPA halves the likelihood of successful birth (Control = 100%; VPA = 51.6%) (**Figure 1A**). Furthermore, following VPA injection, death of a pup is observed in 6.5% of cases (**Figure 1B**). Interestingly, VPA injection significantly reduces the number of pups in litters (Control = 13.5 ± 0.8 , $n = 15$; VPA = 6.2 ± 1.1 , $n = 15$; $P_{\text{Welch}} < .0001$) (**Figure 1C**) but not the male/female sex ratio (Control = 0.90 ± 0.08 , $n = 15$; VPA = 1.39 ± 0.29 , $n = 12$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .2484$) (**Figure 1D**). Even though a tail kink and few paw anomalies were observed as previously reported, pups did not display any major deformation³⁴².

Thus, VPA injections demonstrate fetal toxicity, decrease the average number of offspring without changing the sex ratio.

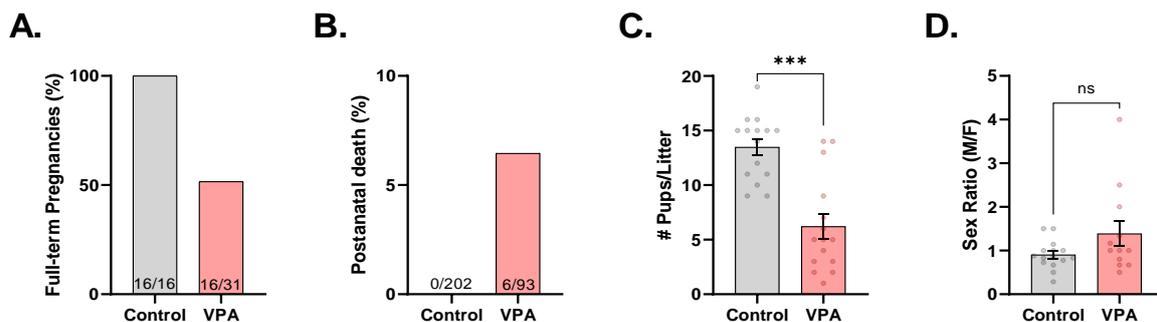


Figure 1. Effect of VPA injections on pregnancy outcome and survival, number, and sex of pups.

VPA injections decrease the proportion of full-term pregnancies whereas saline injections do not (A). VPA injections induce post-natal death (B). VPA decreases the average number of pups in each litter (C) without changing the sex ratio (D). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents a litter. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA alters some aspects of pup's development in a sex-dependent manner.

First, to assay the animal's development, we measured the body weight weekly from post-natal week 1 to 10 (**Figure 2A and 2B**). Before weaning (week4), VPA females display a lower body weight compared to control as illustrated by week 2 (Control = 9.41 ± 0.30 g, n = 32; VPA = 8.11 ± 0.33 g, n = 23; $P_{\text{Welch}} = .0051$). This is not observed in males (Control = 8.90 ± 0.15 g, n = 17; VPA = 8.51 ± 0.51 g, n = 28; $P_{\text{Welch}} = .4698$). However, after weaning, a lower body weight is found in VPA condition, as illustrated by week 7, in females (Control = 27.91 ± 0.41 g, n = 32; VPA = 25.02 ± 0.44 g, n= 22; $P_{\text{Welch}} < .0001$) and males (Control = 36.81 ± 0.52 g, n = 17; VPA = 33.97 ± 0.82 g, n= 27; $P_{\text{Welch}} = .0060$).

Second, we observed the opening of the eyes process from P11 to P15 (**Figure 2C and 2D**). Interestingly, the eyes' opening index is different at P13 in VPA male compared to controls (Control = 1.06 ± 0.16 , n = 32; VPA = 0.52 ± 0.15 , n = 22; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0329$). This is not significant in females (Control = 0.97 ± 0.23 , n = 17; VPA = 0.68 ± 0.18 , n = 29; $P_{\text{Wilcoxon}} = .1565$). It is to be noted that no animal's eyes stayed closed past P17.

Third, sensory-motor development was evaluated observing the righting reflex at P5 (**Figure 2E**). While VPA females display a higher latency to self-right than controls (Control = 1.58 ± 0.40 s, n = 13; VPA = 4.34 ± 1.12 s, n = 20; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0284$), this difference is not significant in males (Control = 3.03 ± 0.67 s, n = 26; VPA = 5.35 ± 1.80 s, n = 12; $P_{\text{Wilcoxon}} = .4994$).

Finally, we evaluated pups' preference for maternal scent (**Figure 2F**). VPA females show a lower total time sniffing maternal litter compared to controls (Control = 130.25 ± 9.31 s, n = 13; VPA = 88.63 ± 7.52 s, n = 20; $P_{\text{Welch}} = .0018$). This difference is not found to be significant in males (Control = 111.06 ± 6.77 s, n = 13; VPA = 93.38 ± 11.91 s, n = 20; $P_{\text{Welch}} = .2125$).

Globally, prenatal VPA exposure affects some aspects of CD1 mouse pups' development. Nonetheless, a sex specificity is reported. For the opening of the eyes, only male pups are affected but for the righting reflex, the maternal scent preference and pre-weaning weight, only female pups are affected.

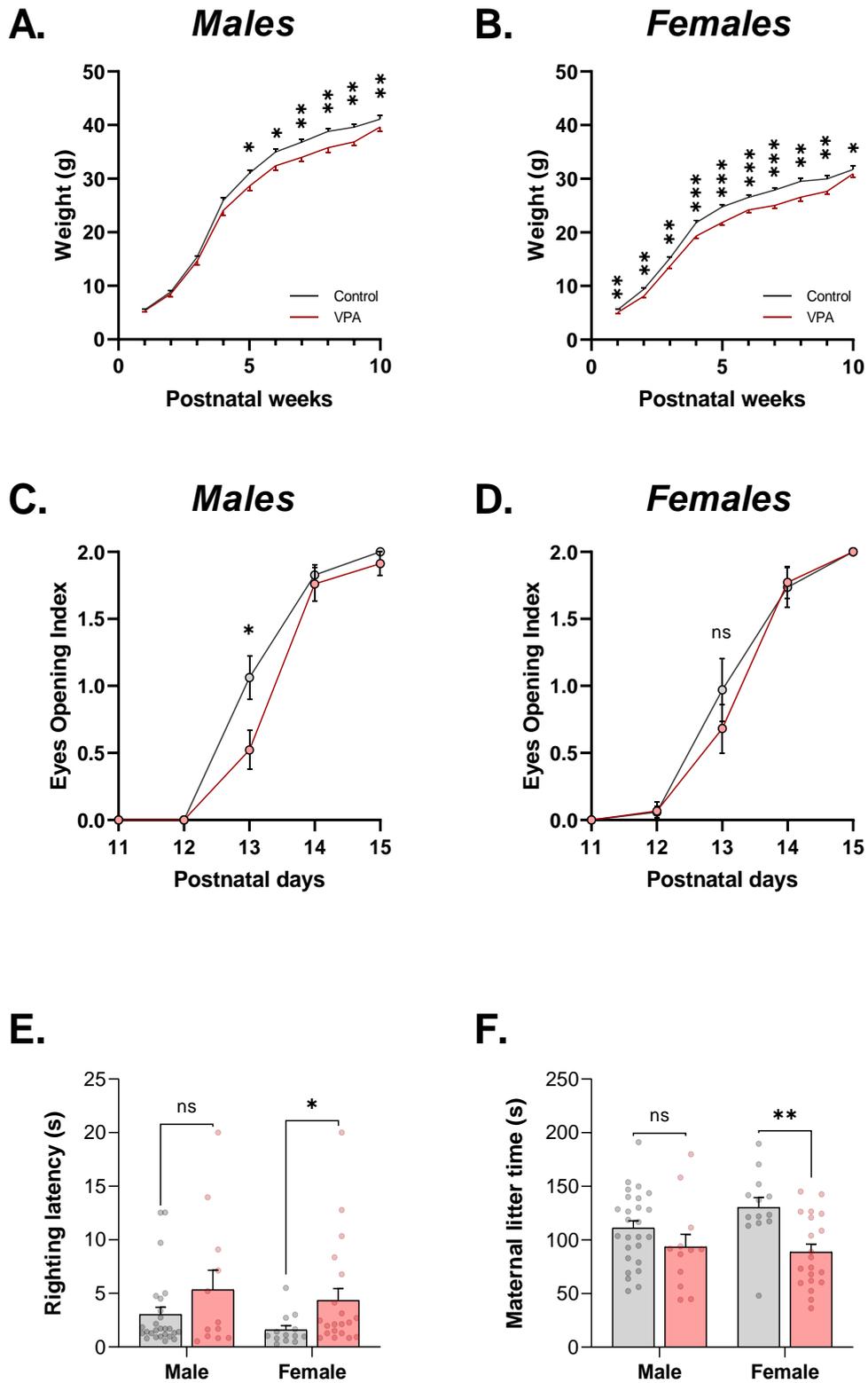


Figure 2. VPA exposure leads to developmental defects in a sex-specific manner.

VPA males show a reduced body weight only after 4 postnatal weeks (A) however VPA females show a reduced body weight from the first postnatal week (B). VPA males show a lower eyes opening index at P13 (C) whereas females do not (D). Righting reflex evaluated at P5 demonstrates an increased latency to self-right in females VPA compared to controls (E). Maternal scent test shows lower total time spent sniffing maternal sawdust in females VPA compared to controls (F). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA induces “core autistic behaviors” in adult male mice.

We assayed the animals’ social preference as previously described using the three-chambers test^{305,324}. Surprisingly, only a tendency for a lower sociability index is observed in VPA males (Control = 0.29 ± 0.04 , $n = 34$; VPA = 0.17 ± 0.06 , $n = 29$; $P_{\text{Welch}} = .0559$) and no significant difference is found in female mice which interestingly show a low social preference (Control = 0.07 ± 0.06 , $n = 13$; VPA = -0.04 ± 0.06 , $n = 18$; $P_{\text{Welch}} = .2159$) (**Figure 3A**).

Thus, to assay sociability in a different way, we performed a direct social interaction test and limited our observation to the number of pursuits initiated by the animal of interest, a less dyadic form of behavior than other parameters usually measured. Surprisingly, we again observed a tendency for fewer initiated pursuits in VPA males (Control = 8.0 ± 1.3 , $n = 15$; VPA = 5.2 ± 0.9 , $n = 23$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0529$) and no significant difference was found in female mice (Control = 4.6 ± 1.1 , $n = 12$; VPA = 2.6 ± 0.7 , $n = 9$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .2522$) (**Figure 3B**). Moreover, some VPA males (4/23) showed aggressive behavior which was not observed in other conditions.

Additionally, we tested for the presence of restrictive and repetitive behavior, quantifying spontaneous grooming, like it is usually done in rodents^{287,343}, during the exploratory phase of the three-chambers test. While total grooming time is higher in VPA males than controls (Control = 21.4 ± 5.1 s, $n = 34$; VPA = 35.7 ± 6.7 s, $n = 29$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0086$), no significant difference is observed in females (Control = 18.30 ± 4.83 s, $n = 13$; VPA = 23.7 ± 4.6 s, $n = 18$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .3782$) (**Figure 3C**).

We then checked if the grooming behavior could be induced by spraying a sucrose-based solution on the animal’s fur. Interestingly, no significant difference in the time spent grooming is observed in male (Control = 42.4 ± 7.0 s, $n = 26$; VPA = 67.5 ± 10.6 s, $n = 12$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0709$) or female mice (Control = 75.6 ± 19.7 s, $n = 13$; VPA = 75.8 ± 10.4 s, $n = 18$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .6500$) (**Figure 3D**).

To conclude, male CD1 mice prenatally exposed to VPA show a tendency to a lower sociability and an increased spontaneous grooming. Interestingly, females only show a weak preference for social partner and no core ASD-like behaviors were observed in VPA condition.

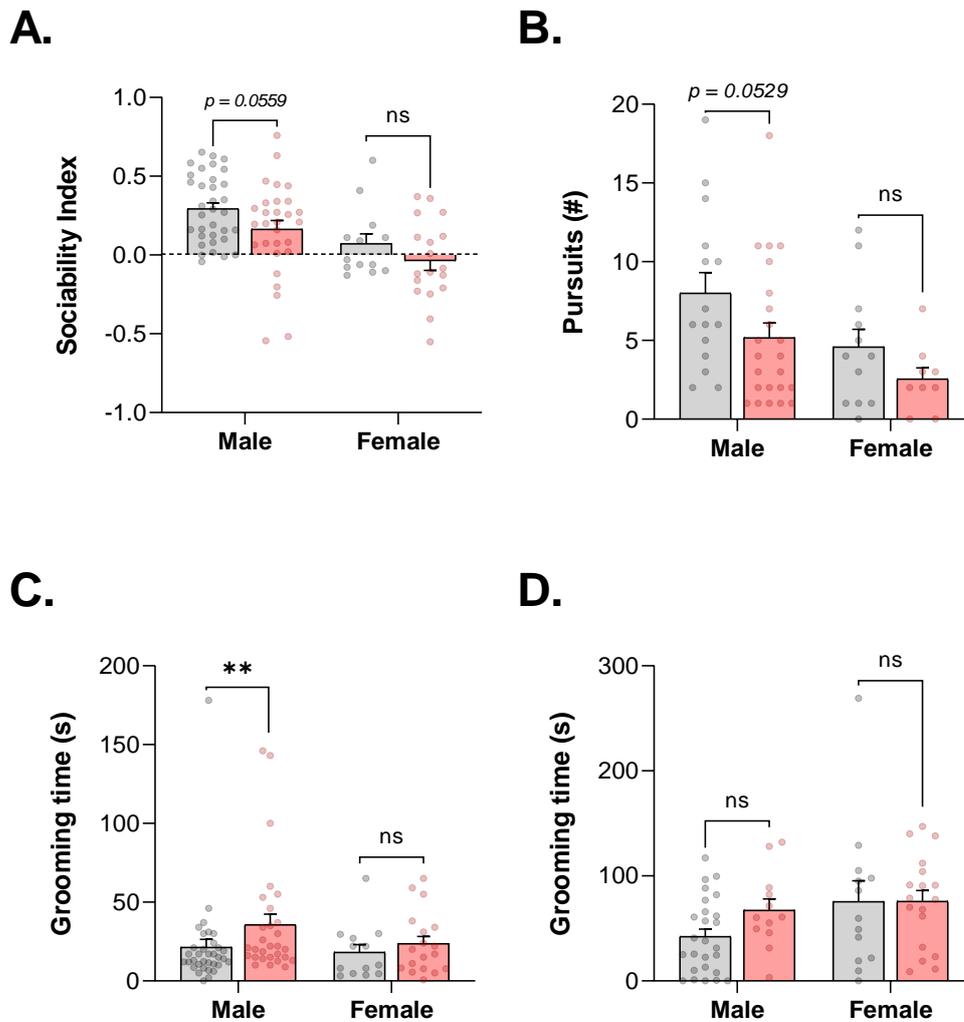


Figure 3. VPA induces reduced sociability and increases spontaneous grooming in males only.

Preference for social partner measured using the sociability index calculated in three chambers test shows tendency to reduced sociability in VPA males. Interestingly, Females demonstrate low preference for social partner. (A). Direct social interaction evaluated during 5min in an open field shows a tendency to a lower number of pursuits initiated by VPA males compared to controls. (B). Spontaneous grooming time measured during exploratory phase of three chambers test show an increase in VPA males but no difference in females (D). Sucrose (10%)-induced grooming behavior demonstrate no difference between VPA animals and their respective controls (E). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA leads to “auxiliary autistic behavior” in adult male mice.

First, we measured locomotor activity during exploratory phase of three chambers test as total distanced travelled and mean speed. The total distanced travelled is significantly lower in VPA compared to control, both in males (Control = $87.07 \pm 2.66\text{m}$, $n = 34$; VPA = $72.80 \pm 2.33\text{m}$, $n = 29$; $P_{\text{Welch}} = .0002$) and in females (Control = $92.68 \pm 3.85\text{m}$, $n = 13$; VPA = $74.88 \pm 2.19\text{m}$, $n = 18$; $P_{\text{Welch}} = .0007$) (**Figure 4A**). Furthermore, animals' mean speed is also lower in VPA compared to control males (Control = $0.148 \pm 0.004\text{m/s}$, $n = 34$; VPA = $0.121 \pm 0.04\text{m/s}$, $n = 29$; $P_{\text{Welch}} < .0001$) and females (Control = $0.154 \pm 0.006\text{m/s}$, $n = 13$; VPA = $0.125 \pm 0.04\text{m/s}$, $n = 18$; $P_{\text{Welch}} = .0007$) (**Figure 4B**).

Second, we explored olfactory and cognitive functions using the buried food test (Sheryl et al., 2009). The latency to find buried food pellet is significantly higher in VPA males compared to controls (Control = $25.7 \pm 10.0\text{s}$, $n = 25$; VPA = $70.4 \pm 21.1\text{s}$, $n = 12$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0116$). No significant difference is observed in female mice (Control = $27.7 \pm 8.2\text{s}$, $n = 13$; VPA = 38.3 ± 9.77 , $n = 18$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .3732$) (**Figure 4C**). Surprisingly, once the pellet was found, a significantly higher latency to eat it is observed in VPA males (Control = $49.7 \pm 17.7\text{s}$, $n = 25$; VPA = $376.9 \pm 111.4\text{s}$, $n = 12$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0022$) but not in females (Control = $154.4 \pm 67.9\text{s}$, $n = 13$; VPA = $62.7 \pm 14.1\text{s}$, $n = 18$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .9215$) (**Figure 4D**).

Thus, mice prenatally exposed to VPA show locomotor alterations. However, only males show difference in buried food test with an increased latency to find and to eat pellet.

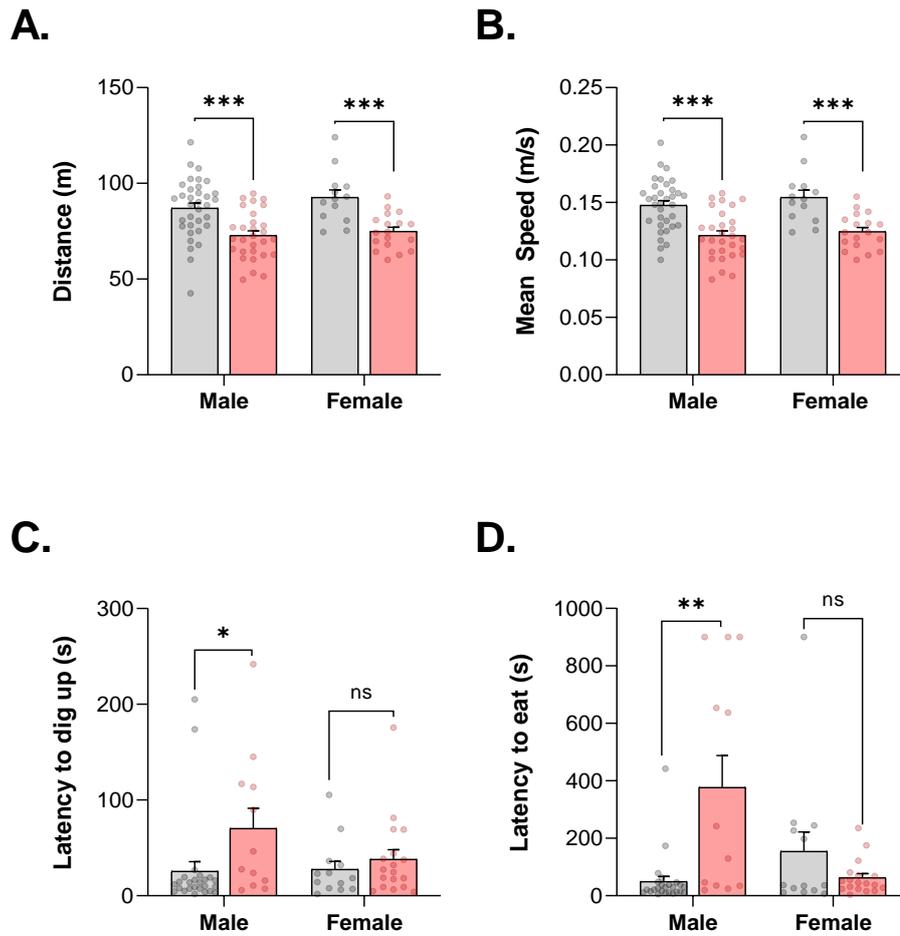


Figure 4. VPA induces locomotor, olfactory and cognitive alterations, preferentially in males.

Locomotor activity is measured using tracking data in exploration phase of three chambers test. VPA animals display a lower distance travelled (A) and a lower mean speed (B). Buried food test show a higher latency to find pellet (C) and a higher latency to eat it (D) in VPA males compared to controls. Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA increases comfort temperature in adult males.

We measured thermal preference and body temperature at two different age points, one corresponding to a juvenile age (4 post-natal weeks) and one to and an adult one (> 8 post-natal weeks).

We assessed the thermal preference using thermal ring assay. At a juvenile age no difference is observed for preferred temperature (PT) in males (Control = $29.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, n = 10; VPA = $29.3 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$, n = 8; $P_{\text{Welch}} = .8109$) or females (Control = $31.2 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$, n = 10; VPA = $30.7 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$, n = 18; $P_{\text{Welch}} = .2665$) (**Figure 5A**). However, at an adult age, PT is higher in VPA males compared to controls (Control = $26.5 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, n = 16; VPA = $28.2 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$, n = 11; $P_{\text{Welch}} = .0168$). This latter effect is not found in females (Control = $29.7 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$, n = 7; VPA = $29.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$, n = 11; $P_{\text{Welch}} = .7564$) (**Figure 5B**).

Interestingly, these results were accompanied by changes in body temperature. While no significant differences is observed in juvenile males (Control = $37.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, n = 13; VPA = $37.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, n = 13; $P_{\text{Wilcoxon}} = .6618$), juvenile females (Control = $37.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, n = 17; VPA = $37.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, n = 12; $P_{\text{Wilcoxon}} = .7220$) (**Figure 5C**) or in adult females (Control = $37.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, n = 14; VPA = $37.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, n = 9 ; $P_{\text{Welch}} = .7540$); body temperature is found to be higher in adult VPA males compared to controls (Control = $36.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, n = 11; VPA = $37.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, n = 11 ; $P_{\text{Welch}} = .0026$) (**Figure 5D**).

In conclusion, adult CD1 males prenatally exposed to VPA display a higher temperature of comfort than controls which is accompanied by a higher body temperature.

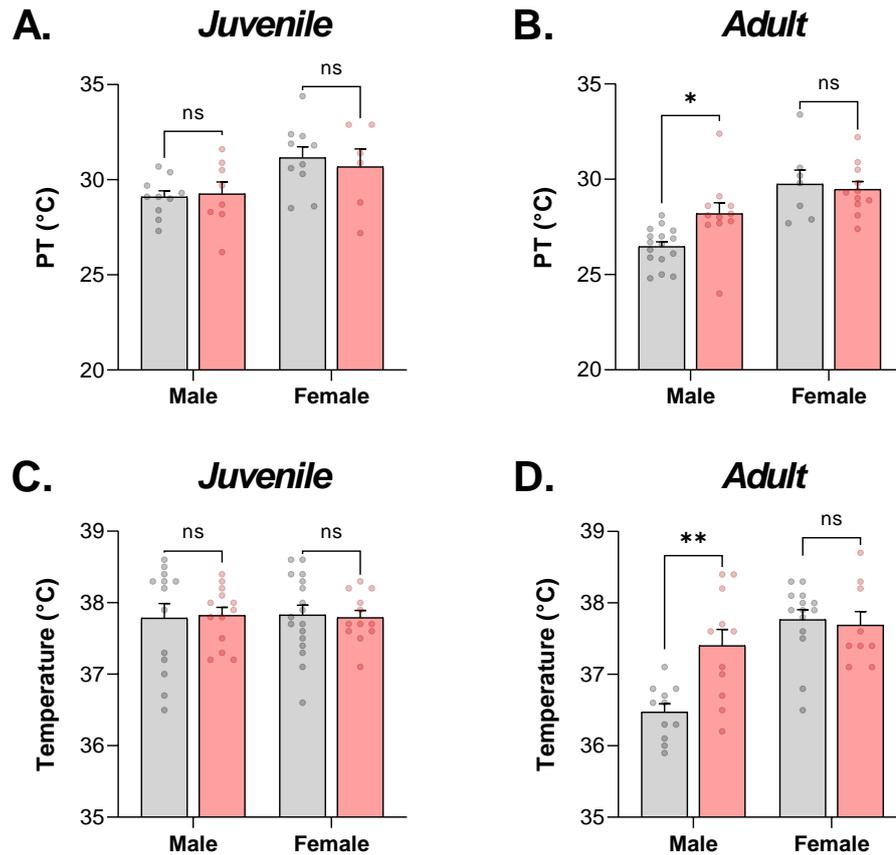


Figure 5. VPA changes thermal preference in adult males.

Thermal preference measured in 15-45°C gradient ring test shows no difference at juvenile age (A) but a higher comfort temperature in VPA males compared to control at an adult age (B). Body temperature measured with a rectal thermometer shows no difference at juvenile age (C) and a higher body temperature in VPA males compared to controls at an adult age (D). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

Mechanical and cold sensitivities are moderately altered in VPA animals.

We measured mechanical as well as cold sensitivities in juvenile and adult animals.

First, static mechanical sensitivity was evaluated using Von Frey filaments. Even though some VPA juvenile males display a surprisingly high threshold, no significant difference is observed regarding the punctate mechanical sensitivity of males (Control = 0.76 ± 0.04 g, n = 26; VPA = 1.39 ± 0.27 g, n = 17; $P_{\text{Wilcoxon}} = .1496$) or females (Control = 0.69 ± 0.04 g, n = 13; VPA = 0.68 ± 0.68 g, n = 18; $P_{\text{Wilcoxon}} = .5347$) (**Figure 6A**). A similar result is found at an adult age in males (Control = 0.87 ± 0.04 g, n = 34; VPA = 0.99 ± 0.05 g, n = 24; $P_{\text{Wilcoxon}} = .2935$) but a tendency to a higher threshold is observed in VPA females compared to controls (Control = 0.76 ± 0.09 g, n = 13; VPA = 0.81 ± 0.07 g, n = 18; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0560$) (**Figure 6B**).

Second, dynamic mechanical sensitivity was evaluated using the cotton swab test. No significant difference is found at a juvenile age regarding the probability of withdrawal of females (Control = 0.28 ± 0.06 , n = 13; VPA = 0.39 ± 0.07 , n = 18; $P_{\text{Wilcoxon}} = .2665$). However, a tendency to a higher probability is observed in VPA juvenile males compared to controls (Control = 0.25 ± 0.03 , n = 26; VPA = 0.36 ± 0.05 , n = 12; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0554$) (**Figure 6C**). At an adult age, no significant difference is found in males (Control = 0.28 ± 0.03 , n = 26; VPA = 0.25 ± 0.05 , n = 12; $P_{\text{Wilcoxon}} = .5264$) or females (Control = 0.24 ± 0.04 , n = 13; VPA = 0.32 ± 0.05 , n = 18; $P_{\text{Wilcoxon}} = .2598$) (**Figure 6D**).

Finally, we measured nociceptive cold sensitivity using cold plantar assay. Interestingly, no significant difference in latency to withdraw paw is observed in juvenile males (Control = 4.5 ± 0.2 s, n = 17; VPA = 4.3 ± 0.3 s, n = 11 ; $P_{\text{Welch}} = .7113$) and female (Control = 3.6 ± 0.2 s, n = 7; VPA = 3.9 ± 0.3 s, n = 13; $P_{\text{Welch}} = .3929$) (**Figure 6E**) or in adult VPA males (Control = 4.0 ± 0.2 s, n = 7; VPA = 4.3 ± 0.2 s, n = 10 ; $P_{\text{Welch}} = .2887$) and females (Control = 3.7 ± 0.2 s, n = 8; VPA = 3.7 ± 0.2 s, n = 6 ; $P_{\text{Welch}} = .7499$) (**Figure 6F**).

Thus, in CD1 mice prenatally exposed to VPA, even though some tendencies are observed regarding mechanical sensitivity, these are not present across both assayed ages. Moreover, VPA animals display unaltered cold sensitivity.

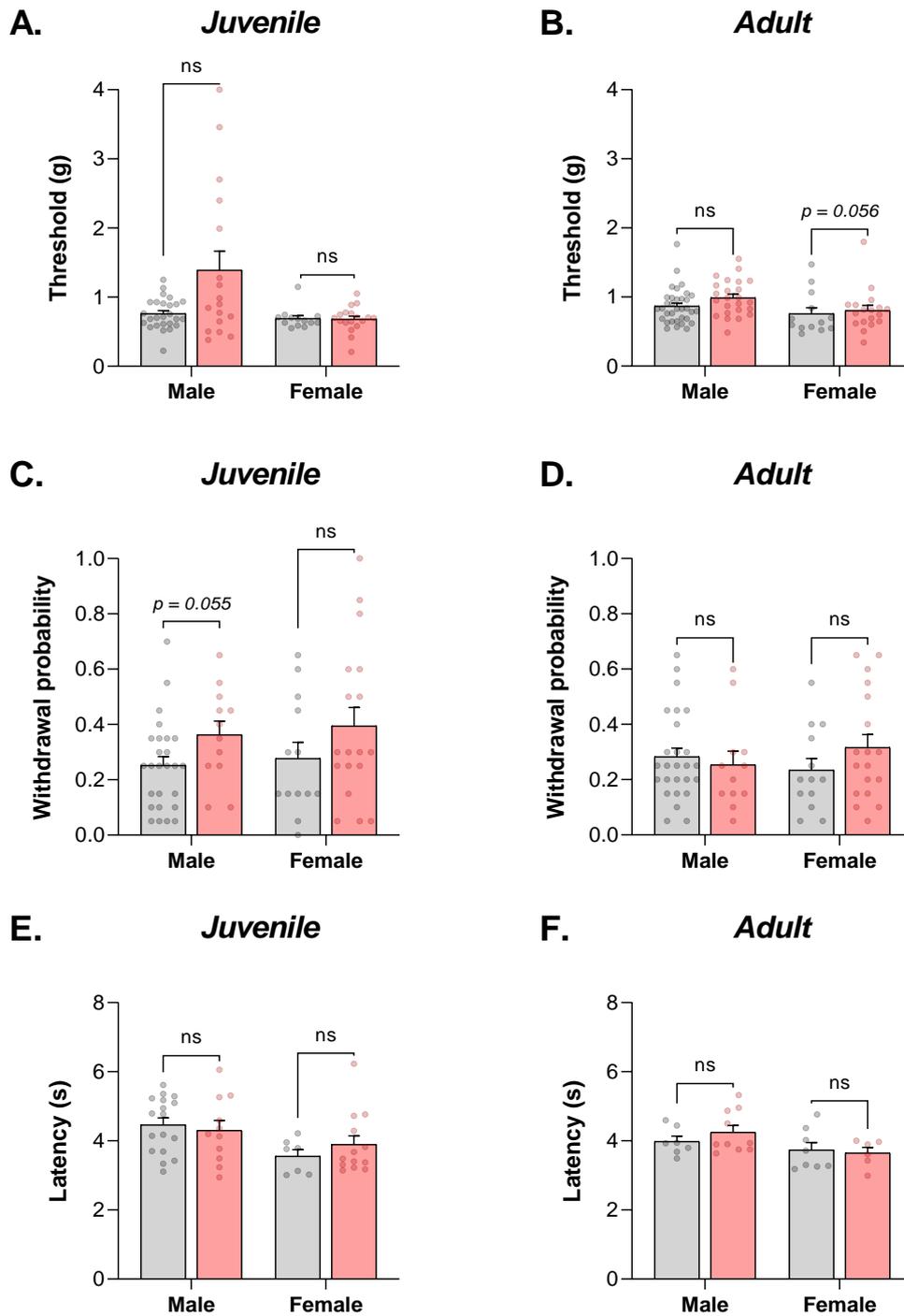


Figure 6. Effect of VPA on mechanical and thermal cold sensitivity.

Punctate mechanical sensitivity measured with manual VonFrey test shows no difference at juvenile age (A) and a tendency to higher threshold in adult VPA females (B). Dynamic mechanical sensitivity measured with cotton swab test shows a tendency to higher response probability in juvenile VPA males (C) but no difference at adult age (D). Nociceptive cold sensitivity measured with cold plantar test shows no difference at a juvenile age (E) or at adult age (F). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA decreases nociceptive heat sensitivity in adult mice and changes associated behavioral repertoire.

We evaluated thermal heat nociception at juvenile and adult age points. First, we measured nociceptive heat sensitivity using a traditional 52°C hot plate. While in juvenile animals, no significant difference for the latency of the first nociceptive response is observed in males (Control = 12.9 ± 0.4 s, n = 26; VPA = 11.6 ± 0.8 s, n = 12 ; $P_{\text{Welch}} = .1700$) or females (Control = 14.8 ± 0.8 s, n = 13; VPA = 12.8 ± 0.7 s, n = 18 ; $P_{\text{Welch}} = .0613$) (**Figure 7A**) ; in adult animals however, the latency is higher in VPA compared to controls both in males (Control = 11.6 ± 0.5 s, n = 31; VPA = 13.8 ± 0.6 s, n = 22 ; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0056$) and in females (Control = 11.5 ± 0.7 s, n = 17; VPA = 12.7 ± 0.3 s, n = 27 ; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0047$) (**Figure 7B**). To further characterize this latter result in adult animals, we used an incremental hot plate (30-52°C at 10°C/min) (**Figure 7C**) and observed a higher nociceptive threshold in VPA males compared to controls (Control = 46.5 ± 0.2 °C, n = 19; VPA = 47.2 ± 0.22 °C, n = 21; $P_{\text{Welch}} = .0227$). Surprisingly, this difference was not found in females (Control = 46.5 ± 0.23 °C, n = 12; VPA = 46.9 ± 0.21 °C, n = 16; $P_{\text{Welch}} = .2163$).

Because in ASD one hypothesis suggests that it is the way individuals face a painful situation that is modified, we decided to compare the nociceptive behavioral repertoire (**Figure 7F**) in traditional hot plate test. In juvenile animal, while in males no significant difference is observed on the whole repertoire (all types of responses: $P_{\text{Fisher}} = .3687$), a tendency is found in females (all types of responses: $P_{\text{Fisher}} = .0536$). This difference between control and VPA females' repertoire can be attributed to a difference in front vs hind paw responses (hind paw vs front paw responses: $P_{\text{Fisher}} = .0114$) (**Figure 7G**). Interestingly, in adult animals, a change in behavioral repertoire between controls and VPA is observed both in males (all types of responses: $P_{\text{Fisher}} = .0002$) and females (all types of responses: $P_{\text{Fisher}} = .0102$). These changes can be attributed to differences in types of hind paw responses in males (only hind paw responses: $P_{\text{Fisher}} < .0001$) and females (only hind paw responses: $P_{\text{Fisher}} = .0110$). More precisely, a difference between hind paw shaking and hind paw licking is observed in males (hind paw shaking vs hind paw licking: $P_{\text{Fisher}} < .0001$) and females (hind paw shaking vs hind paw licking: $P_{\text{Fisher}} = .0415$) (**Figure 7H**).

In conclusion, at an adult age only, both VPA exposed males and females display an increased latency for nociceptive response when subjected to nociceptive heat. Surprisingly, a higher nociceptive threshold was found in males only. Interestingly, nociceptive behavioral repertoire is modified in adult VPA animals with more hind paw licking and less hind paw shaking in VPA mice.

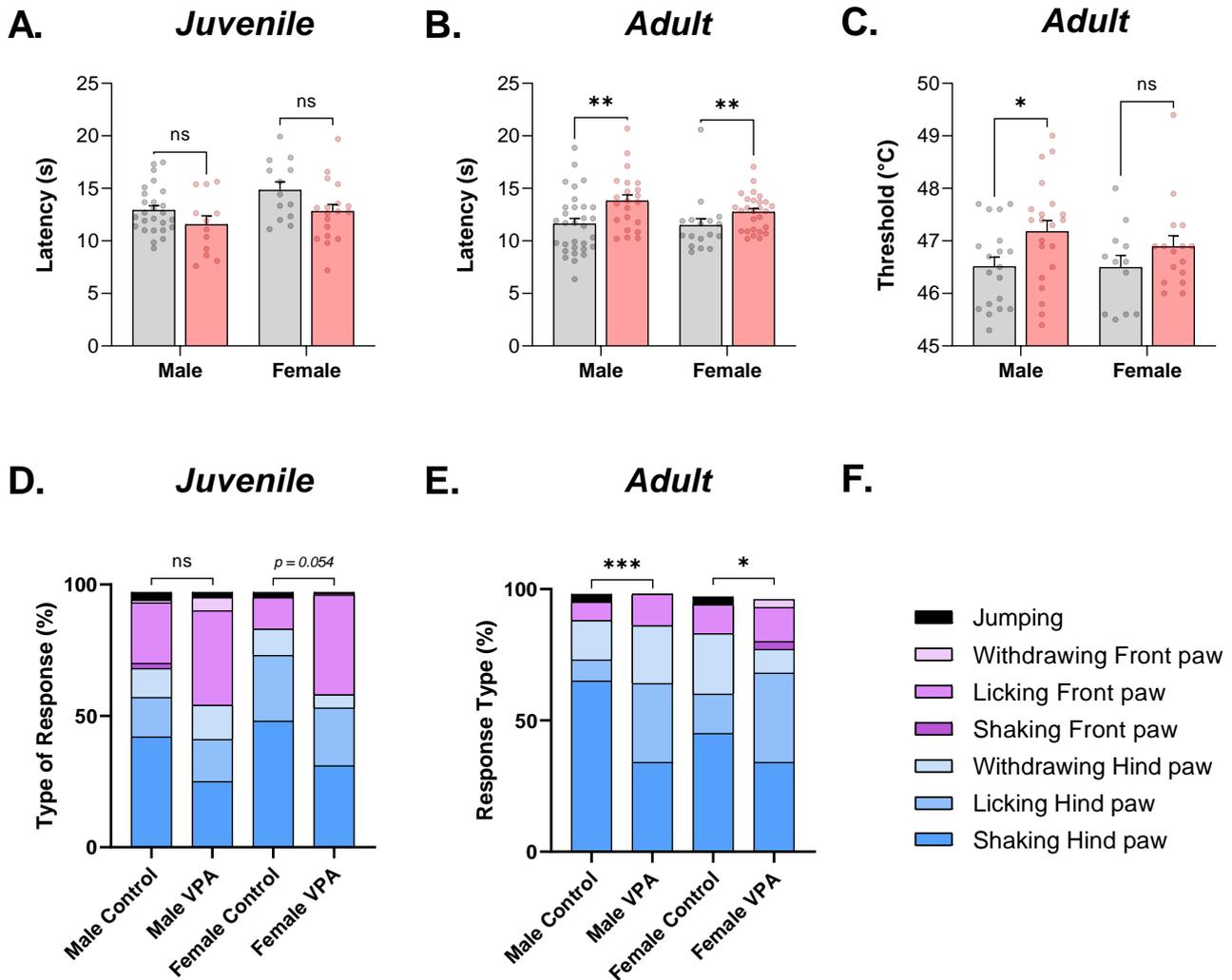


Figure 7. VPA induced decrease in nociceptive heat sensitivity is accompanied by changes in behavioral repertoire. Nociceptive heat sensitivity measured using 52°C traditional hot plate test shows no difference at juvenile age (A) but a higher latency for first nociceptive response in VPA males and females at an adult age (B). Nociceptive heat threshold measured at adult age using 30-52°C increasing hot plate test (10°C/min) shows a higher threshold in VPA males compared to controls (C). Behavioral repertoire in traditional hot plate test show tendency in VPA female attributing to a shift in front versus hind paw responses (D). Behavioral repertoire in traditional hot plate test show difference in VPA males and females attributing to a shift in hind paw licking versus shaking responses (E). Legend of behavioral repertoire characterized by the different types of nociceptive responses observed in hot plate test (F). Data are expressed as mean ± SEM or as percentage for proportions, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns: not significant).

VPA decreases response to capsaicin- and formalin-induced nociception in adult males.

We finally conducted experimental models of acute pain with intra-plantar injection of capsaicin or formalin and observation nociceptive licking behavior directed toward the injected paw. Regarding capsaicin test, no significant difference is found between VPA and control group at a juvenile age, neither in males (Control = 38.6 ± 5.1 s, $n = 12$; VPA = 43.1 ± 4.9 s, $n = 10$; $P_{\text{Welch}} = .5214$) nor in females (Control = 43.5 ± 5.2 s, $n = 10$; VPA = 38.8 ± 3.3 s, $n = 9$; $P_{\text{Welch}} = .4579$) (**Figure 8A**). However, in adult animals, while no difference is observed in females (Control = 59.7 ± 5.4 s, $n = 11$; VPA = 50.3 ± 4.1 s, $n = 18$; $P_{\text{Welch}} = .2038$), VPA males show a lower licking time compared to controls (Control = 77.4 ± 5.2 s, $n = 31$; VPA = 46.0 ± 3.6 s, $n = 24$; $P_{\text{Welch}} < .0001$) (**Figure 8B and 8C**).

To specify this latter result in adult mice, we injected formalin. Importantly, the behavioral response is usually composed of three phases with different underlying cellular and molecular mechanisms³³⁴(**Figure 8D and 8E**). We observed no significant difference for the early phase (0-5min) in males (Control = 48.9 ± 4.4 s, $n = 8$; VPA = 44.5 ± 5.4 s, $n = 10$; $P_{\text{Welch}} = .5413$) or females (Control = 44.1 ± 8.5 s, $n = 13$; VPA = 65.1 ± 6.4 s, $n = 9$; $P_{\text{Welch}} = .1191$) (**Figure 8F**) as well as for the intermediate phase in males (Control = 2.4 ± 2.0 s, $n = 8$; VPA = 1.6 ± 0.7 s, $n = 10$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .6339$) and females (Control = 1.5 ± 1.1 s, $n = 11$; VPA = 2.1 ± 1.3 s, $n = 10$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .8086$) (**Figure 8G**). However, regarding the late phase (10-45min), a lower time spent liking paw was found in VPA compared to controls in males (Control = 109.7 ± 13.8 s, $n = 8$; VPA = 69.3 ± 13.8 s, $n = 10$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0343$) but not in females (Control = 192.8 ± 24.5 s, $n = 11$; VPA = 166.0 ± 40.6 s, $n = 9$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .6556$) (**Figure 8H**).

In conclusion, only adult CD1 males exposed to VPA show decreased response to capsaicin and late phase formalin.

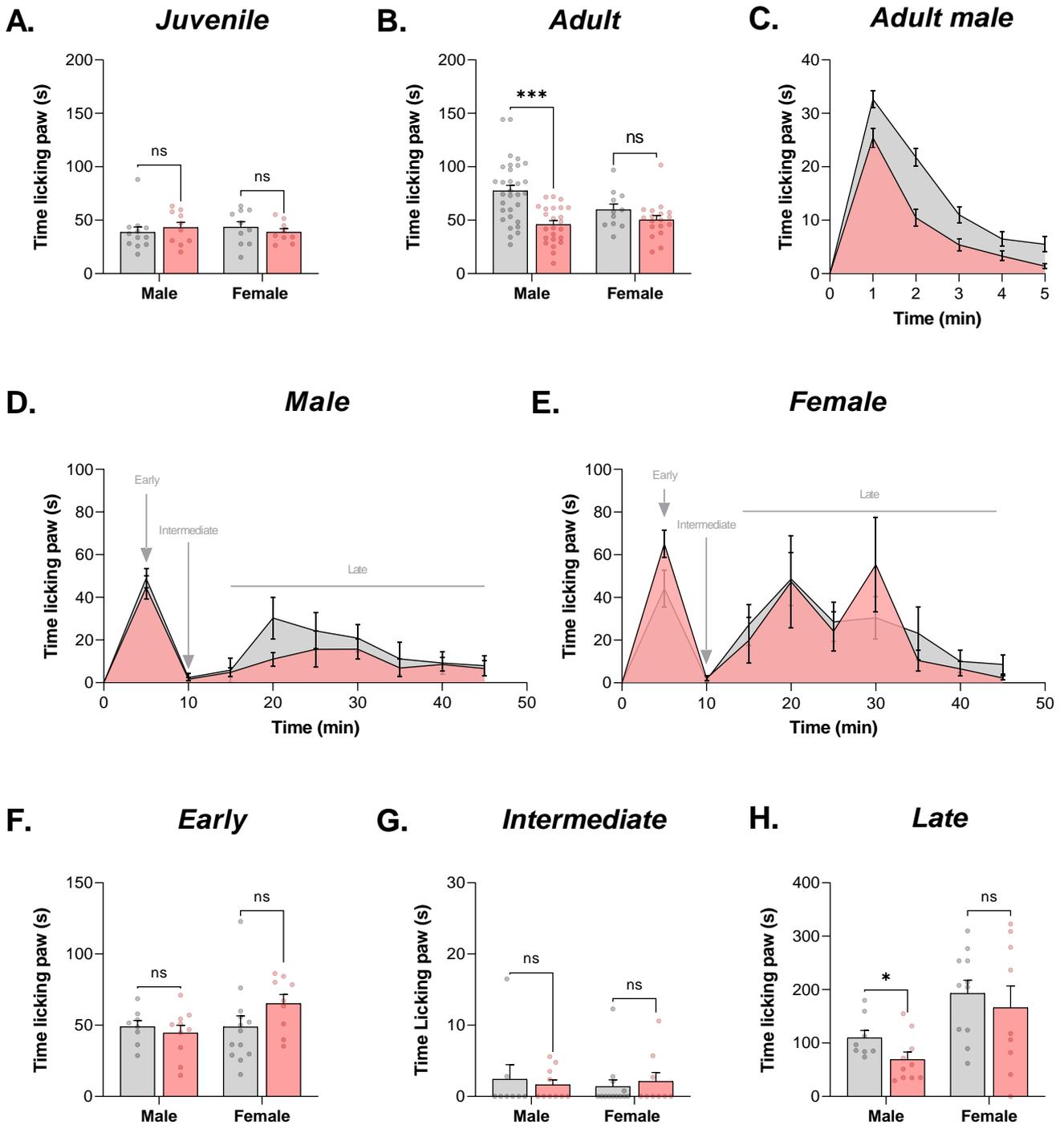


Figure 8. VPA adult males show decreased response to capsaicin and formalin pain model.

Intra plantar injection of capsaicin ($1\mu\text{g}/\text{paw}$) induces licking behavior directed toward injected paw quantified here over a 5 min period. No difference in total paw licking behavior is observed at juvenile age (A) but a diminished response is found in adult VPA males (B) illustrated over time in (C). Intra plantar injection of formalin (2%) induces licking behavior directed toward injected paw quantified here over a 45min period in adult mice. Usual response consists of three phases, an early one (0-5min) representing direct activation of primary afferents, an intermediate one (5-10min) reflecting active inhibition by internal pain controls and a late one (10-45min) influenced by central sensitization mechanisms. Licking behavior across time is shown in males (D) and females (E). No difference was observed for early phase (F) and intermediate phase (G). Late phase was decreased in VPA males compared to controls (H). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

Nociception correlates with some ASD-like behavior in VPA animals.

Because some studies in human found that sensitivity to thermal stimuli correlated with autism parameters^{133,214}, we decided to check for correlations, using linear regressions, between ASD-like and nociceptive behaviors. Interestingly, we found a correlation between latency to respond in hot plate test and sociability index in three chambers test in adult males (Control: $R^2 = .1673$, $P_{LR} = .0380$; VPA: $R^2 = .3557$, $P_{LR} = .0407$) (**Figure 9A**). Surprisingly, in adult females we also found this correlation in VPA animals but not in control (Control: $R^2 = .0182$, $P_{LR} = .6606$; VPA: $R^2 = .2634$, $P_{LR} = .0294$) (**Figure 9B**). We confirmed this observation in adult males finding a correlation between the temperature of response in the incremental hot plate test and the number of pursuits initiated in the direct social interaction test (Control: $R^2 = .1978$, $P_{LR} = .2304$; VPA: $R^2 = .3165$, $P_{LR} = .0187$) (**Figure 9C**). Finally, our study found a correlation between the latency to eat pellet in the buried food test and the response to capsaicin in adult males VPA (Control: $R^2 = .0422$, $P_{LR} = .3470$; VPA: $R^2 = .4300$, $P_{LR} = .0206$) (**Figure 9D**).

Thus, this study provides evidence of an association between ASD-like behaviors and nociceptive reactivity, especially in VPA adult males. Indeed, the less sociability, the less they respond to nociceptive situations.

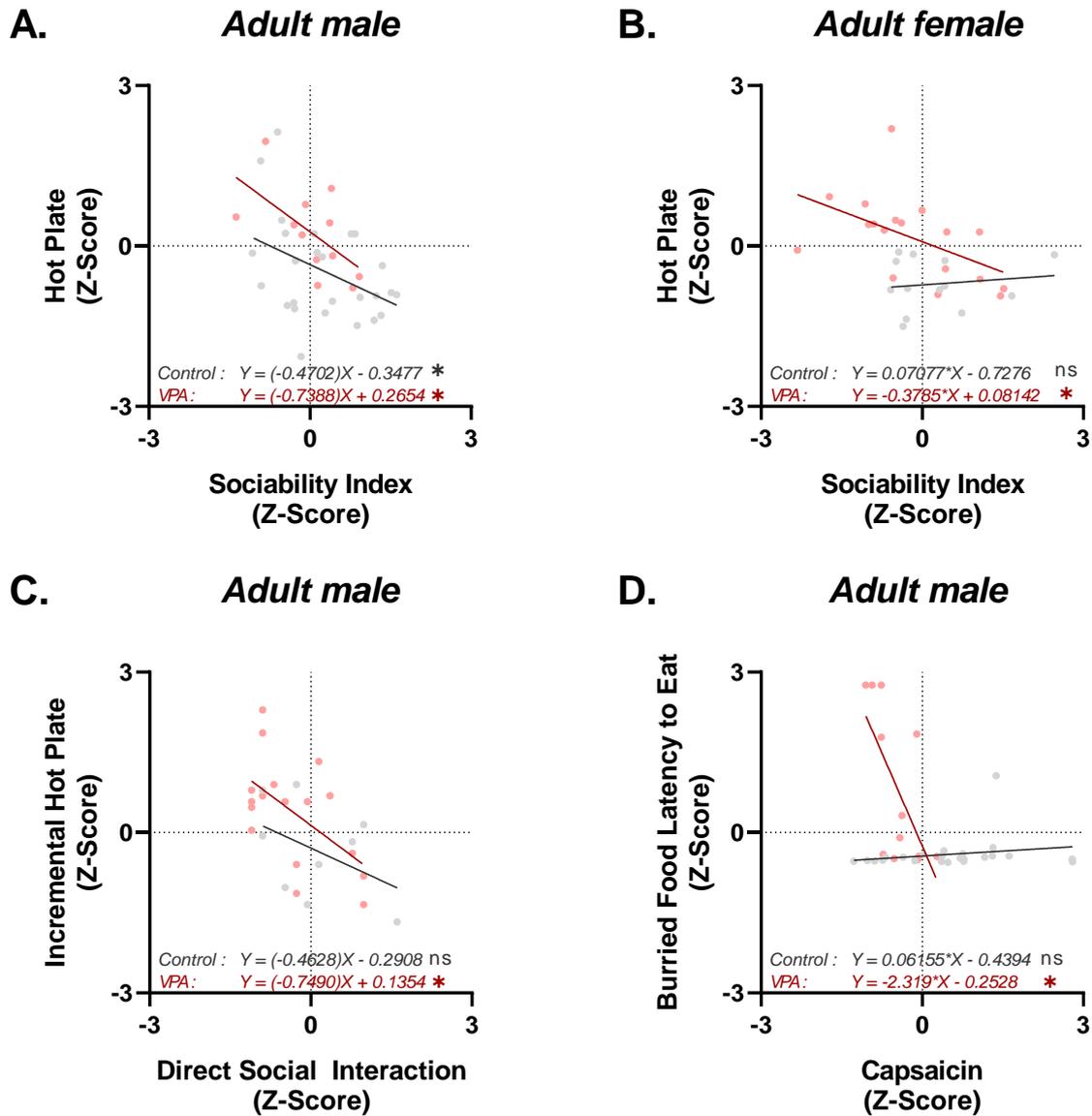


Figure 9. ASD-like phenotype correlated with nociceptive behavior in VPA adult males.

Linear regression in males between normalized latency to respond in 52°C hot plate test and sociability index from three chambers test. Negative correlation is found in both group with a shift for adult VPA males who display higher hot plate latencies (A). Linear regression in females between normalized latency to respond in 52°C hot plate test and sociability index from three chambers test. Negative correlation is found in adult VPA females only (B). Linear regression in males between normalized temperature of response in incremental hot plate test and number of pursuits initiated in direct social interaction test. Negative correlation is found in VPA males (C). Linear regression in males between normalized latency to eat pellet in buried food test and time licking paw in capsaicin test. Negative correlation is found in VPA males (D). Data are expressed as scatter with each point representing an animal. Saline injected groups (control) are represented in grey whereas valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

VPA changes calcium dynamic of cultured dorsal root ganglia neurons in response to capsaicin.

Given results from behavioral experiments, we decided to focus on a nociceptive heat sensitive population of DRG neurons, activated by capsaicin, a *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) agonist. We conducted calcium imaging experiments on cultured lumbar DRG neurons derived from adult animals. We made sure that cells were responding with a calcium increase to a high potassium induced depolarization as a criterion to only consider neurons and then applied capsaicin (**Figure 10A and 10B**).

First, combining all our experiments ($n_{\text{males}} = 4$, $n_{\text{females}} = 3$), the proportion of neurons responding to capsaicin (*caps+*) was found to be significantly different in males (Control = 28.7%; VPA = 44.9%; $P_{\text{Fisher}} = .0345$) but not in females (Control = 33.8%; VPA = 27.7%, $P_{\text{Fisher}} = .2432$) (**Figure 10C**).

However, peak amplitude of calcium response is not significantly different in males (Control = 0.33 ± 0.04 $F_{350/380}$, $n = 29$; VPA = 0.41 ± 0.05 $F_{350/380}$, $n = 31$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .3241$) or in females (Control = 0.41 ± 0.09 $F_{350/380}$, $n = 51$; VPA = 0.20 ± 0.03 $F_{350/380}$, $n = 50$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .1264$) (**Figure 10D**).

Interestingly, quantifying the return from the peak 100 seconds after capsaicin application revealed significant difference. Indeed, return from peak is more important in VPA compared to controls both in males (Control = $42.11 \pm 4.44\%$, $n = 29$; VPA = $64.20 \pm 5.45\%$, $n = 31$; $P_{\text{Wilcoxon}} = .0049$) and in females (Control = $35.85 \pm 4.13\%$, $n = 51$; VPA = $77.14 \pm 7.62\%$, $n = 50$; $P_{\text{Wilcoxon}} < .0001$) (**Figure 10E**).

Thus, a higher proportion on neurons are responding to capsaicin in VPA males' derived cultures. However, the peak amplitude of the response itself is not different in all conditions. More importantly, after capsaicin application, VPA males and females derived neuron show a higher return from peak compared to their respective controls.

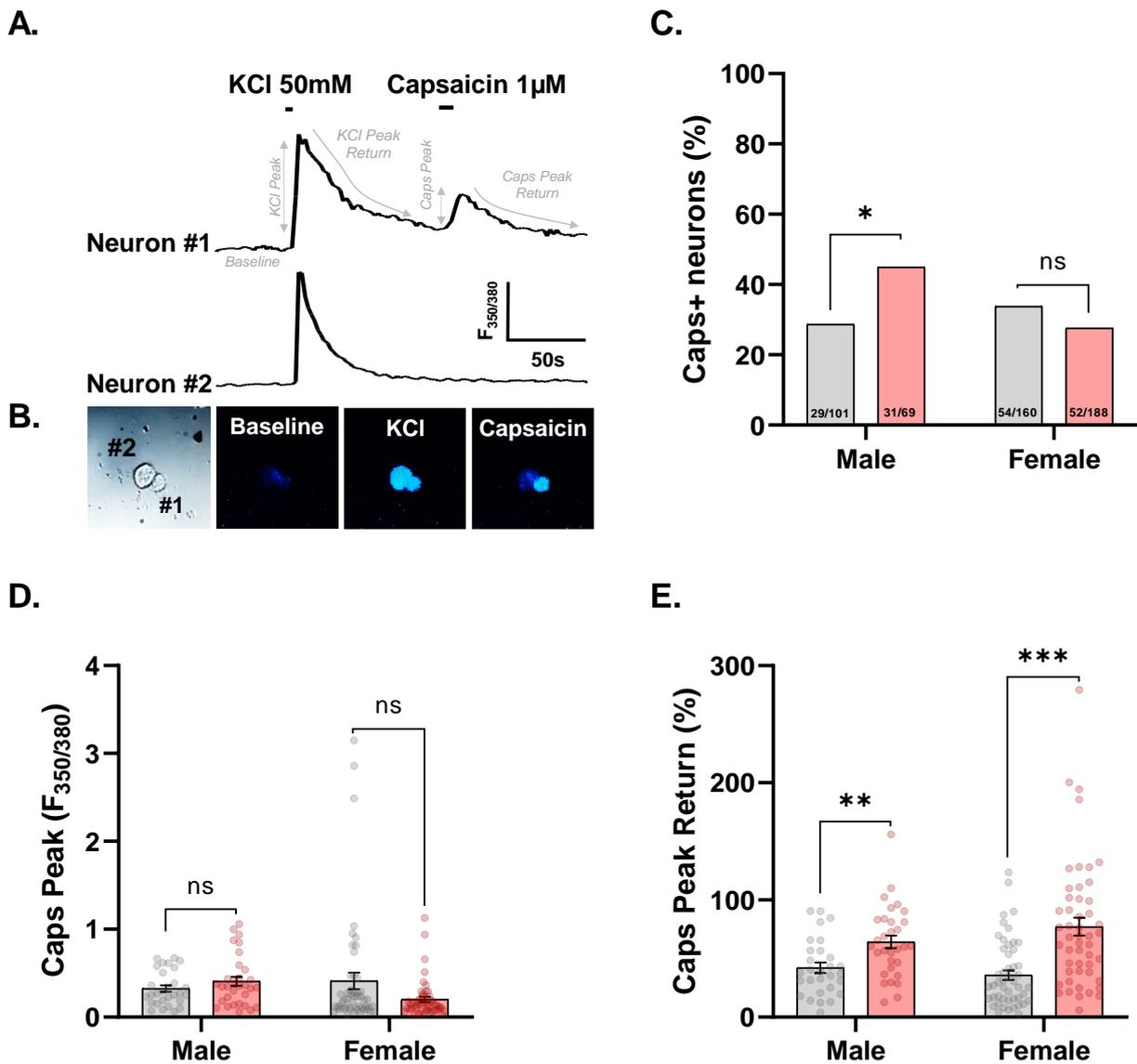


Figure 10. VPA induced changes in DRG neurons calcium dynamic in response to capsaicin.

Representative traces of fluorescence ratio ($F_{350/380}$) across time of cultured DRG neurons responding to high potassium (50mM) and capsaicin (1 μ M) and parameters analyzed (baseline, peak response and return from peak) (A). Cell #1 responds to both potassium and capsaicin whereas cell #2 only to potassium. Corresponding images of cells is shown in (B). Percentage of neurons responding to capsaicin shows an increase in VPA male derived neurons (C). Peak amplitude of calcium response shows no significant difference (D). Percentage of peak return measured 100s after application ($(F_{Peak} - F_{100s \text{ post application}}) / \text{Peak Amplitude}$) shows a higher return in VPA animals both male and female (E). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents a neuron. Data from saline injected animals (control) are represented in grey whereas from valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA changes intracellular calcium dynamic of cultured dorsal root ganglia neurons in response to high potassium.

Given changes in calcium dynamics following capsaicin application, we decided to analyze basal fluorescence and response to high-potassium induced depolarization separately in capsaicin responsive (Caps+) and capsaicin unresponsive (Caps-) neurons.

Interestingly, basal fluorescence ratio, reflecting free calcium content in the cytosol, is found to be higher in males. This is observed both in Caps+ (Control = 1.00 ± 0.03 $F_{350/380}$, n = 29; VPA = 1.19 ± 0.07 $F_{350/380}$, n = 31; $P_{Wilcoxon} = .0421$) (**Figure 11A**) and Caps- neurons (Control = 1.02 ± 0.03 $F_{350/380}$, n = 72; VPA = 1.11 ± 0.04 $F_{350/380}$, n = 38; $P_{Wilcoxon} = .0361$) (**Figure 11B**). Surprisingly, this difference was not found in females, neither in Caps+ (Control = 0.87 ± 0.04 $F_{350/380}$, n = 54; VPA = 0.89 ± 0.04 $F_{350/380}$, n = 52; $P_{Wilcoxon} = .7353$) nor Caps- neurons (Control = 0.88 ± 0.01 $F_{350/380}$, n = 106; VPA = 0.87 ± 0.02 $F_{350/380}$, n = 136; $P_{Wilcoxon} = .0701$).

Moreover, following high-potassium application, calcium response amplitude is found to be higher in VPA males' derived neurons than controls'. This is observed both in Caps+ (Control = 0.23 ± 0.03 $F_{350/380}$, n = 29; VPA = 0.41 ± 0.06 $F_{350/380}$, n = 31; $P_{Wilcoxon} = .0504$) (**Figure 11C**) and in Caps- (Control = 0.27 ± 0.02 $F_{350/380}$, n = 72; VPA = 0.66 ± 0.07 $F_{350/380}$, n = 38; $P_{Wilcoxon} < .0001$) (**Figure 11D**). In females, results are more variable with no difference being found in Caps+ neurons (Control = 0.48 ± 0.10 $F_{350/380}$, n = 54; VPA = 0.29 ± 0.04 $F_{350/380}$, n = 52; $P_{Wilcoxon} = .7500$) but one in Caps- neurons (Control = 0.35 ± 0.05 $F_{350/380}$, n = 106; VPA = 0.35 ± 0.02 $F_{350/380}$, n = 136; $P_{Wilcoxon} = .0012$). Importantly, given the proximity of the mean between these two groups, this latter effect can probably be interpreted in a change in the distribution of Caps- neurons' response amplitude to potassium, detected using non-parametric hypothesis testing.

Interestingly, quantifying the return from the peak 100 seconds after application does not reveal any significant difference in calcium dynamic of Caps+ neurons derived from males (Control = $100.04 \pm 2.95\%$, n = 29; VPA = $99.18 \pm 6.55\%$, n = 31; $P_{Wilcoxon} = .4187$) or females (Control = $91.82 \pm 3.46\%$, n = 53; VPA = $88.44 \pm 4.2\%$, n = 52; $P_{Wilcoxon} = .3544$). However, a tendency is observed for male Caps- neurons which peak return is found to be less important in the VPA condition compared to control one (Control = $93.80 \pm 2.72\%$, n = 72; VPA = $88.27 \pm 2.69\%$, n = 38; $P_{Wilcoxon} = .0540$). This latter tendency is not observed in females (Control = $92.36 \pm 1.97\%$, n = 102; VPA = $92.50 \pm 1.60\%$, n = 136; $P_{Wilcoxon} = .9371$).

Thus, VPA male's derived DRG neurons show a higher basal fluorescence, reflecting free calcium in the cytosol, independently of their capsaicin sensitivity. They also show a higher response amplitude to high potassium induced depolarization.

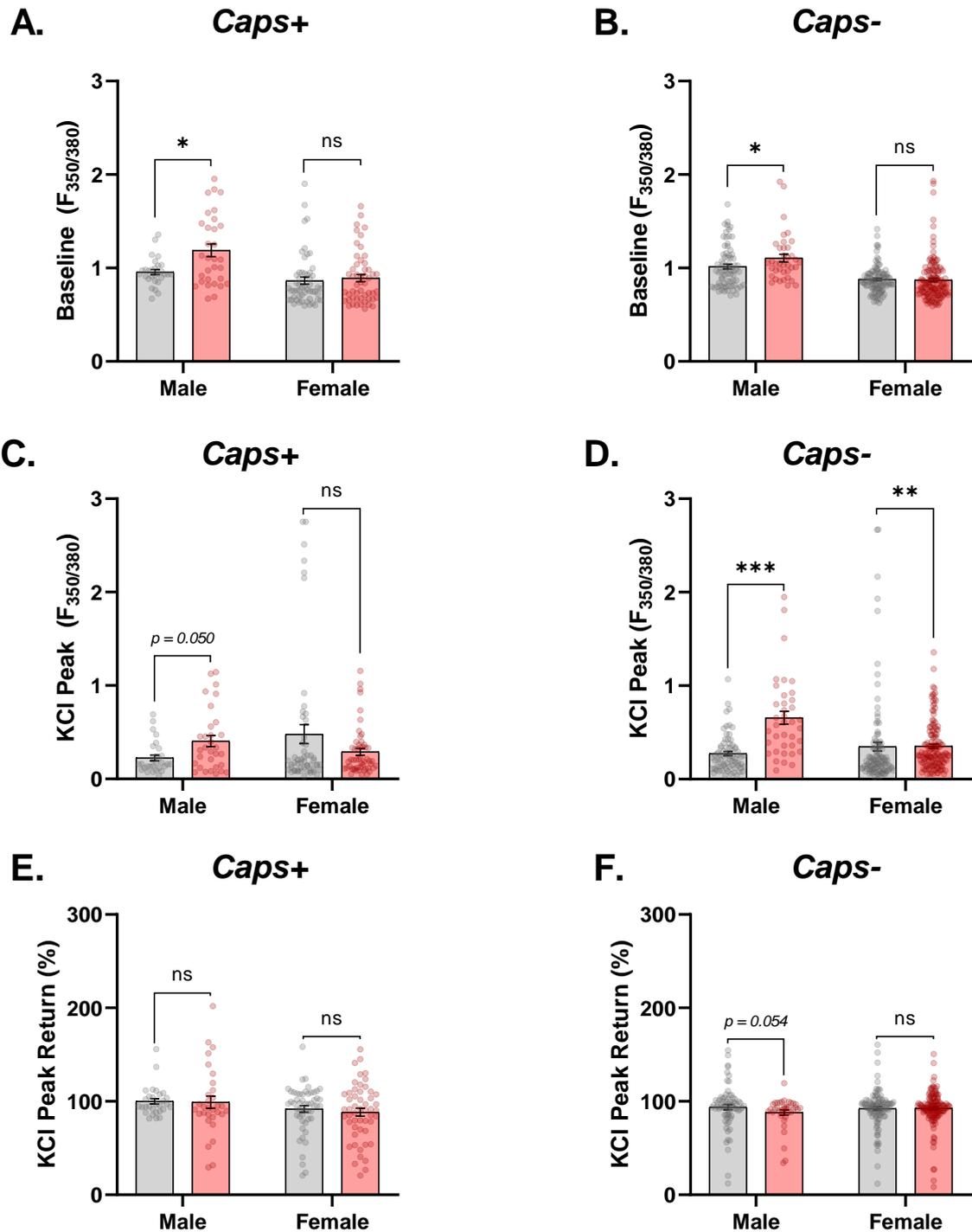


Figure 11. VPA induces changes in calcium dynamic of DRG neurons in response to potassium.

Baseline fluorescence ratio ($F_{350/380}$) of capsaicin responsive (caps+) (A) and capsaicin unresponsive (caps-) (B) cultured DRG neurons, show increased cytosol free calcium content in VMA males' neurons. Peak amplitude of calcium response shows significant difference in caps+ (C) and caps- (D) neurons. Percentage of peak return measured 100s after application ($(F_{Peak} - F_{100s \text{ post application}}) / \text{Peak Amplitude}$) shows no difference in caps+ neurons (E) but a tendency to lower return in VPA male caps- neurons (F). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents a neuron. Data from saline injected animals (control) are represented in grey whereas from valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA does not change neurotransmitters concentration in adult dorsal horn of the spinal cord.

Because changes in neurotransmitters concentration have been described in human ASD and in rodent models²⁷⁰, we quantified glutamate, GABA, glycine in the dorsal horn of the spinal cord using LC-MS/MS.

First, we observed no difference in glutamate content in males (Control = 90.86 ± 10.85 nmoles/mg, n = 11; VPA = 79.42 ± 55.93 nmoles/mg, n = 11; $P_{\text{Wilcoxon}} = .5619$) and females (Control = 74.98 ± 14.90 nmoles/mg, n = 7; VPA = 70.55 ± 67.09 nmoles/mg, n = 7; $P_{\text{Wilcoxon}} = .8048$) (**Figure 12A**).

Second, no difference in GABA content is found in males (Control = 54.75 ± 7.72 nmoles/mg, n = 11; VPA = 55.68 ± 6.69 nmoles/mg, n = 11; $P_{\text{Wilcoxon}} = .8977$) or in females (Control = 43.25 ± 7.31 nmoles/mg, n = 7; VPA = 45.80 ± 3.89 nmoles/mg, n = 7; $P_{\text{Wilcoxon}} = .3829$) (**Figure 12B**).

Third, glycine content is not observed to be different in males (Control = 82.19 ± 11.60 nmoles/mg, n = 11; VPA = 83.19 ± 10.28 nmoles/mg, n = 11; $P_{\text{Wilcoxon}} = .6063$) or females (Control = 60.55 ± 11.25 nmoles/mg, n = 7; VPA = 60.16 ± 6.10 nmoles/mg, n = 7; $P_{\text{Wilcoxon}} = .6200$) (**Figure 12C**).

Finally, we quantified neurotransmitters specifically coming from supra-spinal structures and implicated in descending controls like noradrenaline and serotonin¹⁵⁵.

Interestingly, no difference in noradrenaline content is observed in males (Control = 95.63 ± 10.84 pmoles/mg, n = 11; VPA = 75.02 ± 6.42 pmoles/mg, n = 11; $P_{\text{Wilcoxon}} = .2426$) and females (Control = 69.71 ± 14.04 pmoles/mg, n = 7; VPA = 64.12 ± 6.73 pmoles/mg, n = 7; $P_{\text{Wilcoxon}} > .9999$) (**Figure 12D**).

Similarly, serotonin content is found to be similar in VPA compared to controls, both in males (Control = 407.29 ± 48.52 pmoles/mg, n = 11; VPA = 350.18 ± 49.18 pmoles/mg, n = 11; $P_{\text{Wilcoxon}} = .3316$) and females (Control = 344.74 ± 95.11 pmoles/mg, n = 7; VPA = 277.28 ± 18.60 pmoles/mg, n = 7; $P_{\text{Wilcoxon}} = .8048$) (**Figure 12E**).

Thus, we observed no change in VPA animal's derived dorsal horn of the spinal cord neurotransmitters content.

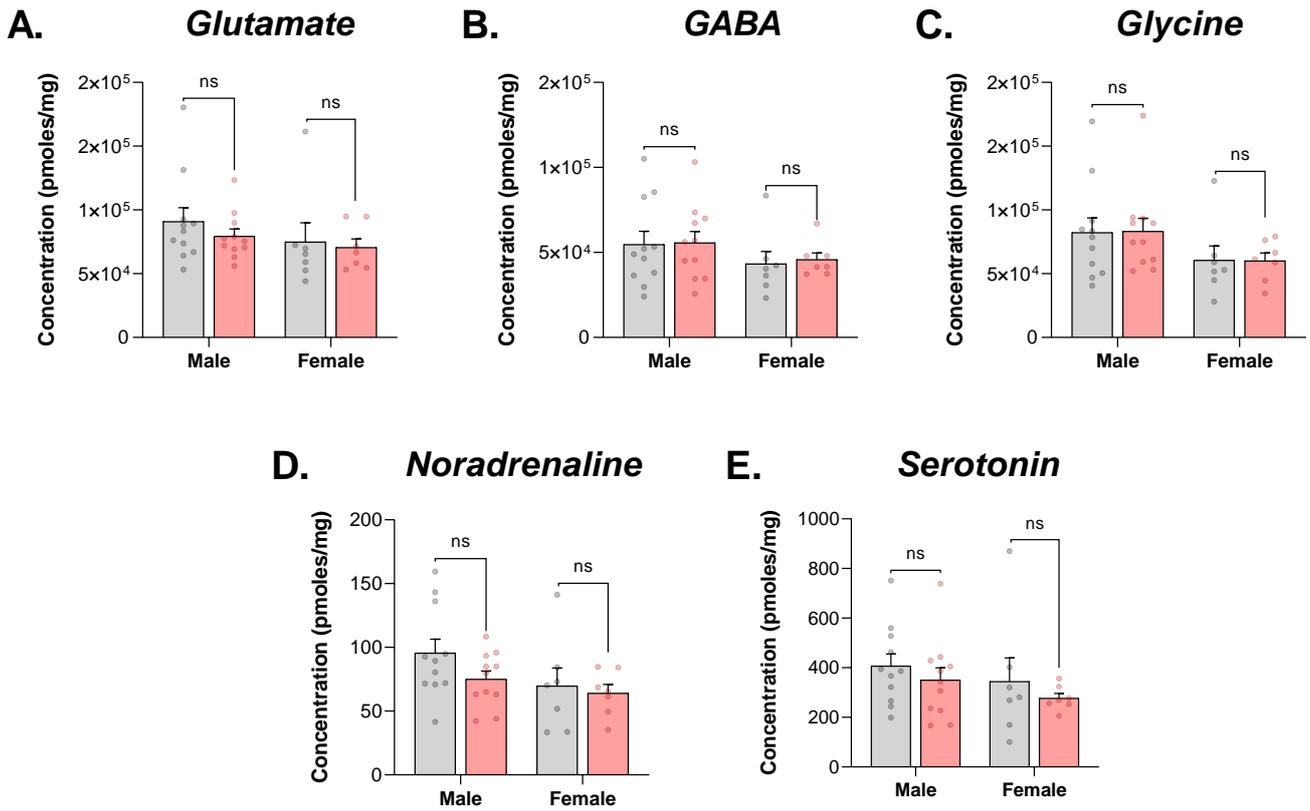


Figure 12. Neurotransmitter content in the dorsal horn of spinal cord.

LC-MS/MS quantification of Glutamate (A), GABA (B), and Glycine (C) in homogenized dorsal horn 400 μ m thick slices. Quantification of descending control related neurotransmitter noradrenaline (D) and serotonin (E). Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal. Data from saline injected animals (control) are represented in grey whereas from valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA alters synaptic activity in dorsal horn of spinal lamina II neurons.

We recorded spontaneous synaptic activity in lamina II dorsal horn neurons (**Figure 10A**) using whole cell configuration. Potential was set sequentially at -70 mV to record spontaneous excitatory post synaptic current (sEPSCs) and at 0 mV to record spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sIPSCs) (**Figure 10B**). We decided to analyze events in terms of distribution but individual cells as well as mean frequency and amplitude are shown for illustration (**Figure 10C, 10E, 10G, and 10I**).

First, concerning sEPSCs, the distribution of inter-event interval is found to be significantly different between VPA and control conditions in both sexes (Males: $P_{K-S} < .0001$; Females: $P_{K-S} < .0001$). This difference in distribution can be explained by a lower inter-event interval illustrated by a significant difference in median in both males (Control_{median} = 0.20s, VPA_{median} = 0.38s; $P_{Mood} < .0001$) and females (Control_{median} = 0.27s, VPA_{median} = 0.41s; $P_{Mood} < .0001$) (**Figure 10D**).

Interestingly, sEPSCS amplitude distribution was also found to be different in both sexes (Males: $P_{K-S} < .0001$; Females: $P_{K-S} < .0001$), but with an opposite effect (**Figure 10F**). Indeed, while in males less high amplitude events are observed leading to a significant shift in median amplitude (Control_{median} = 11.97pA, VPA_{median} = 8.21 pA; $P_{Mood} < .0001$); in females more high-amplitude events are observed also significantly shifting the median amplitude (Control_{median} = 8.77 pA, VPA_{median} = 9.40 pA; $P_{Mood} < .0001$).

Second, regarding sIPSCs, the distribution or inter-event interval was found to be significantly different in both sexes (Males: $P_{K-S} < .0001$; Females: $P_{K-S} < .0001$). Surprisingly, this change in distribution in males is not accompanied by any shift in inter-event interval median (Control_{median} = 0.62s, VPA_{median} = 0.62s; $P_{Mood} = .8516$), implying more subtle changes in distribution tail. In females however, a significant increase in inter event interval median is observed (Control_{median} = 0.27s, VPA_{median} = 0.41s; $P_{Mood} < .0001$) (**Figure 10H**).

Similarly to excitatory currents, sIPSCS amplitude distribution was found to be different in both sexes (Males: $P_{K-S} < .0001$; Females: $P_{K-S} < .0001$) with less high amplitude events illustrated by a lower median amplitude in males (Control_{median} = 17.6 pA, VPA_{median} = 15.11 pA; $P_{Mood} < 0.001$) and in females (Control_{median} = 13.70 pA, VPA_{median} = 10.98 pA; $P_{Mood} = .0008$) (**Figure 10J**).

Regarding excitatory synaptic transmission, we observed a decrease in sEPSC frequency in VPA condition both in males and in females. In females only, this is also accompanied by a decrease of sIPSC amplitude. However, VPA males show less high-amplitude sEPSCs. Concerning inhibitory synaptic transmission, we observed a decrease of sIPSC frequency in females only. However, in VPA animals of both sexes, we observed a decrease in the number of high-amplitude sIPSCs.

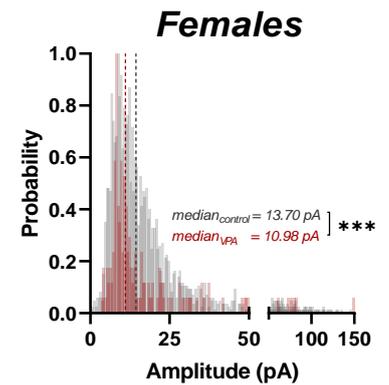
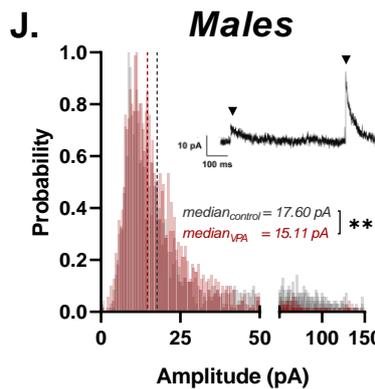
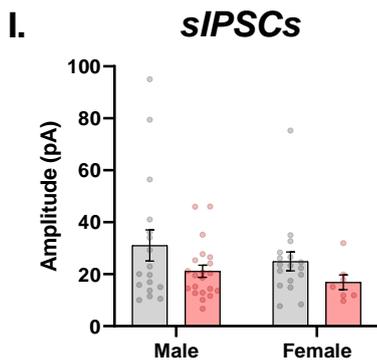
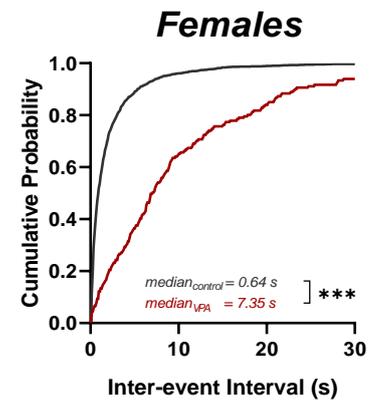
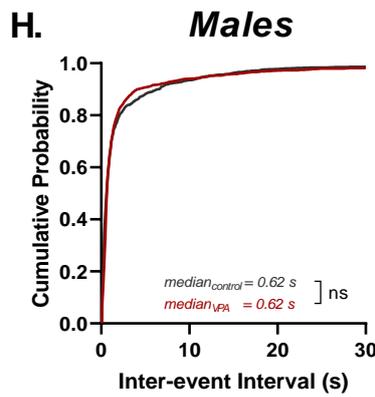
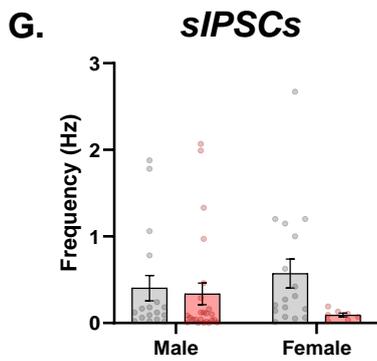
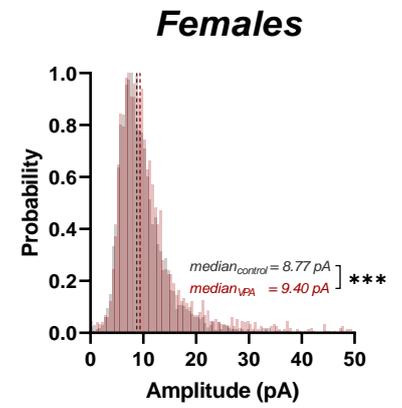
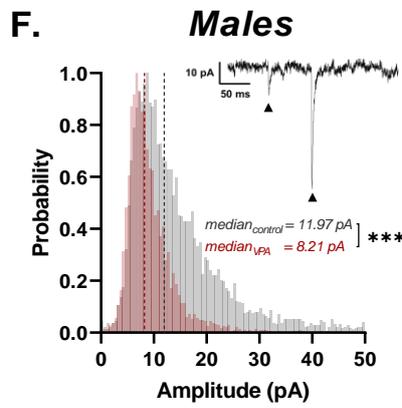
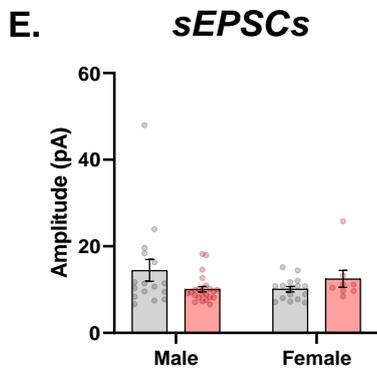
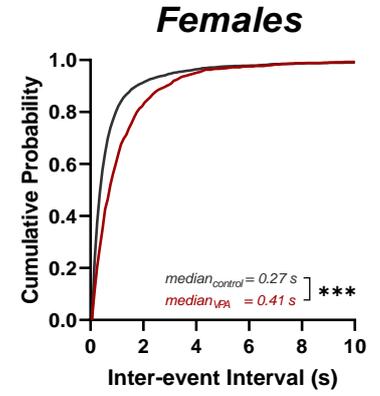
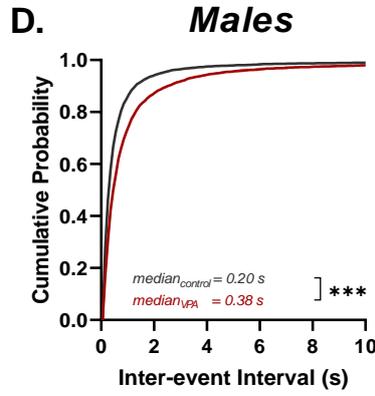
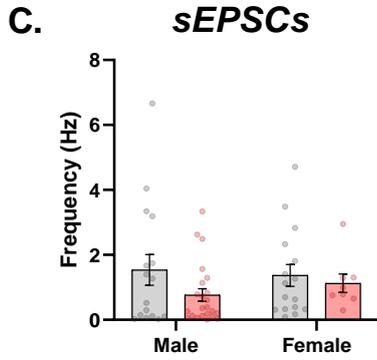
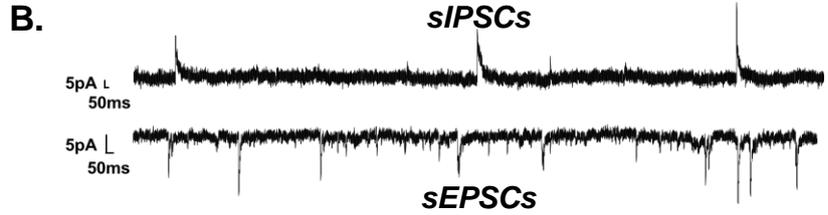
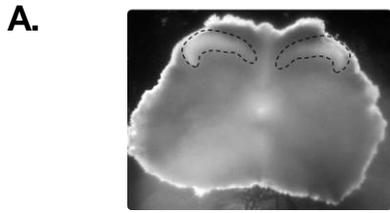


Figure 10. VPA modifies excitatory and inhibitory synaptic activity in lamina II neurons.

Patch-clamp recording in dorsal horn of the spinal cord lamina II, translucent crescent observed in contrast microscopy (A). Representative traces in a single cell of spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) recorded at -70mV and of inhibitory post-synaptic currents (sIPSCs) recorded at 0mV (B). Frequency of sEPSCs measured over a 5min time window expressed as mean \pm SEM, each point representing a cell (C). Inter-event interval cumulated distribution of all recorded cells shows decreased frequency in VPA males and females (D). Averaged amplitude of sEPSCs expressed as mean \pm SEM, each point representing a cell (E). Histogram distribution of all recorded cells shows diminution of number of high amplitude events in VPA males and an increased amplitude in females VPA. Trace illustrates two sEPSCs, one of small amplitude and one of big amplitude (F). Frequency of sIPSCs measured over a 5min time window expressed as mean \pm SEM, each point representing a cell (G). Inter-event interval cumulated distribution of all recorded cells shows decreased frequency in VPA females (H). Averaged amplitude of sIPSCs expressed as mean \pm SEM, each point representing a cell (I). Histogram distribution of all recorded cells shows diminution of number of high amplitude events in VPA males and females VPA. Trace illustrates two sIPSCs, one of small amplitude and one of big amplitude. Note the difference in kinetics, the first being most likely GABA and the second Glycine mediated. (J). Data from saline injected animals (control) are represented in grey whereas from valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

VPA does not change excitatory/inhibitory balance in the lamina II dorsal horn of spinal cord.

Following the observations of changes in excitatory and inhibitory synaptic activity parameters in the lamina II neurons, we wanted to evaluate if this was changing excitatory/inhibitory balance, important for nociceptive input filtering and integration in this structure¹⁴².

First, we calculated, the glutamate/GABA content ratio in the dorsal horn of the spinal cord. Interestingly, no difference in glutamate/GABA ratio is found in males (Control = 1.76 ± 0.10 , $n = 11$; VPA = 1.55 ± 0.13 , $n = 11$; $P_{\text{Welch}} = 0.2132$) or females (Control = 1.72 ± 0.06 , $n = 7$; VPA = 1.57 ± 0.15 , $n = 7$; $P_{\text{Welch}} = .3901$).

Then, we calculated the sum of PSCs area for each cell, considering potential changes in frequency, amplitude, and currents kinetics. Finally, in each cell we calculated the cumulated area sEPSC/sIPSCs ratio. This ratio is found not to be significantly different in males (Control = 2.58 ± 0.99 , $n = 16$; VPA = 2.09 ± 0.65 , $n = 20$; $p = .6711$) or in females (Control = 2.14 ± 0.71 , $n = 16$; VPA = 3.16 ± 0.97 , $n = 5$; $p = .1297$) (**Figure 10B**).

To conclude, even if some changes in excitatory and inhibitory synaptic activity are present in VPA male and female lamina II neurons compared to controls, it does not seem to change the excitatory/inhibitory balance under basal conditions.

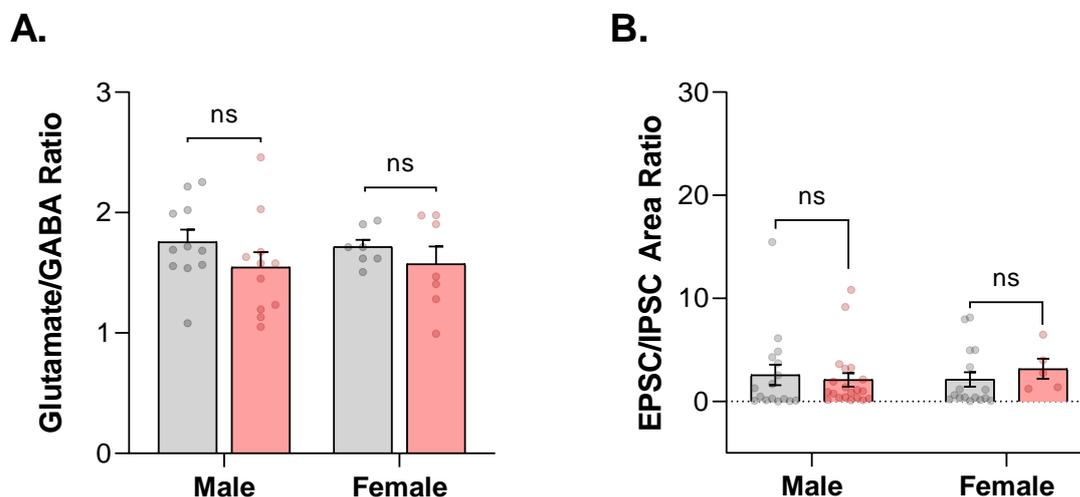


Figure 10. VPA does not alter excitatory/inhibitory balance in the dorsal horn of the spinal cord.

Concentration of Glutamate/GABA ratio as a reflect of excitatory/inhibitory balance shows no significant difference. Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents an animal (A). Ratio sEPSCs/sIPSCs of the sum of the area of all events observed in each demonstrates no apparent change excitatory/inhibitory balance. Data are expressed as mean \pm SEM, each point represents a cell. Data from saline injected animals (control) are represented in grey whereas from valproate injected ones (VPA) in red. Statistical significance is expressed with (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

Discussion

Not written yet, please refer to “Discussion” section hereafter.

Bibliography

Not written yet, please refer to “Bibliographie” section hereafter.

Note : Tous les résultats de ce manuscrit sont résumés dans deux tableaux ci-après, un pour les observations comportementales (**Table 7**) et un pour les résultats *ex-vivo* (**Table 8**). Des résultats complémentaires sont également présentés en annexe.

	Test	Paramètre	Aspect étudié	Age	Mâles VPA	Femelles VPA
Développement	Mesure du poids	Poids	Croissance	< S4	-	▼
				> S4	▼	▼
	Ouverture des yeux	Index d'ouverture des Yeux	Développement	P13	▼	-
	Reflexe de retournement	Latence de retournement	Développement sensori-moteur	P5	-	▼
Préférence d'odeur maternelle	Temps à renifler la sciure maternelle	Olfaction, motivation pour signaux maternels	P7	-	▼	
Comportements TSA-like	Trois chambres	Index de Sociabilité	Préférence sociale	S6	(▼)	-
		Temps de Toilettage	Comportements restreints/répétitifs		▲	-
		Distance parcourue	Locomotion		▼	▼
		Vitesse locomotrice	Locomotion		▼	▼
	Interaction sociale directe	# poursuites initiées	Sociabilité	S6	(▼)	-
	Toilettage induit par le sucrose	Temps de Toilettage	Comportements restreints/répétitifs	S7	-	-
	Nourriture enterrée	Latence pour déterrer la croquette	Olfaction	S7	▲	-
Latence pour manger la croquette		Motivation, Attention, Organisation de la pensée.	▲		-	
Evaluation du Système Somatosensoriel	Filaments de VonFrey	Seuil mécanique pour 50% de retrait de la patte	Seuil de sensibilité mécanique statique	S4	-	-
				S8	-	(▲)
	Coton tige	Probabilité de retrait de la patte	Sensibilité mécanique dynamique	S4	(▲)	-
				S8	-	-
	Plantar Froid	Latence de retrait de la patte	Sensibilité thermique au froid	S4	-	-
				S8	-	-
	Anneau de Gradient thermique	Température de préférence	Température de confort	S4	-	-
				S8	▲	-
	Température rectale	Température	Température corporelle	S4	-	-
				S8	▲	-
	Plaque chaude à 52°C	Latence de réponse	Sensibilité nociceptive au chaud	S4	-	-
				S8	▲	▲
Répertoire comportemental		Type de réponse à situation nociceptive	S4	-	(▲) Réponses pattes avant	
			S8	▲ Léchage pattes arrière	▲ Léchage pattes arrière	
Modèles de douleur aigue	Plaque chaude incrémentée	Température de réponse	Seuil de sensibilité nociceptive au chaud	S8	▲	-
	Injection intraplanaire de capsaïcine	Temps de léchage de la patte injectée	Activation des fibres TRPV1	S4	-	-
				S9	▼	-
	Injection intraplantaire de formaline	Temps de léchage de la patte injectée (0-5min)	Activation des fibres afférentes	S12	-	-
		Temps de léchage de la patte injectée (>5-10min)	Inhibition active par les contrôles de la douleur		-	-
Temps de léchage de la patte injectée (10-5min)		Sensibilisation centrale	▼		-	
Analyse	Corrélations	Index de sociabilité x Latence de retrait plaque chaude à 52°C	Corrélation comportement TSA-like x nociception	Adulte	Les moins sociaux sont les moins réactifs	Les moins sociaux sont les moins réactifs
		Interaction sociale directe x Plaque chaude incrémentée	Corrélation comportement TSA-like x nociception	Adulte	Les moins sociaux sont les moins sensibles	?
		Capsaïcine x Nourriture enterrée (manger)	Corrélation comportement TSA-like x nociception	Adulte	Les moins réactifs sont les plus atteints cognitivement	-
Variation du paramètre : ▲Augmentation significative ▼Diminution significative (▲) Tendance à une augmentation (▼) Tendance à une diminution - Non significatif						

Table 7. Récapitulatif des résultats comportementaux des animaux VPA par rapport à leurs contrôles respectifs

	Paramètre	Aspect étudié	Conditions	Mâles VPA	Femelles VPA
Imagerie du Calcium sur Neurones de Ganglions Rachidiens en Culture	Proportion de neurones répondant à la capsaïcine	Expression de TRPV1	Toutes cellules confondues	▲	-
	Amplitude réponse à la capsaïcine	Expression, fonctionnement de TRPV1	Caps+	-	-
	Retour de pic après capsaïcine	Tamponnage calcium	Caps+	▲	▲
	Ligne de base	Calcium libre intracellulaire en conditions basales	Caps+	▲	-
			Cap-	▲	-
	Amplitude réponse au potassium	Réponse à une dépolarisation	Caps+	(▲)	-
			Cap-	▲	▲*
Retour de pic après potassium	Tamponnage calcium	Caps+	-	-	
		Caps-	(▼)	-	
Dosage spectrométrie de masse	Glutamate	Neurotransmetteur exciteur	Corne dorsale	-	-
	GABA	Neurotransmetteur inhibiteur	Corne dorsale	-	-
	Glycine	Neurotransmetteur inhibiteur	Corne dorsale	-	-
	Noradrénaline	Contrôles descendants	Corne dorsale	-	-
	Sérotonine	Contrôles descendants	Corne dorsale	-	-
Patch clamp dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (lamina II)	Distribution des Intervalles inter-événement	Fréquence des sPSCs	sEPSCs	▼	▼
			sIPSCs	-	▼
	Distribution des Amplitudes	Amplitude des sPSCs	sEPSCs	▼	▲
			sIPSCs	▼	▼
Analyse	Ratio concentration GABA/Glutamate	Equilibre excitation/inhibition	Corne dorsale	-	-
	Ratio sEPSCs/sIPSCs de la Somme des ASC	Equilibre excitation/inhibition	Réseau de la Lamina II	-	-
Variation du paramètre : ▲Augmentation significative ▼Diminution significative (▲) Tendance à une augmentation (▼) Tendance à une diminution - Non significatif					

Table 8. Récapitulatif des résultats *ex-vivo* des animaux VPA par rapport à leurs contrôles respectifs

DISCUSSION

L'objectif général de notre étude était d'étudier la nociception dans le modèle murin d'exposition prénatale au valproate (VPA) aussi bien sur le plan comportemental que sur le plan du fonctionnement de certains acteurs du système nociceptif. Dans un premier temps nous avons voulu vérifier que le modèle VPA, utilisant une souche différente de celles traditionnellement utilisées, est un modèle de troubles du spectre autistes (TSA) présentant des isomorphies comportementales avec la pathologie humaine. Dans un second temps, nous avons évalué la sensibilité de ces animaux à différentes modalités somatosensorielles, avec un intérêt particulier pour la nociception. Finalement, nous avons souhaité explorer le fonctionnement de deux acteurs du système nociceptif, les neurones sensoriels des ganglions rachidiens (DRG) ainsi que le réseau de la corne dorsale de la moelle épinière (CDME).

Ces questions ont été abordées en utilisant une combinaison de tests comportementaux, d'imagerie du calcium libre intracellulaire sur des cultures de neurones de DRG, de dosages de neurotransmetteur dans la CDME par spectrométrie de masse ainsi que des enregistrements électrophysiologiques des neurones de la lamina II de la CDME.

Les résultats décrits ci-avant sont résumés dans des tableaux récapitulatifs pour les données comportementales (**Table 7**) et les procédures ex-vivo (**Table 8**).

Ils indiquent que les souris de souche CD1 exposées au VPA présentent des altérations développementales, une diminution de la sociabilité ainsi que des comportements restreints et répétitifs qui sont les symptômes principaux des TSA. De plus, nous avons aussi observé des altérations sensorielles olfactives, des troubles locomoteurs ainsi que cognitifs qui s'apparentent à des symptômes auxiliaires des TSA. Ces caractéristiques permettent de considérer le modèle VPA comme un modèle de TSA. Il est intéressant de préciser que la majorité des altérations que nous avons observées concernaient majoritairement les animaux mâles exposés au VPA, les animaux femelles étant moins affectés, reproduisant certaines différences de sexe observés dans les TSA. Les altérations somatosensorielles observées suggèrent une augmentation de la température de confort, une sensibilité nociceptive au chaud des animaux VPA diminuée ainsi qu'une hyposensibilité à différents modèles de douleur aiguë. Cependant, ces observations ne sont observées qu'à l'âge post-pubertaire et majoritairement chez les animaux mâles exposés au VPA.

Les neurones sensoriels d'animaux VPA montrent également élévation de calcium intracellulaire plus transitoire lors d'une stimulation par un agoniste des récepteurs TRPV1 nociceptifs au chaud. Finalement, Le réseau de la Lamina II de la CDME montre des modifications chez les animaux VPA de la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice, sans modification apparente de l'équilibre entre ces deux composantes.

Dans les paragraphes suivants, différents aspects du projet ainsi que des résultats obtenus sont discutés, mis en relation avec certains résultats complémentaires ou préliminaire ainsi qu'avec les données de la littérature.

I. L'EXPOSITION AU VPA CHEZ LA SOURIS CD1, UN BON MODELE DE TSA ?

Il est important de considérer que la majorité des études précédentes utilisant l'exposition prénatale au VPA comme modèle de TSA chez les rongeurs ont été réalisées chez le rat ou la souris C57BL/6 pour plusieurs raisons. Le rat est un animal naturellement sociable facile à utiliser pour les études comportementales et le modèle historique d'exposition au VPA dans la cadre des TSA. La souris C57BL/6 est une souche consanguine très sociable présentant une faible variabilité génétique et pour laquelle de nombreux mutants sont disponibles afin de préciser les mécanismes cellulaires pouvant conduire à des comportements autistiques. Le modèle VPA chez ces animaux est très bien caractérisé pour la présence de comportements *TSA-like*^{293,297,298,305}. Cependant, ils présentent certains biais, notamment la souris C57BL/6, dont la consanguinité ne reproduit pas la notion de spectre autistique retrouvé en clinique du fait d'une variabilité interindividuelle importante dans la population humaine et la mosaïque de symptômes observée dans les TSA. C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'utiliser une souche non-consanguine et génétiquement plus variable, la souris CD1³⁴¹. De ce fait, nous avons caractérisé à nouveau un certain nombre d'observations précédentes effectuées dans le modèle VPA afin de vérifier la validité du notre. Ces résultats sont discutés dans cette partie afin d'évaluer la pertinence de notre modèle par rapport à ce qui est décrit chez l'homme à travers la présence d'isomorphies comportementales.

1. Validé de construction, la toxicité d'une injection de VPA durant la grossesse

Le VPA a été démontré comme étant tératogène chez les humains²⁹⁶ et les rongeurs³⁴⁴. Notre étude observe une réduction du nombre de grossesses atteignant le terme. Ceci peut être expliqué par des phénomènes de résorption fœtale déjà décrit³⁴⁴. Cette observation est corroborée par la diminution du nombre de souriceaux dans chaque porté. De plus, le VPA entraîne l'apparition de problèmes développementaux qui peuvent être létaux de manière post-natale. Il est intéressant de remarquer que l'injection de VPA ne modifie pas la probabilité d'avoir des souriceaux mâles ou femelles, conformément à ce qui a été décrit précédemment chez la souris C57BL/6³⁴⁴.

2. Isomorphies comportementales avec les symptômes de TSA

2.1. Des altérations développementales

Nos résultats montrent un poids inférieur des animaux VPA par rapport aux contrôles, ce qui est cohérent avec les observations précédentes effectuées chez le rat^{297,323} et la souris³⁴⁵. Cependant, bien que cette différence soit présente dès la naissance chez les femelles, elle n'apparaît qu'après la puberté chez les mâles, ce qui contraste avec les observations précédentes dans une autre souche de souris³⁴⁵. Il est important de préciser que les animaux VPA ne présentent pas de retard de croissance, le décours de la courbe de prise de poids n'étant pas significativement différent entre les groupes témoin et VPA (données non présentées).

Nous avons observé un retard à l'ouverture des yeux chez les animaux VPA, consistant avec les études précédentes chez le rat et la souris^{297,345,346}. Cependant, ce retard n'est observé que chez les mâles à P13, ce qui contraste avec des observations faites chez la souris C57BL/6 pour laquelle, bien que plus marqué chez les mâles, les animaux des deux sexes présentaient ce retard³⁴⁶. Il est intéressant de remarquer qu'à P15, tous les animaux ont les deux yeux ouverts sauf les animaux VPA mâles, ce qui a déjà été observé précédemment chez la souris BALB/c³⁴⁵.

Nous avons évalué le développement sensori-moteur en observant le réflexe de retournement à P5 et avons constaté une latence significativement plus élevée chez les animaux VPA femelles. Ceci contraste avec ce qui a été observé précédemment puisque les animaux des deux sexes présentaient une latence plus élevée³⁴⁵. Cependant, dans leur étude, *Yang et collaborateurs* avaient observé que celle-ci n'était significative qu'à P9 pour les femelles et de P7 à P9 pour les mâles. Il est intéressant de remarquer que lors de la réalisation de ce test sur un lot d'animaux différent, nos résultats complémentaires montrent une augmentation de la latence chez les mâles à P7, P9 et P11 alors que seulement une tendance chez les femelles à P11 (**Annexe 2A et 2B**). Ceci est corroboré par une étude qui montrait que chez des souris CrlFcen:CF1 femelles exposées au VPA une différence dans le réflexe de retournement à P3 n'était plus significative à P7³⁴⁷. Ainsi, il semble que les altérations soient variables en fonction de la portée ainsi que de l'âge auquel les tests sont effectués. Il est à noter que ces altérations sensorimotrices ne sont pas observables dans tous les tests. Par exemple nous n'avons pas observé de différences entre VPA et contrôles dans le test de géotaxie négative (**Annexe 2C et 2D**).

Une diminution de la préférence pour les signaux d'origine maternelle a déjà été observée dans des modèles de TSA génétiques et environnementaux comme le modèle VPA^{323,348}. En utilisant le test de préférence pour l'odeur maternelle comme décrit précédemment, nous avons observé une diminution du temps passé à renifler la litière maternelle chez les femelles seulement, cohérent avec ce qui a été observé précédemment chez le rat³²³. En effet, dans l'étude de *White et collaborateurs*, un autre paramètre comme le nombre d'épisodes sur la sciure maternelle était modifié chez les mâles VPA, ce qui n'a pas été évalué dans cette étude. Il est cependant difficile de savoir si ces altérations sont dues à une préférence réduite pour des signaux familiaux maternels ou à une diminution de la discrimination olfactive qui est importante chez les rongeurs pour l'orientation spatiale, notamment lorsque le système visuel n'est pas encore

fonctionnel. En effet, plusieurs études décrivent une discrimination olfactive réduite chez les animaux VPA lors du développement^{349,350}.

Globalement, les animaux VPA présentent des **altérations développementales** mais celles-ci sont **différentes** en fonction du **sexe**. D'autres études décrivent des altérations développementales sexe-spécifiques chez des rats exposés au VPA avec par exemple chez les femelles des altérations sur le plan du développement physique alors que chez les mâles plutôt sur le plan du développement moteur³⁵¹. Cependant, dans notre étude, **la plupart des altérations concernent les femelles** ce qui contraste avec d'autres observations qui décrivaient un nombre d'altération plus important chez les mâles VPA^{350,352}.

2.2. Les symptômes principaux des TSA

Les observations comportementales les plus courantes pour la validation d'un modèle de TSA sont une diminution de la sociabilité ainsi que la présence de comportement restreint et/ou répétitifs²⁸⁷.

2.2.1. Sociabilité

Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour évaluer cet aspect. Premièrement, le test des trois chambres, le plus utilisé pour évaluer la sociabilité chez les rongeurs³⁵³. Dans nos expériences nous avons évalué la préférence sociale d'un animal pour un congénère par rapport à un objet neutre et observé une diminution de l'index de sociabilité chez les mâles VPA, ce qui est cohérent avec une diminution de préférence sociale décrite dans des études antérieures^{303,305,346,349,354}. De plus, nous avons également utilisé un test d'interaction sociale directe et observé une diminution du nombre de poursuites initiées par les animaux VPA mâles. Ceci démontre une diminution de la motivation à initier des contacts sociaux. Il est important de noter que nous avons aussi observé une faible proportion d'animaux agressifs chez les mâles VPA, comparable à celle décrite dans la littérature³⁵⁵.

De manière intéressante, ces **altérations de la sociabilité** ne sont observées **que chez les animaux mâles**. Cette observation est en accord avec ce qui a été précédemment décrit chez le rat^{349,350,356,357} et la souris^{346,347}. De plus, chez les femelles contrôle et VPA ; nous observons une préférence sociale faible. Ceci entre en contradiction avec la plupart des études qui retrouvent une sociabilité similaire entre mâles et femelles^{358,359} mais des différences similaires aux nôtres ont déjà été observées chez le rat^{307,349,360}.

2.2.2. Comportements restreint et/ou répétitifs

La présence de comportement restreint et répétitifs est souvent évaluée dans les modèles de TSA en utilisant le toilettage spontané³⁴³. Dans notre étude, nous observons une **augmentation du toilettage spontané** chez les animaux VPA **mâles**, ce qui est cohérents avec les observations faites précédemment^{303,346,354}. Cependant, de manière similaire à la sociabilité, ceci n'est pas observé chez les femelles. D'autres études rapportent ce résultat bien que certaines observent cette différence dans les deux sexes^{346,357,359}. Cependant, il est important de relativiser ce résultat. En effet, lors de la quantification du toilettage spontané dans un bécher sur une période

de 5 minutes, aucune différence n'a été observée (**Annexe 3C**). Ainsi il semble que cela dépende du contexte et de la durée d'observation des animaux.

Notre étude a voulu observer si cette augmentation du toilettage pouvait être induite en utilisant une pulvérisation d'eau sucrée sur le pelage de l'animal comme décrit précédemment³²⁷. De manière intéressante, nous n'avons pas observé de différence dans le toilettage induit, ce qui suggère que le toilettage augmenté n'a pas vraiment pour but de nettoyer le pelage mais s'apparente plus à un comportement restreint ou répétitif.

De plus, le toilettage chez le rongeur est fréquemment réalisé selon une séquence précise et dure plusieurs secondes voire minutes. Il existe cependant des petits toilettages rapides, qui ne suivent pas de séquence complète, n'ont pas forcément pour but un nettoyage et ont été suggérés comme très intéressants pour études des comportements restreints et répétitifs³⁴³. Nous avons essayé de différencier ces types de toilettage dans le test du béccher et bien qu'une proportion plus importante d'animaux VPA mâles présente plus de 5 épisodes de « micro-toilettages », ceci n'est pas significativement différent des contrôles (**Annexe 3D**).

2.3. Symptômes auxiliaires de TSA

2.3.1. Locomotion

Notre étude montre une diminution de la locomotion chez les animaux VPA mâles et femelles. Ce résultat est cohérent avec ce qui a été observé chez la souris³⁴². En effet, chez les rats exposés au VPA, les données sont contrastées et certaines études retrouvent une hyper locomotion³⁵⁶, une hypo-locomotion³⁶¹ ou une locomotion similaire aux contrôles³⁴⁹. De manière générale dans les modèles de TSA, les données sur la locomotion sont très différentes en fonction du modèle et de l'espèce et souche utilisée²⁸⁶.

Les **altérations motrices** dans notre étude sont observées chez les **mâles** et les **femelles** conformément à ce qui a été reporté précédemment dans le modèle VPA³⁴⁶. Il aurait été cependant intéressant de les caractériser plus en détail du fait du nombre importants de nos tests comportementaux qui sont dépendants du système moteur.

2.3.2. Olfaction

Notre étude met en évidence la présence de troubles olfactifs et suggère une **anosmie** chez les animaux **VPA mâles** reflété par une latence plus élevée pour déterrer la nourriture³²⁶. Ceci n'est pas décrit dans les études utilisant le modèles VPA mais a déjà été décrit dans d'autres modèles animaux de TSA^{286,325}.

Etant donné que chez les rongeurs l'olfaction est une modalité importante pour se repérer dans l'espace et pour l'interaction sociale, on peut imaginer que la diminution de sociabilité observée chez les mâles VPA soit due à une anosmie. Concernant cette problématique, une étude par *Thornton et collaborateurs* a montré que des rats exposés au VPA présentaient une diminution de sociabilité en l'absence d'anosmie et avec une discrimination olfactive préservée mais qu'ils montraient une diminution de la préférence pour des signaux olfactifs de nature sociale³⁴⁹.

2.3.3. Processus cognitifs

Nous avons observé que les animaux VPA mâles ont une latence plus élevée pour manger la croquette dans le test de la nourriture enterrée plus importante que les contrôles. La prise de nourriture nécessite une pensée organisée et des processus cognitifs attentionnels et motivationnels préservés^{362,363}. L'observation de **troubles cognitifs** notamment **attentionnels** a déjà été observée préférentiellement chez des animaux VPA mâles³⁶⁴.

3. La variabilité et notion de spectre

Il est cependant nécessaire de relativiser nos résultats concernant la sociabilité dont l'effet semble faible et n'a été observé qu'à l'échelle d'une **tendance statistique**. Ceci est peut-être dû à l'utilisation d'une **souche murine non consanguine**, la souche CD1. En effet, certaines études démontrent que cette souche est naturellement très peu sociable voir présente une aversion sociale et une agressivité plus importante que la souche C57BL/6^{365,366}. Cependant, certains auteurs suggèrent que cette souche est aussi adaptée aux tests de sociabilité que les autres mais du fait de la **variabilité** intrinsèque, il est plus difficile d'obtenir une significativité statistique et les résultats dépendent également du type de protocole utilisé^{366,367}. Ceci est illustré par le fait que nous observons une diminution significative de la sociabilité chez les animaux VPA mâles seulement en regroupant les données centrées-réduites (*Z-Score*) des deux tests de sociabilité, (**Annexe 3A**).

Nous avons choisi cette souche pour sa variabilité génétique, ce qui nous permet de nous rapprocher de la situation clinique des TSA et d'établir un « **spectre** » de caractéristiques autistiques. On observe qu'en effet certains animaux VPA présentent une sociabilité proche de celle des contrôles alors que d'autres sont plus atteints.

4. Les différences sexuelles

Il est important de remarquer que dans notre étude, les **mâles VPA présentent beaucoup plus d'altérations que les femelles**. Ces différences sexuelles sont fréquemment observées dans d'autres études sur le modèle VPA³⁵⁷. Cependant, elles ne sont pas retrouvées dans tous les modèles de TSA et sont plus rares dans les modèles génétiques bien que parfois décrites^{368,369}. Il est intéressant de noter que ces données font écho aux différences sexuelles observées dans les TSA avec une prévalence chez les mâles plus importante³.

Cependant, dans notre étude, les femelles VPA présentent plus d'altérations développementales mais moins d'altérations à l'âge adulte que les mâles, ce qui laisse supposer un rôle des hormones sexuelles. En effet, certaines études démontrent que les altérations dans certains modèles animaux de TSA en sont dépendantes car des femelles injectées précocement avec de la testostérone développent plus alors qu'au contraire l'injection d'estradiol à des mâles juvénile diminue les comportements *TSA-like*^{370,371}. Il semble que l'effet protecteur des femelles vis-à-

vis du VPA est aussi dépendant de la méthylation de l'ADN qui est différente entre les mâles et les femelles³⁷².

Mais ces différences sexuelles fréquemment décrites dans les modèles de rongeurs exposés au VPA sont à relativiser car elles diffèrent grandement de ce qui est observé chez l'humain. En effet, le ratio mâle/femelle des TSA dans une population exposée au VPA lors de la grossesse est de 2,4 alors qu'il est de 4,4 chez les non exposés²⁹⁶. Ceci suggère clairement que chez l'humain, l'exposition au VPA augmente le risque de TSA chez les femelles de manière plus importante que chez les mâles ce qui est l'inverse de ce qui est retrouvé chez le rongeur.

LE MODELE VPA CHEZ LA SOURIS CD1, UN BON MODELE DE TSA ?

Ainsi, l'exposition prénatale au valproate (VPA) chez les souris CD1 entraîne l'apparition de troubles développementaux, diminue la sociabilité, provoque l'apparition de comportements restreints et/ou répétitifs ainsi que des désordres locomoteurs, sensoriel et cognitifs. Cependant, ces altérations sont différentes en fonction du sexe. En effet, les femelles présentent plus d'altérations développementales que les mâles alors qu'à l'âge adulte elles sont relativement épargnées. Cependant, l'observation d'une variabilité importante, probablement due à la variabilité génétique des animaux peut constituer un défi important bien qu'elle représente un intérêt particulier pour étudier la notion de « spectre autistique » avec des individus plus atteints que d'autres dans la pathologie humaine. Ce modèle semble donc intéressant pour étudier les troubles du spectre autistiques ainsi que les différences sexuelles qui y sont retrouvées tout en étant conscient que les mécanismes chez l'humain pourraient être différents.

II. LES ALTERATIONS SOMATO-SENSORIELLES

1. Préférence thermique

Notre étude démontre que les animaux adultes VPA mâles possèdent une **température de confort plus élevée**. Cette donnée contraste avec ce qui a été observé dans le modèle murin *shank3*^{-/-}, où les animaux adultes démontraient une préférence thermique similaire aux contrôles. Cependant, dans cette étude, le dispositif ne présentait pas un gradient mais un choix entre deux températures ce qui peut limiter les capacités à distinguer un décalage subtil de la température de confort comme dans notre étude³¹³. De manière intéressante, l'élévation de la température de confort chez les animaux VPA mâles adultes était accompagnée d'une augmentation de la température corporelle. La modification de la température de confort pourrait ainsi être le reflet d'une différence entre la température du dispositif et de l'animal réduite pour à température de confort des contrôles, poussant les mâles VPA vers une température de confort supérieure.

2. Sensibilité mécanique

Un certain nombre d'études retrouvent des anomalies de la sensibilité mécanique chez des animaux modèle de TSA avec des hyper-sensibilité^{304,312,314-316,319}, des hyposensibilité^{302,304,309,317} mais certaines observent des sensibilité préservées^{313,318,319}. Dans notre étude, les résultats sont contrastés et dépendent de l'âge, du sexe et du test.

Premièrement, à l'aide du test des filaments de VonFrey qui évalue la sensibilité mécanique statique ou punctiforme, aucune différence n'a été observée à part une tendance à une hyper-sensibilité chez les femelles VPA adultes. Il est aussi intéressant de noter que certains animaux VPA mâles juvénile possèdent des seuils mécaniques très élevé par rapport à la moyenne, indiquant que certains animaux seulement pourraient présenter ces caractéristiques, renforçant l'idée de spectre.

Deuxièmement, nous avons utilisé le test du coton tige effilé pour mesurer la sensibilité mécanique dynamique. Nous avons observé une hyper-réactivité chez les animaux VPA mâles seulement à l'âge juvénile.

Ensemble, ces résultats contrastent avec ce qui été observé dans le modèle VPA. En effet, une hypersensibilité mécanique est décrite chez des souris CD1 mâles juvéniles et adultes exposées au VPA ainsi qu'une hypersensibilité transitoire chez des rats mâles juvéniles^{297,320}. Ceci peut être expliqué par l'approche expérimentale différente ainsi que les différences génétiques entre les souches de souris CD1 notamment en fonction de l'éleveur^{341,373}.

3. Sensibilité au froid

Des études précédentes retrouvent des anomalies de la sensibilité au froid chez des animaux modèle de TSA avec un hyper-sensibilité³¹², un hyposensibilité³⁰⁶ mais certaines observent une sensibilité préservée^{304,313}. Dans notre étude, la sensibilité des animaux VPA était comparable à celle des contrôles. Nous avons utilisé le test du plantar au froid, mais il serait intéressant de réaliser des tests différents comme celui de la plaque froide ou de l'évaporation de l'acétone comme décrit précédemment afin de confirmer ce résultat³⁷⁴.

4. Sensibilité nociceptive au chaud

Les études antérieures retrouvent des anomalies de la sensibilité nociceptive au chaud chez des animaux modèles de TSA avec une hyper-sensibilité³¹⁹, une hyposensibilité^{302,304,306,309,311,312,315,317} mais certaines observent une sensibilité préservée^{304,312,313,318}.

Notre étude montre une **hypo-réactivité des mâles et femelles adultes VPA** avec le test de la plaque chaude statique. Ceci est cohérents avec les observations précédentes suggérant une hyposensibilité chez le rat^{297,307,308,375} et la souris^{303,305} exposés au VPA. Cette apparition à l'âge adulte lors de stimulation de la patte est décrite chez le rat²⁹⁷ mais l'inverse a déjà été observé lors d'une exposition post-natale aux VPA³⁷⁶. De manière intéressante, notre paradigme inclue la réalisation de trois mesures rapprochées pour éviter un apprentissage ou une aversion comme suggéré précédemment³⁷⁷. Alors que chez les contrôles, la latence de réponse est stable, les animaux VPA démontre une variabilité inter-test importante (**Annexe 4A et 4B**). Ceci a déjà été décrit dans le cadre des TSA pour lequel une modification de la sensibilité était observé avec une grande variabilité inter-expérience^{127,133}.

Nous avons souhaité préciser ce résultat en réalisant un protocole de plaque chaude incrémentée ce qui permet de définir des variations de seuil nociceptif thermique³⁷⁸. Nous avons observé une augmentation du seuil chez les mâles VPA seulement. Ce résultat suggère que l'hypo-réactivité observée chez les femelles VPA adultes n'est pas due à une **modification du seuil nociceptif** alors que chez les **mâles** ceci y participe au moins en partie.

De manière intéressante, le test d'immersion de la queue démontre des résultats contradictoires (**Annexe 4G et 4H**). En effet, il suggère une hyper-sensibilité chez les animaux VPA mâles et femelles dès l'âge juvénile. Déjà chez des rats exposés au VPA, *Schnneider et Przewlocki* décrivaient des résultats différents entre la sensibilité thermique nociceptive évaluée au niveau de la queue et celle évaluée au niveau de la patte²⁹⁷. De plus, le test d'immersion de la queue nécessite une contention qui peut être source d'analgésie induite par le stress chez les contrôles tandis que les animaux VPA ont été observés comme étant plus docile vis-à-vis de la contention^{379,380}. De plus, ces deux tests ne mettent pas en jeu les mêmes systèmes. En effet, le retrait lors de l'immersion de la queue est principalement médié par un réflexe spinal alors que le test de la plaque chaude repose sur des composantes plus intégrées³⁸¹.

5. Répertoire comportemental nociceptif

Il est cependant incertain d'après les études chez l'homme si les individus atteints de TSA présentent de réels troubles de la sensibilité ou si ce sont la manière dont ils font face à une situation douloureuse et l'expriment qui est différente²⁰². Cette étude a donc observé le répertoire comportemental nociceptif lors du test de la plaque chaude statique comme précédemment décrit³⁸²⁻³⁸⁴.

Nous observons une tendance à une modification de ce répertoire comportementale à l'âge juvénile chez les femelles VPA seulement. En effet, la proportion de réponses impliquant les pattes avant est augmentée par rapport à celle impliquant les pattes arrière. A l'âge adulte cependant, nous observons une **modification du répertoire comportemental nociceptif** chez les **animaux VPA mâles et femelles**. En effet, ils démontrent une augmentation de la proportion de léchage de la patte arrière (*licking hindpaw*) au détriment d'une diminution de la proportion de secouement (*shaking hindpaw*). Ceci pourrait être expliqué par les différences que présentes ces deux réponses vis-à-vis des systèmes qu'elles stimulent. Un secouement activant probablement des fibres proprioceptives alors qu'un léchage des fibres tactiles, menant à une modulation de la nociception par des stimuli non-nociceptifs qui pourraient être modifiés chez les animaux VPA.

De plus, il est intéressant d'observer l'absence de réaction de fuite de type saut (*jumps*) chez les animaux VPA adultes. Cependant, ceci n'est pas forcément spécifique à une situation nociceptive car nous l'avons observé aussi chez les mâles VPA dans le test du béccher, suggérant ces animaux comme étant plus résilient vis-à-vis d'un contexte stressant, ce qui a déjà été suggéré par certaines études (**Annexe 3B**)^{385,386}.

6. Modèle de douleur aiguë

6.1. Test à la capsaïcine

Des modifications de la réponse sont déjà décrites dans différents modèles de TSA avec une diminution de la réponse dans les modèles *shank3*^{-/-}, *fmr1*^{-/-} et BTBR^{304,313} et une augmentation dans le modèle *cntnap2*^{-/-}³¹⁵. Notre étude montre une **diminution de la réponse** des animaux VPA mâles à l'âge adulte. Ce test consiste en l'activation directe des afférences primaires exprimant le récepteur TRPV1 mais certaines études suggèrent aussi une composante inflammatoire³⁸⁷. Dans un modèle *shank3*, la diminution de la réponse à la capsaïcine avait été expliquée par une diminution de l'expression des récepteurs TRPV1 à la membrane des neurones sensoriels³¹³.

6.2. Test à la formaline

Des modifications de la réponse à la formaline sont déjà décrites dans différents modèles de TSA avec une diminution de la réponse dans les modèles *cntnap2*^{-/-}, *fmr1*^{-/-} et BTBR^{304,315,318}. Notre étude montre une diminution de la réponse durant la phase tardive uniquement chez les animaux VPA mâles adultes. L'intégrité de la première phase suggère que l'activation des

afférences primaires par la formaline n'est pas différente chez les animaux VPA. De plus, l'interphase n'étant pas modifiée, les phénomènes d'inhibition de la douleur semblent être fonctionnels chez les animaux VPA³³⁵. La phase tardive étant diminuée, cela suggère des **mécanismes de sensibilisation centrale neuro-immuns modifiés** chez les animaux VPA mâles

Il peut-être aussi intéressant de remarquer la différence de réponse des femelles par rapport aux mâles. Il a déjà été décrit une réponse plus importante chez les femelles expliquée par une modification de la libération de neuropeptides par les fibres afférentes, au niveau de la CDME³⁸⁸⁻³⁹⁰.

7. Corrélations

Notre étude retrouve par plusieurs corrélations **un lien entre des comportements TSA-like** et la modification de **réponses nociceptives**, notamment entre la réactivité au chaud et la sociabilité. En effet, il semble que les animaux les moins réactifs donc potentiellement les moins sensibles soient les moins sociaux. Cependant, cette corrélation est aussi retrouvée chez les mâles contrôle. Ceci est un argument pour renforcer l'idée de spectre autistique, avec des caractéristiques des TSA retrouvées chez tous les individus. De manière similaire, une corrélation entre la latence pour manger la croquette dans le test de nourriture enterré, reflétant des processus cognitifs et attentionnel ainsi que la sensibilité à la capsaïcine a été observée chez les animaux VPA mâles. Ces résultats font écho à ce qui est décrit chez l'homme avec un impact de facteurs attentionnel et du quotient intellectuel sur la sensibilité à la douleur sur la sensibilité thermique chez des individus atteints de TSA^{133,214,226}.

L'ensemble suggère que les variations de sensibilité dans le cadre des TSA ne doivent pas être interprétées de manière isolée mais mises en perspective avec d'autres caractéristiques notamment cognitives ou contextuelles.

8. Effet de l'âge

Il est surprenant de constater que **la plupart des altérations apparaissent à l'âge adulte** et ne sont pas présentes durant la période juvénile. Plusieurs études décrivent ce phénomène dans le modèle VPA pour la locomotion par exemple^{361,375}. Quelques études au contraire démontrent l'apparition d'altérations, comme des comportements répétitifs, disparaissant à l'âge adulte³⁷⁶. De plus, de manière similaire à notre étude par exemple, des rats VPA développent une hypo-réactivité dans le test à la plaque chaude à l'âge adulte seulement, mais cette hypo-réactivité est retrouvée plus précocement lors de l'injection de doses de VPA plus élevées, suggérant que pour que des altérations soient présentes dès la période juvénile cela nécessite plus d'altérations cellulaires et moléculaires³⁷⁵. Nous pouvons nous demander si le passage à la période adulte rend les animaux, et notamment les mâles, plus susceptibles de développer des altérations comportementales et pourrait impliquer les hormones sexuelles, notamment la testostérone. En effet, certaines études démontrent des altérations de la signalisation androgénique dans le modèle VPA dépendante de l'âge³⁹¹.

LA SENSIBILITE SOMATOSENSORIELLE DES ANIMAUX VPA

Les animaux exposés au VPA présentent des altérations somatosensorielles qui diffèrent selon la modalité et l'âge. En effet les modalités mécanique et thermique au froid semblent relativement préservées alors que la modalité nociceptive thermique au chaud semble plus altérée. Lors de la réalisation de modèle de douleur aigue, une hypo-réactivité des mâles exposés au VPA est observée et suggère des modifications de mécanismes centraux. Cependant, ces altérations sont seulement observables à l'âge adulte et majoritairement chez les animaux mâles. De manière intéressante, certaines altérations nociceptives sont corrélées avec des comportements « autistiques ». Ces données font écho à celles chez l'humain pour lesquels les résultats varient en fonction de la modalité étudiée. Bien qu'il soit très difficile d'effectuer un parallèle entre le développement murin et humain, l'observation de peu de modifications à un âge juvénile contraste curieusement avec la situation clinique où les TSA sont majoritairement diagnostiqués chez l'enfant.

III. LE SYSTEME NOCICEPTIF AU NIVEAU CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

1. Les neurones sensoriels

Un certain nombre d'études sur des modèles animaux de TSA pointent vers une altération des neurones sensoriels^{301,313}. Ceci est appuyé par des études chez l'homme qui observe une diminution de la densité des fibres périphériques chez des patients TSA²²⁸.

1.1. Proportion de neurones sensoriels exprimant TRPV1

Notre étude observe une proportion de réponse à la capsaïcine entre 20 et 30% chez les neurones d'animaux « contrôle », ce qui est cohérent avec les descriptions précédentes sur notre souche de souris et notre concentration capsaïcine et les proportions retrouvées *in-situ*^{139,392-394}.

Notre étude montre une augmentation de la proportion de réponse à la capsaïcine (*caps+*) chez les neurones de mâles VPA. Ce résultat contraste avec les études précédentes dans des modèles murins de TSA qui retrouvaient une diminution de la proportion de réponse³¹³ ou une proportion inchangée³¹⁵.

Cependant, cette différence doit être interprétée avec précaution du fait des changements qu'entraîne la réalisation d'une culture cellulaire vis-à-vis des tissus initiaux, dépendants de la dissociation enzymatique et mécanique ainsi que du temps de culture. Par exemple, dans certaines études la variation du nombre de neurones TRPV1 positifs observée en immunohistochimie dans des conditions pathologiques n'était pas retrouvée dans la culture des DRG de ces mêmes animaux ou inversement^{313,395}. Ainsi, notre résultat devra être confirmé *in situ* avant de pouvoir conclure sur le nombre de neurones exprimant TRPV1 chez les animaux VPA.

Pour s'affranchir des variations inhérentes à la culture vis-à-vis de la situation *in-situ*, nous avons effectué une analyse complémentaire en fonction de la taille des neurones, décrite comme différente en fonction des différents sous-types de fibres afférentes^{396,397} (**Annexe 5**).

Ainsi la distinction entre les petits et moyen-larges neurones montre que l'augmentation de la proportion de réponse à la capsaïcine chez les neurones de mâles VPA serait plutôt dans la catégorie des moyens-larges (>250 μm^2) (**Annexe 6A**). Ceci fait écho à une étude précédente qui avait décrit que certaines cellules de diamètre moyen/large répondaient à la capsaïcine chez les animaux *cntnap2*^{-/-}, modèle de TSA, alors que ce n'était pas le cas chez les contrôles³¹⁵.

Cependant, il est intéressant de remarquer, qu'aucune étude ayant évalué la distribution des marqueurs traditionnels des différentes populations de neurones sensoriels *in-situ* dans des modèles animaux de TSA n'a retrouvé de différences suggérant que la présence des différents acteurs cellulaires n'est pas modifiée^{313,315,318}. De plus, bien que certaines études décrivent une modification de l'innervation périphérique ou centrale par les fibres sensorielles³¹², la plupart ne retrouve pas de différences^{313,315,318}. Ces données orientent les hypothèses vers des

modifications fonctionnelles plutôt que des changements morphologiques des neurones sensoriels dans le cadre des TSA.

1.2. Quantification de la réponse à la capsaïcine

Notre étude observe une amplitude de réponse à la capsaïcine similaire entre les neurones VPA et contrôles, ce qui contraste de ce qui avait été observé précédemment dans le modèle murin *shank3*^{-/-} dans lequel l'amplitude de la réponse était réduite³¹³.

Cependant, l'augmentation de calcium libre intracellulaire lors d'une application de capsaïcine prend souvent la forme d'un plateau qui peut se maintenir³⁹⁵. En quantifiant ce retour du pic de réponse après l'application nous avons observé que les neurones VPA ont un retour plus important que les neurones d'animaux témoins, suggérant une cinétique plus rapide. Ce genre de phénomène a déjà été observé dans certaines conditions pathologiques et avait suggéré une désensibilisation des récepteurs TRPV1 plus importante³⁹⁵.

Cette désensibilisation peut être influencée par de nombreux facteurs comme la phosphorylation du récepteur ou le calcium intracellulaire et entraîner l'internalisation et la dégradation du récepteur donc une réponse plus courte^{139,398,399}. Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'il s'agisse d'une régulation du calcium (chélation, extrusion...) différente dans les neurones dérivés d'animaux VPA.

Il est important de noter qu'une désensibilisation des récepteurs TRPV1 plus rapide dans les neurones d'animaux VPA est cohérente avec l'hypo-réactivité de ces animaux lors d'une stimulation nociceptive chaude et la diminution de la réponse des souris VPA mâles à une injection de capsaïcine. Il reste cependant à comprendre pourquoi les femelles, dont les neurones sensoriels montrent aussi une cinétique de retour plus rapide, ne possèdent pas cette diminution de réponse à la capsaïcine.

1.3. La concentration cytosolique en calcium libre au repos

Notre étude montre que la fluorescence basale est plus élevée dans les neurones de mâles VPA. Étant donné que nous avons utilisé une sonde fluorescente ratiométrique, le Fura-2, ce résultat reflète la concentration en calcium libre dans le cytosol de la cellule. De plus, cette augmentation est indépendante du statut de réponse vis-à-vis de la capsaïcine et de la taille (**Annexe 7A**). Aucune étude à notre connaissance ne rapporte de variations de la concentration en calcium libre intracellulaire dans des modèles animaux, cependant, un certain nombre d'acteurs de l'homéostasie du calcium sont retrouvés mutés dans les TSA humain et pourraient donc expliquer notre observation⁴⁰⁰.

1.4. La réponse à une dépolarisation

Nous avons appliqué une concentration de haut potassium pour vérifier dans un premier temps que les cellules enregistrées étaient des neurones mais la quantification de la réponse révèle des résultats intéressants. En effet, l'amplitude de la réponse au potassium est augmentée dans les neurones mâles VPA, indépendamment du statut *caps* et de la taille (**Annexe 7B**). Ceci est cohérent avec ce qui a été observé dans le modèle murin *cntnap2*^{-/-} qui présentait une

excitabilité augmentée des neurones sensoriels de petit/moyen diamètre³¹⁵ mais contraste avec les résultats dans le modèle murin *shank3*^{-/-} pour lequel l'excitabilité était inchangée³¹³. Ces changements de l'excitabilité pourraient être liés à la modification de l'expression de canaux potassiques comme déjà décrit dans les modèles *cntnap2*^{-/-} et *mecp2*^{-/-} ou d'autres canaux voltage-dépendants^{315,401}.

Nous observons aussi une différence dans les neurones *caps*- des femelles VPA mais il convient de rester prudent quant à l'interprétation de cette différence. La distribution de l'amplitude ne semble pas être similaire entre le groupe témoin et VPA, ce qui est apparu comme une différence par une approche statistique non paramétrique, mais ne reflète pas forcément une différence de l'amplitude moyenne de la réponse. Cependant, l'observation d'une augmentation de l'amplitude de la réponse dans les neurones de femelles VPA de taille moyenne/large (**Annexe 7B**) suggèrent qu'une excitabilité augmentée pourrait être présente dans des neurones sensoriels non nociceptifs comme des mécanorécepteurs.

Nous observons aussi une cinétique après application de potassium majoritairement préservée. Seuls les neurones mâles VPA *caps*- démontrent une tendance à une cinétique plus lente mais celle-ci n'est pas retrouvée lors de la discrimination par taille des neurones de DRG (**Annexe 7C**).

LES NEURONES SENSORIELS DANS LE MODELE VPA

L'observation d'une amplitude de réponse à la capsaïcine inchangée mais d'une cinétique de plus rapide chez les animaux VPA mâles et femelles suggère des différences dans le mécanisme de désensibilisation des récepteurs TRPV1 ou de régulation du calcium intracellulaire. Cependant, ceci n'est pas observé lors d'une augmentation de calcium induite par une dépolarisation, ce qui renforce la première hypothèse. De plus, les neurones mâles VPA montrent des caractéristiques laissant supposer un calcium intracellulaire au repos plus élevé et une excitabilité plus importante.

Ces résultats sur les neurones sensoriels chez des modèles animaux de TSA suggèrent des modifications fonctionnelles subtiles plutôt que morphologiques. Ces modifications peuvent atteindre tous les types de fibres pouvant donner lieu à des phénotypes très différentes concernant la sensibilité à différentes modalités.

Il est intéressant de remarquer qu'une désensibilisation plus rapide des récepteurs TRPV1 ou un tamponnage du calcium plus important après activation chez les animaux VPA pourrait sous-tendre l'hypo-réactivité nociceptive au chaud observée.

2. La corne dorsale de la moelle épinière

Le réseau de la CDME est important pour filtrer et intégrer les informations nociceptives ainsi que les modulations en provenance des centres supra-spinaux avant leur transmission aux centres supérieurs et l'élaboration d'une sensation de douleur^{141,142}. Un certain nombre d'altérations au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ont déjà été retrouvés dans des animaux modèles de TSA^{310,313,315,318,320}.

2.1. La CDME en conditions basales

2.1.1. Le contenu en neurotransmetteurs

Chez les individus atteints de TSA, une modification de la concentration de certains neurotransmetteurs a déjà été observé, comme une augmentation de la quantité de GABA ou de glutamate dans le cortex préfrontal et le striatum par exemple^{270,402}. De plus, dans plusieurs modèles de TSA, dont le modèle VPA, les quantités des neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA ou la glycine ont aussi été observées comme modifiées dans certaines structures comme le striatum ou l'hippocampe par exemple^{270,403}.

Notre étude, cependant, ne retrouve **pas de modification de la quantité de glutamate, GABA et Glycine**, suggérant que chez les animaux VPA, le réseau de la CMDE n'a pas de modifications drastiques en concentration de neurotransmetteurs.

Il est intéressant de considérer que des monoamines notamment de la sérotonine et de la noradrénaline sont libérées au niveau de la CDME par des fibres d'origine supra-spinales impliquée dans les « contrôles descendants de la douleur »^{155,168}. Notre étude de retrouve **pas de modifications de la quantité de Noradrénaline et de Sérotonine** au niveau de la CDME, suggérant que les fibres en provenance des centres supra-spinaux sont préservées, en tout cas dans leur contenu en neurotransmetteurs.

Ce résultat contraste avec certaines observations qui décrivait que l'exposition prénatale au VPA modifiait la concentration en monoamines dans différentes structures et induisait une hyper-sérotoninémie^{386,404}. En effet, environ un tiers des individus avec TSA présente une hyper-sérotoninémie^{405,406}. Il faut cependant relativiser ce résultat qui ne reflète que la concentration de ces médiateurs dans les terminaisons spinale et en aucun cas le fonctionnement et l'intégrité des structures supra-spinales desquelles elles proviennent. En effet, certaines altérations du *Locus Coeruleus*, à l'origine des terminaisons noradrénergiques ont déjà été décrites dans le cadre des TSA^{407,408}.

L'intégrité du contenu en neurotransmetteurs dans la CDME va de pair avec la plupart des études dans des modèles TSA qui ne décrivent pas de variations architecturales majeures dans des conditions basales de la CDME^{313,315,318}.

2.1.2. La transmission synaptique

Afin de rechercher des changements fonctionnels dans les réseaux de neurones spinaux impliqués dans la nociception, avons enregistré les transmissions excitatrice et inhibitrice spontanées au sein de la lamina II de la CDME.

2.1.2.1. La transmission synaptique excitatrice

♂ Le cas des animaux mâles

Concernant la transmission synaptique excitatrice, notre étude montre une diminution de fréquence des sEPSCs chez les animaux VPA mâles accompagnée d'une diminution de la proportion des événements synaptiques de plus grande amplitude. Ceci pourrait être induit par une **diminution du nombre de potentiels d'action** au sein du réseau. Ce scénario est en effet envisageable étant donné les modifications d'excitabilité retrouvées dans le modèle VPA⁴⁰⁹.

Cependant, nos résultats préliminaires basés sur l'enregistrement des EPSCs miniatures (mEPSCs) en présence de tétrotoxine (TTX), bloquant les canaux sodium voltage-dépendants et donc la génération de potentiels d'actions au sein du réseau, montre une augmentation de fréquence accompagnée d'une diminution de l'amplitude médiane (**Annexe 8B et 8D**).

De manière intéressante, cette diminution d'amplitude des mEPSCs ne semble pas être due à un décalage global de la distribution, ce qui aurait pu suggérer des changements post-synaptiques des récepteurs du glutamate, mais seulement à la présence de mEPSCs d'amplitude plus élevée constituant un « épaulement » de l'histogramme chez les mâles contrôles qui est abolie chez les animaux VPA. De plus, ces événements de « l'épaulement » montrent des fronts de montée similaires aux mEPSCs les plus petits ce qui suggère qu'ils ne sont pas dus à une sommation d'événements distincts. Ainsi, l'amplitude supérieure de ces mEPSCs « contrôle » pourrait traduire une augmentation locale de concentration en calcium libre plus forte ou plus durable aux sites présynaptiques générant des événements plus amples. En effet, ces **mécanismes d'amplification présynaptique** ont été décrits et pourraient impliquer des **canaux voltage-dépendants à bas seuil** d'activation tels que des canaux sodium insensibles à la TTX ou des canaux calcium^{410,411}. L'expression de ces canaux pourrait être altérée dans le modèle VPA et expliquer l'absence de ces événements.

L'augmentation de la fréquence des mEPSCs alors que celle des sEPSCs est diminuée chez les mâles VPA par rapport contrôles est complexe à expliquer. Ces observations pourraient être induites par un effet « réseau » et notamment **une inhibition présynaptique plus importante** dans le groupe VPA qui disparaîtrait en présence de TTX⁴¹².

♀ Le cas des animaux femelles

Dans le cas des femelles VPA, notre étude montre une diminution de fréquence des sEPSCs accompagnée d'une augmentation du nombre d'évènements de grande amplitude par rapport au groupe contrôle.

De manière intéressante, cette diminution de fréquence persiste en présence de TTX mais aucune variation d'amplitude significative n'est observée (**Annexe 8B et 8D**).

Ainsi contrairement aux mâles VPA, il semble que la diminution de fréquence soit indépendante de la présence ou non de potentiels d'actions dans le réseau alors que la variation d'amplitude l'est. Cette diminution de fréquence des mEPSCs chez les femelles VPA par rapport aux animaux contrôles sans changement d'amplitude suggère un effet pré-synaptique avec une **probabilité de libération plus faible** qui serait partiellement compensée en présence de potentiels d'actions par une augmentation d'amplitude.

CONCLUSION SUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE EXCITATRICE

Nos données suggèrent une modification de la transmission synaptique excitatrice chez les animaux VPA, avec des mécanismes différents en fonction du sexe. Ces données font écho à d'autres études qui observent des altérations de la transmission synaptique excitatrice, par exemple au sein de l'amygdale chez des rats mâles VPA³²¹. Cependant, elles contrastent avec celles de certaines études ne retrouvant pas de modifications en conditions basales, au sein des neurones de la lamina II, de la fréquence ou de l'amplitude de la transmission synaptique excitatrice spontanée chez les souris *cntnap2* *-/-* ou miniature dans un modèle *shank3* *-/-*^{313,315}. Dans ces études les auteurs ont effectué des comparaisons de moyennes de données, ce qui masque souvent la présence d'éléments peu représentés dans la population. De plus, les types de neurones présents dans la lamina II sont hétérogènes sur le plan morphologique mais également en termes de fréquence et parfois d'amplitude¹⁴². Ainsi, ces approches peuvent se heurter à un problème de variabilité dans les moyennes que nous minimisons dans notre approche utilisant la distribution cumulée des évènements.

Nos données suggèrent la modification chez les animaux VPA de l'excitabilité, de l'inhibition pré-synaptique ou de l'amplification présynaptique par des canaux voltages dépendants à bas seuil. Cependant, il reste difficile de conclure à un mécanisme précis dans notre système, notamment concernant les variations de fréquence car les caractéristiques des sites pré-synaptiques sont inconnues, notamment leur nombre qui pourrait être modifié chez les animaux VPA mais surtout leur origine. En effet, les synapses glutamatergiques dans la lamina II peuvent provenir des afférences primaires, des interneurons locaux ou même des contrôles descendants. De plus nous ne pouvons pas exclure tout à fait des modifications des propriétés de récepteurs post-synaptiques tels que les récepteurs NMDA par exemple, comme cela a été décrit dans les neurones de la lamina II de la CDME d'animaux *shank2* *-/-*, modèles de TSA³¹⁰.

2.1.2.2. La transmission synaptique inhibitrice

Dans la CDME, la transmission synaptique inhibitrice met en jeu deux neurotransmetteurs qui sont responsables des IPSCs observés dans cette étude, le GABA et son action sur le récepteur GABA-A et la glycine et son action sur son récepteur (GlyR)¹⁴⁶.

♂ Le cas des animaux mâles

Concernant la transmission inhibitrice spontanée des mâles VPA, notre étude montre une modification de la distribution des intervalles inter-événements sans modification de la médiane, ce qui implique un changement très faible de la fréquence de ces événements. Ce point devra être exploré plus en détail mais sera simplifié par une absence de différence. De plus, les mâles VPA présentent une réduction de l'amplitude.

De manière intéressante, en présence de TTX, nous observons une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mIPSCs (**Annexe 8F et 8H**). La variation de fréquence suggère une probabilité de libération augmentée aux synapses inhibitrices des mâles VPA qui serait partiellement compensée par l'activité du réseau et la présence de potentiels d'actions. Par exemple, comme indiqué précédemment, une inhibition présynaptique plus importante dans le groupe VPA, abolie en présence de TTX⁴¹².

Les variations d'amplitude sont plus difficiles à expliquer car pourraient impliquer un effet post-synaptique avec des modifications des récepteurs GABA-A ou GlyR mais aussi pré-synaptique avec une libération de libération de neurotransmetteurs modifiée.

♀ Le cas des animaux femelles

Notre étude démontre une diminution importante de la fréquence des sIPSCs chez les femelles VPA accompagnée d'une diminution de l'amplitude. Une partie de ce résultat pourrait être expliqué par la diminution du nombre de potentiels d'action dans le réseau.

Cependant, lors de l'enregistrement de la transmission synaptique miniature, nous avons observé une augmentation de fréquence accompagnée d'une augmentation d'amplitude des mIPSCs, similaire à ce qui est observé chez les mâles (**Annexe 8F et 8H**).

L'augmentation de la fréquence des mIPSCs suggèrent une probabilité de libération augmentée aux synapses inhibitrices qui serait corrigée et même inversée par l'activité du réseau et la présence de potentiels d'actions comme avec l'hypothèse de l'inhibition présynaptique plus importante dans le groupe VPA, abolie en présence de TTX.

De manière similaire aux mâles, les variations d'amplitude peuvent impliquer un effet post-synaptique mais aussi pré-synaptique.

CONCLUSION SUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE INHIBITRICE

Il semble que la transmission synaptique inhibitrice soit altérée chez les animaux VPA et les différences entre les sIPSCs et mIPSCs suggèrent que le réseau opère une compensation fonctionnelle sur l'activité monosynaptique. Cependant, l'équilibre atteint chez les animaux VPA à la suite de cette compensation n'est pas comparable à la situation des animaux contrôles.

Nos données suggèrent la modification chez les animaux VPA de l'excitabilité, de l'inhibition pré-synaptique ou des récepteurs GABA-A et GlyR.

Cependant, il reste difficile de conclure à un mécanisme précis car encore une fois les caractéristiques des sites pré-synaptiques sont inconnues. Les IPSCs dans la lamina II peuvent provenir des interneurons locaux ou des contrôles descendants. De plus, comme décrit précédemment, les IPSCs observés dans la lamina II peuvent être dus à l'activation de récepteurs ionotropes GABA_A ou de récepteurs de la glycine. Ces deux types de récepteurs sont perméables aux ions chlorure mais possèdent des caractéristiques cinétiques distinctes. En effet les IPSCs GABAergiques sont dans la CDME souvent de faible amplitude et de cinétique de désactivation lente alors que les IPSC glycinergiques sont souvent plus grands avec une cinétique de désactivation plus rapide¹⁴⁶. Ainsi, on ne peut pas exclure que les événements de grande amplitude soient en partie dus à des événements glycinergiques.

Pour répondre à cette question plusieurs approches sont envisageables. Une approche d'analyse pour essayer de séparer les IPSCs GABAergiques de glycinergiques basé sur la cinétique de désactivation ou sur une approche pharmacologique utilisant des antagonistes spécifiques des récepteurs GlyR (Strychnine) ou GABA-A (Bicuculline).

2.1.3. L'équilibre excitation/inhibition

L'équilibre entre la composante excitatrice et inhibitrice est nécessaire au bon fonctionnement des réseaux neuronaux notamment celui de la CDME^{142,413}. En effet un excès d'excitation peut entraîner des phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynies alors qu'un excès d'inhibition peut entraîner des hypo-algésies si ce déséquilibre influence l'information qui atteint les neurones de projections. Des modifications de cet équilibre dans d'autres structures nerveuses ont déjà été décrites dans le cadre des TSA chez l'humain et dans des modèles animaux^{271,322,354,401,414}. Par exemple, dans le modèle *cntnap2*^{-/-}, le ratio glutamate/GABA dans le cortex préfrontal est diminué et semble corrélé avec la réduction de sociabilité observée chez ces animaux⁴¹⁵.

Nos résultats ne montrent pas de modification du ratio Glutamate/GABA suggérant, au niveau de la quantité de neurotransmetteur, un équilibre excitation/inhibition préservé. Cependant, l'équilibre entre la composante excitatrice et inhibitrice ne repose pas uniquement sur la quantité respective de chacun de ces neurotransmetteurs. Nous avons donc quantifié le poids respectif des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices au sein de chaque cellule grâce à l'étude des courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs.

Notre étude décrit une tendance à une diminution chez les mâles VPA de la composante excitatrice et une diminution chez les femelles VPA de la composante inhibitrice (**Annexe**). Cependant, lors de la réalisation du rapport EPSC/IPSC aucune différence n'est observée. Ainsi, malgré le fait que certains paramètres des EPSC et des IPSC soient modifiés chez les animaux VPA, l'équilibre entre la composante excitatrice et inhibitrice semble préservé dans des conditions basales, du moins de la manière dont nous l'avons évaluée. Ceci contraste avec certaines études qui ont montré que les variations de paramètres comme la fréquence et l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs influençaient le rapport excitation/inhibition chez les animaux VPA dans l'amygdale et l'ACC^{321,354}. De manière intéressante, l'observation du rapport excitation/inhibition en présence de TTX révèle aussi un rapport excitation/inhibition préservé (**Annexe 9**).

CONCLUSION SUR LA CDME EN CONDITIONS BASALES

La transmission synaptique en conditions basales dans les neurones CDME chez les animaux VPA sans variations majeures du contenu en neurotransmetteur. Ces altérations sont variables entre la transmission excitatrice et inhibitrice. Cependant, elles suggèrent que certains changements observés à l'échelle monosynaptique puissent être compensées et modulées par l'activité du réseau. Il est difficile de comparer nos résultats avec ce qui a été obtenu dans d'autres structures du SNC car il semble que pour chaque modèle animal de TSA et pour chaque structure, les altérations de la transmission synaptique soient différentes.

De plus, nos résultats suggèrent que les mécanismes sont différents en fonction du sexe. Il est intéressant de noter que des modifications sexe-spécifiques de la transmission synaptique ont déjà été décrites dans le modèle VPA⁴⁰⁹. Ceci pourrait sous-tendre, du moins en partie, les différences observées pour les comportements nociceptifs entre les animaux mâles et femelles.

Cependant, il semblerait que malgré les modifications de l'activité synaptique excitatrice et inhibitrice, l'équilibre excitation/inhibition soit maintenu à l'échelle de chaque cellule indépendamment de l'activité du réseau dans des conditions basales. Ceci suggère l'existence de phénomènes de plasticité homéostatique. Cependant, pour chaque processus de compensation, il existe un point pour lequel le système est dépassé et ne peut conserver son équilibre, alors des défauts de fonctionnement apparaissent de manière plus visible. Ceci pourrait être le cas lors de l'activation du réseau de la CDME par des informations nociceptives afférentes chez les animaux VPA.

2.2. Le réseau de la CDME lors d'une situation nociceptive

Lors d'une situation nociceptive, le réseau de la CDME va permettre de filtrer et d'intégrer l'information nociceptive avant de transférer ce message aux neurones de projection à destination supra-spinale. Une diminution du nombre de neurones activés au sein de la CDME lors de l'injection de capsaïcine est décrite chez des animaux *shank3*^{-/-} présentant une réaction comportementale diminuée³¹³.

Nos résultats préliminaires ne montrent pas de modification de la proportion de neurones de la CDME répondant à l'application de capsaïcine par une augmentation de fréquence des sEPSCs chez les animaux VPA (**Annexe 10A**). Suggérant que le réseau de la lamina II n'est pas globalement hyper ou hypo-activé. Cependant, nous observons une augmentation de la proportion de neurones présentant une augmentation de la fréquence des sIPSCs chez les mâles VPA (**Annexe 10B**). Ceci pourrait indiquer que la composante inhibitrice du réseau est beaucoup plus activée chez ces animaux à la suite de stimulation de fibres afférentes primaires sensibles à la capsaïcine.

Cette observation pourrait être mise en relation avec la diminution de la sensibilité nociceptive au chaud et à la capsaïcine que nous avons notée chez les mâles VPA. Cependant, l'inhibition en fonction de la nature de la cible post-synaptique peut entraîner des effets opposés au sein d'un réseau. En effet, un neurone inhibiteur faisant synapse avec un neurone excitateur va pouvoir participer à la composante « inhibitrice globale » au sein du réseau alors que s'il contacte un autre neurone inhibiteur il va participer, par désinhibition, à la composante « excitatrice globale ». Ainsi, même si nous observons des modifications, celles-ci doivent être interprétées avec prudence en absence de la connaissance exacte de la structure du réseau neuronal auquel on s'adresse. D'autant plus que dans notre étude, la nature neurochimique du neurone enregistré n'a pas été déterminée.

Il est aussi important de considérer que la CDME n'est pas le seul réseau potentiellement responsable des altérations comportementales lors de situations nociceptives, dans le cadre des TSA. Par exemple, des animaux *cntnap2*^{-/-} présentent une réponse à la formaline réduite bien que le nombre de neurones « activés » au sein de la CDME n'était pas modifié, suggérant que des altérations peuvent exister ailleurs dans le système nociceptif³¹⁵.

3. Des problèmes généralisés des acteurs de la dynamique du calcium intracellulaire

Nombre de nos observations *ex-vivo* suggèrent une potentielle modification d'acteurs impliqués dans l'homéostasie du calcium intracellulaire. D'une part, la modification de la concentration en calcium libre, une réponse calcique plus importante lors d'une dépolarisation ou une cinétique de régulation du calcium intracellulaire plus rapide après une application de capsaïcine sont observés dans les neurones sensoriels d'animaux VPA. D'autre part, une modification de la transmission synaptique, un réseau neuronal avec moins actif (moins de

potentiels d'action) sont retrouvés dans les neurones de la CDME. Tous ces résultats ont en commun qu'ils peuvent être influencés par l'homéostasie et la dynamique du calcium intracellulaire. Ceci est d'autant plus intéressant qu'un nombre important d'acteurs de la signalisation calcium comme des canaux calcium voltage-dépendants, des pompes calcium-adénosine-tri-phosphate, l'inositol triphosphate et ses récepteurs, ainsi que les mitochondries ont été impliqués dans des cas de TSA humain^{400,416}. De plus, la modification de certains de ces acteurs comme des canaux calcium voltage-dépendants est décrite dans les neurones sensoriels de modèle animaux de TSA⁴¹⁷. La modification de ceux-ci au niveau de la CDME pourrait entraîner des modifications de la sensibilité nociceptive comme décrit précédemment⁴¹⁸.

4. L'implication des cellules gliales

Notre étude s'est concentrée sur les acteurs neuronaux, cependant, un certain nombre d'études suggèrent que la glie représenterait un acteur majeur de la pathogénicité des TSA^{53,93}. Dans des modèles animaux, certaines études décrivent des modifications des acteurs gliaux⁴¹⁹. Plus spécifiquement, dans le cadre des neurones sensoriels, une altération des oligodendrocytes altère la myélinisation et les propriétés des neurones sensoriels dans le modèle *pten* de TSA⁴²⁰. De plus, au niveau de la CDME, une étude récente démontre une activation microgliale plus importante chez souris mâles VPA³²⁰.

Ces données suggèrent que les neurones ne sont pas les seuls acteurs dont les modifications fonctionnelles doivent être prises en considération pour expliquer les changements biologiques dans le cadre des TSA et notamment les changements de sensibilité nociceptives.

CONCLUSION DE LA DISCUSSION

Ainsi, les souris CD1 exposées au VPA représentent un modèle valide pour l'étude des troubles du spectre autistiques car elles présentent des isomorphies comportementales avec les symptômes de TSA. Ce modèle est particulièrement intéressant du fait de la variabilité de des atteintes comportementales qui se rapproche plus de la situation clinique de « spectre autistique » et de la présence de différences importantes selon le sexe. En effet, les femelles semblent moins vulnérables vis-à-vis de l'exposition au VPA, ce fait écho à la prévalence plus forte des TSA chez les mâles mais contraste étrangement avec les données chez l'homme lors de l'exposition prénatale à cette molécule.

Ces animaux montrent des altérations de la sensibilité nociceptive, notamment des hypo-réactivités, majoritairement chez les animaux adultes mâles. Cependant, il convient de rester prudent quant à l'interprétation de ces hypo-réactivités en hyposensibilités du fait de modifications du répertoire comportemental lors de situation nociceptives. Cette problématique est similaire aux TSA chez l'humain pour lesquels les troubles moteurs, cognitifs et attentionnel pourraient influencer la manière de faire face à une situation douloureuse et laisser penser à une hyposensibilité à tort par un observateur extérieur. Ceci est corroboré par la corrélation entre certains « traits autistiques » comme la sociabilité ou certains troubles cognitifs avec la réaction à une situation nociceptive.

Pourtant, les modifications d'acteurs cellulaire et moléculaire du système nociceptifs laissent supposer l'existence d'altérations potentielles de la sensibilité nociceptive. En effet, une désensibilisation plus importante des récepteur TRPV1 au chaud dans les neurones sensoriels, ainsi que des altérations de la transmission synaptique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière pourraient sous-tendre l'hypo-sensibilité nociceptive au chaud des animaux VPA. Cependant, il semble que les mécanismes impliqués soient multiples et différents en fonction du sexe. Plus de données sont nécessaires pour préciser les mécanismes qui sont responsables de l'hypo-sensibilité nociceptive observée chez les animaux VPA et plus globalement pour comprendre les changements de perception douloureuse observés chez l'humain atteint de de troubles du spectre autistique.

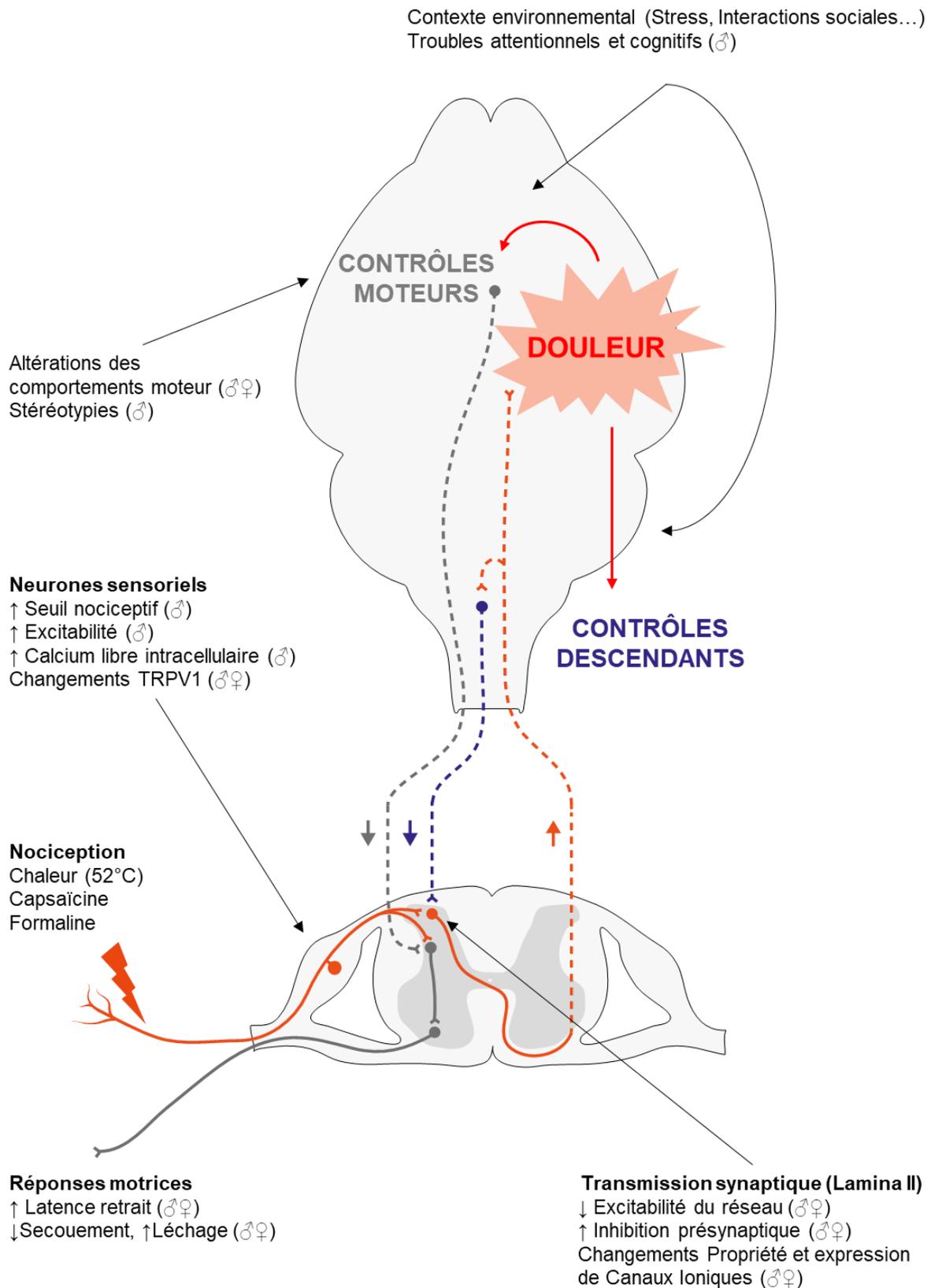


Figure 10. Schéma conceptuel de la nociception dans le modèle VPA.

Une situation source de nociception entraîne une réponse modifiée chez les animaux VPA, que ce soit un réflexe moteur retardé ou un changement dans le type de réponse. Ces changements peuvent être expliqués par plusieurs raisons. Premièrement, les altérations des acteurs du système nociceptif (neuronnes sensoriels, réseau de la CDME) pourraient sous-tendre une sensation finale de douleur modifiée dans son aspect-sensory-discriminatif ainsi qu'une modulation de celle-ci altérée par les contrôles descendants. Cependant, toutes les observations réalisées dans notre étude sont dépendantes du système moteur et les altérations de cet aspect sont nombreuses chez les animaux VPA. Il est donc nécessaire de ne pas surinterpréter une hypo-réactivité en hypo-sensibilité chez ces animaux et en générales dans les TSA. Finalement, la présence de troubles attentionnels et cognitifs ainsi que l'effet du contexte environnemental pourraient moduler la réponse à la douleur de manière différente chez les animaux VPA. Il est intéressant de remarquer que dans un certain nombre de ces aspects, des différences sexuelles sont observées, expliquant que le phénotype comportemental global des animaux VPA lors d'une situation nociceptive puisse présenter des spécificités propres à chaque sexe.

IV. PERSPECTIVES

1. Le bon modèle de TSA ?

Notre modèle d'exposition prénatale au VPA chez des souris CD1 est intéressant mais il pose plusieurs questions.

Premièrement, la variabilité génétique additionnée à la variabilité expérimentale peut représenter un défi important pour observer des changements faibles. Et ceci d'autant plus lors de l'exposition prénatale à un agent tel que le VPA, agissant sur les phénomènes épigénétiques de manière non-spécifique. Cependant, il semble nécessaire pour comprendre la pathologie humaine si hétérogène et trouver des mécanismes partagés de privilégier l'introduction de variabilité plutôt que d'étudier l'effet d'une unique mutation sur le comportement et les mécanismes cellulaires et moléculaires modifiés.

Dans cette optique, les études récentes utilisent de plus en plus une multitude de modèles différents^{304,314,322}. Ceci vient de l'hypothèse selon laquelle un phénomène qui serait retrouvé dans plusieurs modèles dont l'étiologie est différente aurait plus de chance de l'être aussi dans la pathologie humaine, si hétérogène. Ainsi il serait intéressant par le futur d'utiliser d'autres modèles de TSA, notamment une combinaison de modèles génétiques et induits.

Deuxièmement, il est curieux qu'une injection unique à forte dose de VPA chez des femelles gestantes soit suffisante pour induire des comportements *TSA-like* au long terme chez la descendance, ce qui n'est pas le cas chez l'humain. De plus, ce protocole est très éloigné de la situation clinique pour lequel le VPA est pris chroniquement par les patients épileptiques à des doses 100 à 1000 fois inférieures^{293,298}. Ainsi il serait intéressant de raffiner le protocole avec une exposition plus chronique notamment dans l'eau de boisson des femelles gestante et avec des doses plus faibles.

2. Les différences sexuelles et l'effet de l'âge

La vulnérabilité accrue des mâles à l'exposition prénatale au VPA ainsi que l'apparition à l'âge adulte d'altérations somatosensorielles laissent fortement suggérer une implication des hormones sexuelles. Il serait intéressant d'explorer cet aspect.

La réalisation d'un suivi au cours du développement et de la puberté de la concentration sanguine de testostérone, d'estradiol et éventuellement de progestérone pourrait permettre de déceler des variations hormonales chez les animaux VPA. De plus, cela permettrait l'établissement de corrélations entre les niveaux d'hormones et certaines altérations comportementales.

3. Evaluation de la nociception et de la douleur

Notre étude s'est limitée à des situations nociceptives de courte durée. Cependant des douleurs plus prolongées sont fréquentes dans les TSA du fait de certaines comorbidités (troubles gastro-intestinaux, blessures...). De plus, des modifications des phénomènes hyperalgésique et allodyniques ont déjà été décrits certains modèles animaux de TSA lors de l'induction de douleurs chroniques d'origine inflammatoire ou neuropathique^{309,313,317,318}. Les douleurs inflammatoires nous semblent plus que pertinents car plus souvent rencontré par les individus TSA et notamment le modèle CFA (*Complete Freud's Adjuvant*) dont les symptômes perdurent plus longtemps que d'autres modèles.

Aussi, notre étude s'est limitée à regarder la réponse globale à une situation nociceptive ou douloureuse sans essayer de discriminer entre les différentes composantes. Cependant, certaines études chez les individus TSA suggèrent une modification de l'aspect cognitif et affectif de la douleur. Il serait donc intéressant d'étudier cet aspect chez l'animal à l'aide de paradigmes tels de la préférence/aversion de place comme décrit précédemment⁴²¹.

Finalement, il nous semble important pour les approches futures de privilégier des tests comportementaux reposant moins sur le système moteur, avec pas ou peu de manipulation des animaux et en enregistrant des paramètres d'évaluation indirecte de nociception tels que les paramètres autonomes (par exemple la fréquence cardiaque).

4. Les acteurs cellulaires

Dans notre étude nous avons exploré séparément différents acteurs du système nociceptif (neurones sensoriels, réseau de la CDME, terminaisons descendantes). Il nous semble cependant nécessaire, pour faire un lien avec le comportement, d'utiliser une approche plus intégrée.

Une procédure expérimentale particulière nous semble particulièrement intéressante. Elle repose sur l'enregistrement extracellulaire *in-vivo* des neurones nociceptifs au sein de la CDME chez des animaux anesthésiés. En effet, cette approche permettrait l'établissement d'une continuité entre le comportement avec l'utilisation de stimulations nociceptives physiologiques variées (mécaniques, thermiques, chimiques) tout en observant le fonctionnement des neurones sensoriels et du réseau de la CDME chez l'animal vivant. De plus, à l'inverse de l'utilisation de tranches aiguës de moelle épinière, cette approche permet d'étudier le système nociceptif intact et de pouvoir regarder l'interaction au niveau spinal, entre les fibres afférentes, les neurones de la CDME et les voies descendantes et de pouvoir moduler chacun de ces acteurs afin de regarder l'impact sur les autres.

Ces perspectives répondent à certains biais que j'ai pu constater dans les approches que nous avons utilisées Je souhaiterais cependant terminer ce manuscrit avec une phrase qui m'a été transmise au cours de ma thèse et qui m'a aidé à être content de ce travail, malgré ses défauts.

« *Learn to accept imperfection and to be satisfied with results that are good enough.* »

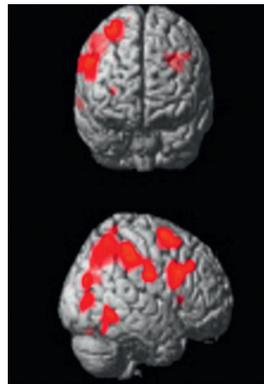
ANNEXE

Annexe 1. Revue "Nociception, Douleur et Autisme" publiée dans le journal Médecine/Sciences.

Nociception, douleur et autisme

Lucien Ruelle-Le Glaunec^{1,2}, Perrine Inquimbert^{1,2}, Sylvain Hugel¹, Rémy Schlichter^{1,2}, Jean-Louis Bossu¹

► Les sujets autistes présentent fréquemment des anomalies sensorielles. Celles concernant la nociception ainsi que sa potentielle résultante, la douleur, sont d'un intérêt capital. En effet, du fait de nombreuses comorbidités, les sujets autistes sont plus souvent exposés à des situations douloureuses que la population générale. Alors qu'ils sont souvent considérés comme moins sensibles, les études expérimentales sur ce point sont loin de faire consensus. Utiliser des modèles animaux pourrait permettre de s'affranchir de certaines sources de variabilité et d'apporter, dans le cadre de l'autisme, une vue d'ensemble des altérations potentielles du système nociceptif aux niveaux cellulaire et moléculaire. ◀



¹CNRS, 5 rue Blaise-Pascal, 67000 Strasbourg, France.
²Université de Strasbourg, Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, UPR 3212, 8 allée du Général Rouvillois, F-67000 Strasbourg, France.
jlbossu@inci-cnrs.unistra.fr

les modalités sensorielles (visuelles, auditives, olfactives, gustatives, somato-sensorielles) [2]. Il peut s'agir d'hyper- ou d'hypo-réactivité, ou d'un intérêt atypique pour des informations sensorielles provenant de l'environnement [1]. L'intégration multisensorielle, essentielle pour la perception et la compréhension d'informations sociales complexes, est également vraisemblablement affectée chez les personnes souffrant de TSA [2]. Cette revue s'intéresse à une fonction spécifique de la modalité somato-sensorielle, la nociception. Ce terme regroupe les mécanismes de détection et d'encodage des stimulus potentiellement nocifs pour l'organisme, qui, après interprétation consciente et subjective, peuvent donner lieu à la sensation de douleur. Étudier ces aspects dans le cadre de l'autisme semble fondamental. Les patients porteurs de TSA sont en effet plus susceptibles d'être confrontés à des situations douloureuses au cours de leur vie que la population générale [3]. Ils présentent ainsi fréquemment des comorbidités pouvant être douloureuses, telles que l'épilepsie ou des troubles gastro-intestinaux, qui les conduisent à subir plus fréquemment que dans la population générale, des interventions médicales elles aussi potentiellement douloureuses [3]. Certains sujets autistes manifestent de plus des comportements à caractère automutilateur [4]. Appréhender la douleur, qu'elle soit aiguë ou chronique, chez ces personnes, aussi bien dans son aspect sensoriel qu'affectif, et son impact sur le plan psychologique, apparaît donc être un volet essentiel dans la prise en charge de cette pathologie.

La douleur et les voies nociceptives

La douleur est définie par l'*International Association for the Study of Pain* comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable en réponse à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en de tels termes. Elle résulte de l'interprétation consciente et subjective de l'information nociceptive.

L'autisme est une pathologie neurodéveloppementale complexe dont l'étiologie est encore mal connue. Des facteurs environnementaux (infections, âge parental, exposition à des agents tératogènes), ainsi que des facteurs génétiques et/ou épigénétiques sont décrits, affectant des gènes (*SHANK3*, *SHANK2*, *MECP2* [*methyl CpG-binding protein 2*], *FMR1* [*Fragile X mental retardation*], etc.) codant des protéines impliquées dans le fonctionnement des synapses, l'adhérence cellulaire et le développement du système nerveux.

La maladie se caractérise par une mosaïque de symptômes regroupés dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-V) sous le terme de troubles du spectre autistique (TSA) [1]. Deux groupes majeurs de signes cliniques sont observés. Ils concernent des déficits de communication et d'interaction sociale, et la présence de centres d'intérêts restreints et de comportements répétitifs. Les personnes atteintes de TSA présentent également des anomalies dans le traitement des informations sensorielles pouvant potentiellement être à l'origine de difficultés d'intégration sociale, ainsi que de problèmes dans la vie quotidienne. Ces anomalies peuvent concerner toutes

Vignette (Photo © Inserm-Caroline Ciumas).

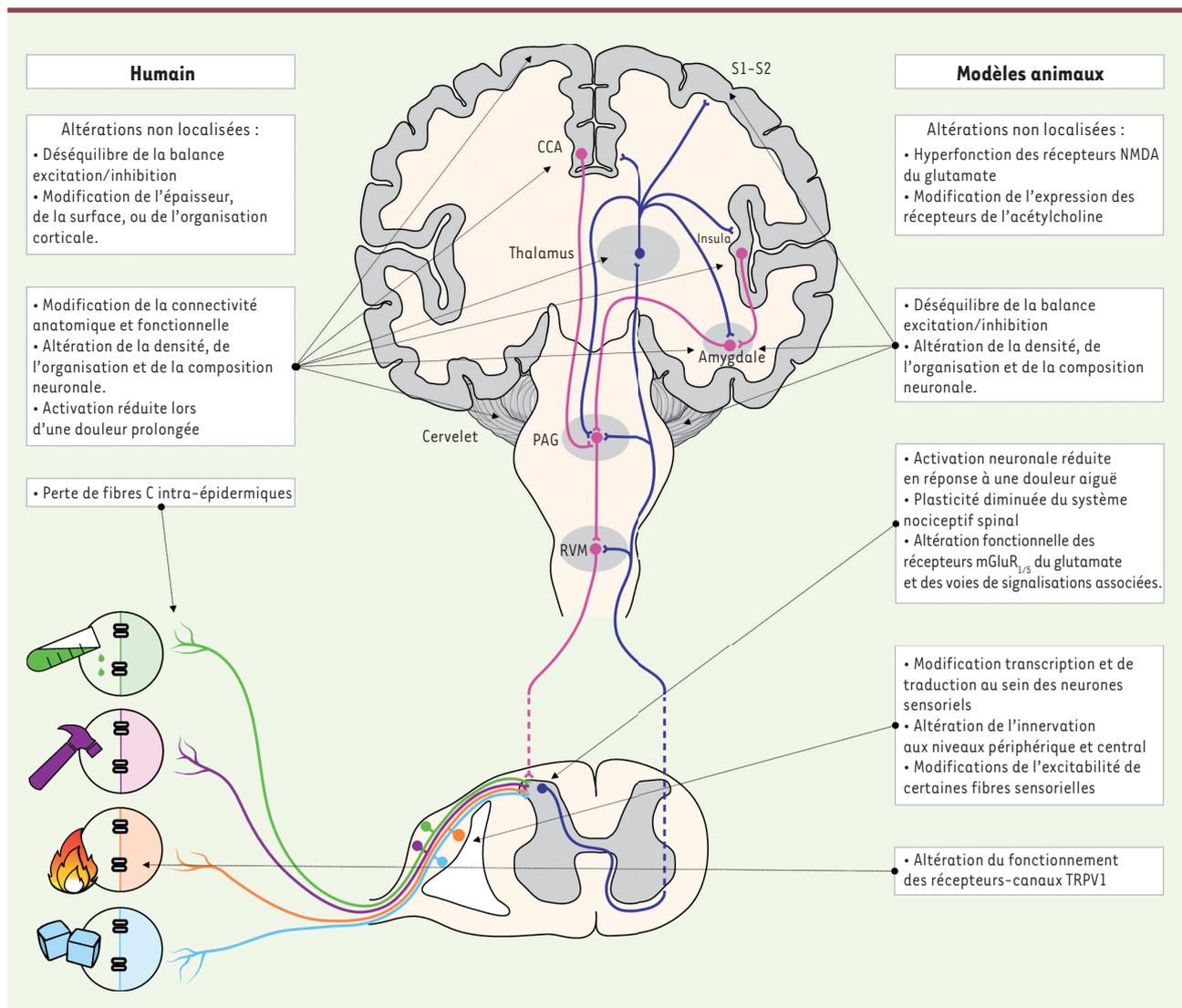


Figure 1. Les particularités de la sensibilité nociceptive dans l'autisme : hypothèses cellulaires et moléculaires. Les nocicepteurs détectent les stimulus nocifs en périphérie et transmettent l'information aux neurones du réseau de la corne dorsale de la moelle épinière. L'information qui en résulte est transmise à l'encéphale et notamment au thalamus via la voie spinothalamique. S'ensuit un traitement cérébral complexe mettant en jeu différentes structures (S1-S2 : cortex somato-sensoriel, CCA : cortex cingulaire antérieur, insula, amygdale, cervelet, etc.), donnant potentiellement lieu à la sensation de douleur. En retour, les structures cérébrales envoient des projections sur la substance grise péri-aqueducale (PAG) et sur la réticulée ventro-médiane (RVM), deux structures modulant, via les terminaisons de leur neurones, l'intégration spinale du message nociceptif. Certaines altérations présentes chez les sujets TSA semblent être non localisées et communes à d'autres désordres non strictement nociceptifs. Cependant, des changements morphologiques et fonctionnels à différents niveaux des voies nociceptives sont décrits. Ils peuvent concerner la transduction des stimulus potentiellement nocifs au niveau périphérique, l'intégration nociceptive spinale et l'élaboration de la sensation de douleur au niveau cérébral.

Schématiquement (Figure 1), le message nociceptif est initialement produit par l'activation de neurones sensoriels dits « nocicepteurs » innervant la périphérie (peau, muscles, etc.), ainsi que les organes internes [5]. Ces nocicepteurs, selon leurs modalités d'activation, détectent les stimulus nocifs, qu'ils soient thermiques, mécaniques, ou chimiques. Les protéines responsables de la transduction de ces stimulus en signal électrique sont plus ou moins spécifiques d'une modalité et conduisent à la dépolarisation de la terminaison périphérique et à

la genèse de potentiels d'action. Un nombre important de ces protéines a été décrit, comme par exemple les canaux TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*) pour la nociception au chaud, ou TRPM8 (*transient receptor potential cation channel subfamily Melastatin member 8*) pour la perception du froid [6]. L'information nociceptive résultante est codée sous la forme de trains de potentiels d'action, dont la fréquence dépend

de l'intensité de la stimulation [6]. Elle est ensuite acheminée *via* les racines dorsales à la corne dorsale de la moelle épinière. L'intégration des messages nociceptifs à ce niveau, avant leur transmission vers les centres supérieurs, est un processus complexe qui met en jeu un dense réseau d'interneurones constitués d'environ 75 % de neurones excitateurs et 25 % de neurones inhibiteurs [7]. L'équilibre entre la composante excitatrice et inhibitrice constitue un élément capital dans l'intégration et le filtrage des entrées nociceptives. L'information est ensuite transmise à des neurones de projection dont les axones projettent vers des régions supra-spinales. Des changements plastiques au sein de ce circuit ont été décrits comme pouvant entraîner des hypo- ou des hyperalgésies (des douleurs diminuées ou augmentées pour un stimulus normalement douloureux) et des allodynies (des douleurs provoquées par un stimulus normalement indolore) [5, 7].

Le message nociceptif est modulé au cours de son trajet de la périphérie vers le cortex cérébral. Cette modulation est particulièrement importante dans la corne dorsale de la moelle épinière. Deux types de modulations peuvent être distingués à ce niveau. L'un repose sur les fibres sensorielles tactiles non nociceptives, et est décrit par le concept du « *gate control* », théorisant l'interaction entre les voies tactile et nociceptive [5, 7], et rendant compte de l'observation qu'un léger toucher peut diminuer la sensation de douleur aiguë. L'autre met en jeu des voies descendantes provenant de nombreuses régions supra-spinales et, notamment, du tronc cérébral [8]. Ces voies exercent, *via* différents médiateurs (GABA, glutamate, sérotonine, noradrénaline, dopamine, enképhalines, etc.), une modulation de l'intégration des informations nociceptives au niveau spinal [8].

Après cette intégration spinale complexe, le message nociceptif porté par les neurones de projection atteint l'encéphale par différentes voies. Chez l'homme, il s'agit notamment de la voie spinothalamique [5]. Les informations ascendantes sont intégrées et filtrées au niveau du thalamus, principalement dans les noyaux ventro-postéro-latéraux, -inférieurs et -médians [5]. Les informations sont ensuite transmises à différentes structures cérébrales constituant la « matrice de la douleur » (cortex somato-sensoriel, cortex insulaire, cortex cingulaire antérieur, etc.) [5, 9, 10]. L'interaction fonctionnelle entre ces structures résulte en une sensation/perception globale de douleur dans sa dimension sensori-discriminative, affective et cognitive. Cependant, le rôle exact de chacune de ces structures dans les différents aspects de la sensation/perception douloureuse reste encore à déterminer.

Évaluation de la douleur chez les sujets neurotypiques

Bien qu'il semble évident qu'évaluer une douleur soit capital lors d'un examen clinique, cela peut parfois s'avérer délicat. Les méthodes utilisées peuvent être directes ou indirectes, objectives ou subjectives, et dépendent de l'âge, de l'état physiologique et psychologique du sujet. Une liste exhaustive des outils disponibles en clinique peut être consultée sur le site de la Société française d'étude et de traitement de la douleur¹.

Le plus souvent, chez l'adulte conscient et capable de s'exprimer, et chez l'enfant âgé de plus de 6 ans, les méthodes utilisées sont directes et subjectives. Elles se fondent principalement sur l'auto-évaluation. Les principales approches sont simples. Elles utilisent des échelles unidimensionnelles, numériques verbales ou visuelles analogiques qui permettent au patient de préciser l'intensité de sa douleur, associées à des schémas corporels pour indiquer sa localisation. Pour les jeunes enfants (entre 4 et 6 ans), les méthodes utilisées chez l'adulte ont été adaptées avec, par exemple, des échelles visuelles analogiques représentant des visages plus ou moins expressifs d'un certain degré de souffrance, ou des schémas corporels grossiers (des *bonshommes*). Ces méthodes simples permettent une première évaluation de la douleur d'un individu ainsi que le suivi de l'efficacité d'un traitement antalgique, mais elles ne donnent pas ou peu d'informations sur les caractéristiques de la douleur. Des approches plus complexes sont donc parfois utilisées, comme des échelles dites multidimensionnelles, à la fois quantitatives (intensité) et qualitatives (type de douleur, modalité, impact psychologique, etc.). Elles tiennent compte de la composante sensori-discriminative mais aussi affective de la douleur. En France, le questionnaire douleur de l'hôpital Saint-Antoine (QDSA) est l'un des plus utilisés.

Il est cependant des cas où ces méthodes ne sont pas appropriées, notamment lorsque la communication est impossible ou que les capacités cognitives nécessaires à l'introspection sont insuffisantes (nouveau-né, déficit intellectuel, état végétatif, etc.). De nombreuses méthodes d'évaluation alternatives ont donc été développées. Elles reposent sur l'observation par le personnel soignant de certains signes cliniques : on parle alors d'hétéro-évaluation.

Chez les nouveau-nés et enfants en bas âge (entre 0 et 3 ans), l'observation des mimiques faciales (visage calme, contractions des paupières, froncements des sourcils, accentuations des sillons naso-labiaux), des mouvements des membres (calmes et doux, présence de pédalages, d'écartements des orteils, membres inférieurs raides ou surélevés, agitations des bras, réactions de retrait) et des expressions vocales (gémissements, cris de longue durée, voire hurlements constants) permettent d'obtenir un score indirect du niveau de douleur.

Chez l'adulte incapable de s'exprimer (par exemple s'il est en état végétatif), l'observation des expressions faciales, de l'état de quiétude, du tonus musculaire, d'éventuelles vocalisations, ainsi que la potentielle adaptation au respirateur, peuvent constituer des indices qui renseignent indirectement sur le niveau de douleur.

¹ <https://www.sfetd-douleur.org/>

D'autres méthodes de mesure se voulant plus objectives ont été développées. Certaines, comme le test sensoriel quantitatif (QST), utilisent des stimulations thermiques et mécaniques standardisées pour évaluer la modalité somato-sensorielle dans son ensemble. Mais elles nécessitent l'absence de déficience intellectuelle majeure chez le sujet [3, 11]. Finalement, des outils plus indirects, principalement utilisés en anesthésie, analysent des paramètres autonomes, notamment l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique lors d'une expérience nociceptive. Ainsi, la fréquence cardiaque et sa variabilité, la pression artérielle, le degré de dilatation de la pupille, ou la conductance électrodermale, sont de bons indices du niveau de nociception [12].

Mesurer la douleur chez les sujets autistes

Du fait des déficits de communication qui caractérisent les sujets autistes, ainsi que des potentiels déficits intellectuels associés, il est très difficile, à part pour l'autisme de haut niveau de fonctionnement, d'évaluer leur douleur en utilisant les tests classiques d'auto-évaluation [13]. Actuellement, aucun protocole permettant de mesurer la douleur chez l'ensemble des patients présentant des TSA n'a été validé. Néanmoins, des échelles d'hétéro-évaluation, validées chez des enfants incapables de communiquer verbalement ou ayant des déficits cognitifs importants, peuvent être utilisées chez certains enfants autistes. Récemment, l'échelle NCCPC (*non-communicative children pain checklist*) a été validée en français, sous le nom de GED-DI (grille d'évaluation douleur-déficience intellectuelle) [14]. À l'origine, cette grille a été conçue pour quantifier la douleur post-opératoire chez des enfants non communicants. Après quelques ajustements prenant en compte les réactions émotionnelles, l'hyper-vigilance ainsi que les expressions idiopathiques et douloureuses spécifiques des patients porteurs de TSA, elle permettrait également de quantifier la douleur au quotidien chez la plupart des enfants autistes [15]. Cette grille, distribuée aux parents, aux puériculteurs, aux soignants, ou au personnel pédagogique, évalue six catégories d'items : les expressions vocales, l'activité sociale, les expressions faciales, le tonus et la réactivité, ainsi que des signes physiologiques. Comme chez les sujets neurotypiques, les outils de mesure de l'activité du système nerveux autonome peuvent également être utilisés.

La sensibilité douloureuse des sujets autistes

Auparavant, les enfants autistes étaient considérés comme insensibles car certains présentaient des réactions inhabituelles lors d'une situation douloureuse et s'automutilaient [3,4]. Ces observations, associées à certaines descriptions cliniques anecdotiques et quelques récits autobiographiques, ont longtemps laissé penser à une absence de sensibilité à la douleur des sujets autistes [3]. À tel point qu'aujourd'hui, les critères diagnostiques des TSA incluent une apparente insensibilité à la douleur [1].

Pourtant, bien qu'un certain nombre d'éléments suggèrent que la réaction à la douleur des sujets autistes est altérée, par rapport à la population neurotypique, les résultats expérimentaux concernant leur sensibilité ne

font pas consensus. Par exemple, lors d'une prise de sang, certaines études mettent en évidence une diminution de réactivité comportementale à la douleur par rapport à un groupe témoin. D'autres, en revanche, révèlent une augmentation et certaines ne démontrent aucune différence [3, 16]. De manière générale, la sensibilité et les réactions comportementales lors d'une expérience douloureuse sont souvent analysées selon des protocoles très divers. Elles résultent de l'étude de rapports réalisés par les parents ou par les éducateurs spécialisés, ou d'observations faites à la suite d'interventions médicales potentiellement douloureuses (prise de sang, soins dentaires) et lors de tests expérimentaux. Les résultats sont donc hétérogènes. Ils dépendent en grande partie de la méthodologie utilisée ainsi que du contexte dans lequel les évaluations ont été réalisées. Il est important de noter qu'une réactivité comportementale apparaissant comme diminuée chez les sujets porteurs de TSA, par rapport aux témoins, n'indique pas nécessairement une sensibilité moindre, mais un mode d'expression de la douleur potentiellement différent, ayant pour origine des troubles de communication, de représentation du corps, et des déficits intellectuels [16]. Par exemple, lors de la mesure de paramètres indirects plus objectifs, comme l'activité du système nerveux autonome, des augmentations plus importantes de la fréquence cardiaque² lors de la réalisation d'une prise de sang sont retrouvées, indiquant une hyper-sensibilité, alors que l'échelle comportementale, réalisée en parallèle, révèle une hypo-sensibilité [16].

Pour réduire cette hétérogénéité dans les protocoles, des études se voulant plus standardisées utilisent des stimulations nociceptives calibrées, comme dans le test sensoriel quantitatif (Tableau 1). La plupart de ces études ne retrouvent aucune différence systématique de sensibilité à la douleur entre les sujets porteurs de TSA et des sujets neurotypiques. Cependant, en distinguant les différentes modalités nociceptives, certaines différences peuvent apparaître, mais elles sont loin d'être consensuelles. Concernant la sensibilité nociceptive thermique au chaud et au froid, par exemple, une hyper-sensibilité mais également une absence de différence ont été décrites [11, 17-22]. Quant aux études relatives à la modalité nociceptive mécanique, elles indiquent des normo-, des hypo- ou des hyper-sensibilités [11, 19, 23, 24].

Ces résultats hétérogènes suggèrent qu'il n'est pas encore possible de répondre à une question globale de différence de sensibilité nociceptive, en termes d'hyper-, de normo- ou d'hypo-sensibilité, entre patients

² L'augmentation de fréquence cardiaque ne traduit pas formellement une hyper-sensibilité nociceptive, il peut s'agir d'une conséquence d'un stress.



Population TSA	Modalité thermique au chaud	Modalité thermique au froid	Modalité mécanique	Autres	Références
Effectif = 18 Âge = 36,4 Genre (H/F) = 18/0 QI = 115,8	–	–	–	Stimulation électrique : Normo-sensibilité De faibles stimulations sont considérées comme plus inconfortables	[47]
Effectif = 8 Âge = 29,0 Genre (H/F) = 7/1 QI > 70	Hyper-sensibilité mais variable entre 2 sessions	Hyper-sensibilité	–	–	[17]
Effectif = 15 Âge = 25,8 Genre (H/F) = 2/3 QI = 101,8	Normo-sensibilité Hypo-sensibilité selon l'échelle verbale	Normo-sensibilité Hypo-sensibilité selon l'échelle verbale	–	Stimulation électrique : Normo-sensibilité. Hypo-sensibilité selon l'échelle verbale.	[18]
Effectif = 20 Âge = 14,6 Genre (H/F) = 15/5 QI = 104.1	Normo-sensibilité	Normo-sensibilité	–	Sensations de chaleur paradoxaes (30 %)	[20]
Effectif = 31 Âge = 20,5 Genre (H/F) = 29/3 QI = 101,4	Normo-sensibilité	–	–	–	[21]
Effectif = 13 Âge = 31,7 Genre (H/F) = 7/6 QI = 111,6	Normo-sensibilité	Normo-sensibilité	Normo-sensibilité Allodynie mécanique dynamique (15 %)	Sensations de chaleur paradoxaes (30 %)	[11]
Effectif = 13 Âge = 27,22 Genre (H/F) = 7/6 QI > 70	Normo-sensibilité	Normo-sensibilité	Hypo-sensibilité Allodynie mécanique dynamique	Sensations de chaleur paradoxaes (35 %)	[19]
Effectif = 34 Âge = 20,4 Genre (H/F) = 32/2 QI > 90	–	–	Hyper-sensibilité	–	[24]
Effectif = 27 Âge = 6,3 Genre (H/F) = 20/7 Pas de déficience intellectuelle	–	–	Hyper-sensibilité	–	[23]

Tableau 1. Sensibilité douloureuse des patients TSA. Chez l'homme, la sensibilité douloureuse est souvent mesurée par l'application d'une stimulation d'intensité variable, le sujet indique lorsque celle-ci devient douloureuse. Pour la modalité thermique, le sujet est exposé à une température croissante (32-52 °C) pour le chaud et décroissante (32-0 °C) pour le froid. La sensibilité douloureuse mécanique est mesurée sur le même principe, en appliquant une force croissante à l'aide d'un dynamomètre calibré. La stimulation électrique stimule directement les fibres périphériques de la peau en utilisant un courant sinusoïdal d'intensité croissante. Cette méthode diffère de l'échelle verbale dans laquelle le sujet score sur une échelle numérique l'intensité d'une stimulation donnée.

porteurs de TSA et population neurotypique. La population de patients est cependant loin d'être homogène. Il semble donc que d'autres paramètres nécessitent d'être pris en compte, comme le niveau de déficience intellectuelle, le sexe, la présence de comorbidités ou le contexte environnemental au moment des mesures. Les sujets décrits comme hypo-sensibles seraient en effet ceux qui présentent les symptômes autistiques les plus sévères [4]. Cela est d'autant plus important à prendre en compte que la quasi-totalité des études évaluant la sensibilité douloureuse et nociceptive de ces patients a été réalisée chez des sujets sans déficience intellectuelle. Néanmoins, il est intéressant de noter que certains d'entre eux présentent des sensations paradoxales de chaleur (comme des sensations de chaleur ou de brûlure après stimulations autres que thermiques chaudes) et des allodynies mécaniques dynamiques³ que l'on ne retrouve pas chez les sujets témoins [11, 19, 20]. Ces particularités peuvent laisser penser que l'encodage des signaux nociceptifs conduisant à la sensation de douleur pourrait être altéré chez certains sujets autistes.

Les hypothèses chez l'homme

Les méthodes utilisées habituellement pour évaluer la douleur ne permettent pas toujours de mettre en évidence des différences dans le ressenti des sujets autistes. Cependant, certaines études utilisant des questionnaires multidimensionnels afin d'évaluer différents aspects de la douleur, décrivent une diminution des aspects affectifs et subjectifs, sans modification de l'aspect sensori-discriminatif et du seuil global de sensibilité à la douleur. Ces données suggèrent une potentielle altération des voies ou structures responsable de l'aspect cognitif et affectif de la douleur [18]. Ces méthodes nécessitent de la part du sujet, des capacités introspectives et cognitives intactes, ce qui n'est pas toujours le cas chez les patients porteurs de TSA. L'absence de différences dans la sensibilité douloureuse retrouvée dans certaines études n'indique donc pas obligatoirement une absence de différences d'encodage des stimulations nociceptives. Par exemple, la réponse corticale observée par électroencéphalographie à la suite d'une stimulation nociceptive chaude, appelée potentiel évoqué thermique, est diminuée chez les individus porteurs de TSA, et ceci même si l'intensité n'est pas décrite comme différente sur l'échelle verbale [21]. Récemment, l'imagerie fonctionnelle par IRM (imagerie par résonance magnétique) a permis de caractériser une réponse cérébrale « signature » de la douleur, définie par l'augmentation de l'activité hémodynamique de certaines zones du cerveau (thalamus, cortex somato-sensoriel, insula, cortex cingulaire antérieur, etc.) lors d'une stimulation nociceptive [10]. Initialement, cette réponse cérébrale « signature » de la douleur n'est pas différente chez les sujets porteurs de TSA par rapports aux témoins, mais elle est grandement réduite lors d'une douleur soutenue, alors, qu'une fois encore, l'intensité évaluée à l'aide d'une échelle verbale n'est pas différente [22]. Cette observation suggère que la sensibilité douloureuse n'est pas forcément

altérée, mais que c'est la manière de faire face à une douleur qui pourrait être différente entre les sujets porteurs de TSA et les sujets neurotypiques. Cela pourrait expliquer, en partie, la coexistence des hypo- et hypersensibilités qui sont rapportées [22].

Ainsi, si certains sujets présentant des TSA traitent les informations nociceptives de façon atypique, ces altérations peuvent provenir d'une mauvaise transduction du stimulus potentiellement nocif au niveau périphérique, d'un mauvais codage spinal, d'une altération du traitement cérébral de l'information, voire d'une atypie dans la mise en place des contrôles descendants. En se fondant sur les études réalisées sur d'autres modalités sensorielles (la vision, l'audition, etc.), il ne semble pas que la détection des stimulus soit systématiquement altérée. Les observations suggèrent davantage une modification des processus d'intégration [2]. Concernant la modalité somato-sensorielle, ce point est néanmoins plus difficile à évaluer, étant donné l'absence d'organe précis dédié à cette fonction. Des modifications de sensibilité tactile ont cependant déjà été décrites [25]. Concernant la nociception (*Figure 1*), certains mécanismes centraux d'encodage des stimulus nociceptifs pourraient être à l'origine d'un traitement atypique de l'information expliquant ainsi les sensations de chaleur paradoxale [11]. Par exemple, des altérations des régions somato-sensorielles corticales et sous-corticales pourraient potentiellement être associées aux phénomènes d'automutilation [4]. En effet, si l'on considère les structures centrales impliquées dans l'élaboration de la sensation de douleur, certaines d'entre elles, telles que le cortex somato-sensoriel (aspect sensori-discriminatif), l'amygdale (aspect émotionnel) ou le cervelet, présentent des anomalies chez les sujets autistes [26]. Les changements anatomiques et fonctionnels observés chez les patients semblent également corrélés à d'autres altérations somato-sensorielles, telles que la sensibilité tactile [25]. En effet, au niveau spinal, des phénomènes pouvant correspondre au concept de « *gate control* », dans lequel les fibres non nociceptives tactiles sont impliquées, pourraient être modifiés chez les sujets porteurs de TSA. Cependant, des stimulations répétitives périphériques non nociceptives (tactiles, vibratoires, etc.) réduiraient la sensibilité douloureuse mécanique de ces patients, démontrant que les mécanismes de type « *gate control* » restent fonctionnels et pourraient représenter une cible thérapeutique intéressante [27]. Il semble donc qu'il puisse exister chez certains sujets autistes des particularités quant à la perception des messages nociceptifs et l'élaboration de la sensation de douleur. Cependant, en raison de l'hétérogénéité des

³ Sensation douloureuse déclenchée par un stimulus mécanique dynamique normalement indolore (caresse, frottement des vêtements sur la peau, etc.)



résultats obtenus chez l'homme, il est difficile de conclure quant aux mécanismes impliqués. Pour s'affranchir de certains biais dans l'évaluation de la douleur (subjectivité, influence par des facteurs cognitifs), pour réaliser des mesures standardisées, et pour caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués, avoir recours à des modèles animaux pourrait être envisagé.

L'apport des modèles animaux

La plupart des études réalisées chez l'animal utilisent le rongeur. Parmi les modèles fréquemment exploités, on retrouve des modèles génétiques dans lesquels différents gènes qui ont été associés aux TSA humains (Shank3, Shank2, Chd8 [*chromodomain helicase DNA binding protein 8*], PTEN [*phosphatase and Tensin homolog*], Admp [*anti-dorsalizing morphogenetic protein*]), ou des gènes syndromiques de troubles neurodéveloppementaux (Mecp2, Fmr1, Tsc1 [*TSC complex subunit 1*], Tsc2, Syngap1 [*synaptic Ras GTPase activating protein 1*], Ube3a [*ubiquitin protein ligase E3A*]), ont été mutés ou invalidés [28-31]. Des modèles environnementaux sont également disponibles. Il sont obtenus par exposition *in utero* à des agents inflammatoires, comme les lipopolysaccharides bactériens (LPS) ou l'acide polyinosinique:polycytidylique (Poly I:C) [30], ou des agents tératogènes, tels que le valproate de sodium (VPA) [32-34] (→).

(→) Voir la Synthèse de J.L. Bossu et S. Roux, m/s n° 3, mars 2019, page 236

Certaines souches murines consanguines, comme les souris BTBR⁴, sont également utilisées [30, 35]. Ces modèles animaux ont été validés par l'utilisation de tests d'observation révélant des déficits de comportements sociaux ainsi que la présence de comportements stéréotypés, reproduisant en partie les symptômes des TSA. Du point de vue des particularités somato-sensorielles, des anomalies de la sensibilité tactile ont été mises en évidence dans certains de ces modèles animaux, et indiquent des altérations périphériques et centrales [25].

Ces modèles de TSA présentent un intérêt pour l'étude des anomalies nociceptives liées à l'autisme. Les résultats semblent néanmoins dépendre de la modalité nociceptive testée (chaud, froid, mécanique, viscérale) (Tableau II), mais un consensus apparaît en ce qui concerne la sensibilité nociceptive au chaud pour laquelle la majorité des études concluent à une hypo-sensibilité [31-33, 35-41, 42]. Pour les sensibilités nociceptives thermique au froid, mécanique et viscérale, les résultats sont plus variables et sont fonction du modèle expérimental utilisé. L'utilisation de modèles de douleurs pathologiques indiquent cependant une réduction du développement des douleurs aiguës et chroniques, qu'elles soient d'origine inflammatoire ou neuropathique [39, 43, 44].

Ces modèles ont par ailleurs permis de révéler certains des processus moléculaires impliqués (Figure 1). Des mécanismes généraux pouvant altérer le système nociceptif dans son ensemble, comme l'implication du système nicotinique ou une sur-activation des récepteurs NMDA du

glutamate, ont ainsi été décrits [35, 37]. Des phénomènes plus localisés, au sein de structures impliquées dans l'intégration nociceptive, ont aussi été observés.

Au niveau périphérique, des différences dans les seuils d'excitabilité des fibres C ont été rapportées chez les animaux BTBR et *Fmr1*^{-/-} [35]. La mutation du gène codant la protéine Shank3, spécifiquement dans les neurones, pourrait également modifier le fonctionnement des canaux TRPV1 dans les neurones sensoriels et ainsi diminuer la sensibilité nociceptive au chaud [43]. Concernant l'hypersensibilité mécanique, elle pourrait être liée à une augmentation de l'innervation au niveau de la peau [42] ou à une diminution d'expression des canaux potassiques de la famille HCN (*hyperpolarisation-activated cyclic-nucleotide*) qui augmenterait l'excitabilité des fibres mécano-sensibles [45].

Certaines études suggèrent également des altérations au sein du système nerveux central. Par exemple, après l'injection périphérique de formaline (un agent inflammatoire), la réponse nociceptive est typiquement constituée de deux phases : la première mettant en jeu l'activation des fibres périphériques, et la deuxième impliquant des phénomènes spinaux de sensibilisation centrale. Seule cette deuxième phase est réduite chez les animaux *Fmr1*^{-/-} [44]. Chez les souris *Shank2*^{-/-}, la sensibilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière à un agoniste des récepteurs NMDA du glutamate, semble être diminuée, réduisant les comportements de douleur [40]. De même, une diminution d'expression des récepteurs du GABA est observée dans la corne dorsale des souris *Mecp2*^{-/-} [28]. Ces modifications pourraient ainsi perturber la balance entre excitation et inhibition au niveau du réseau nociceptif spinal, entraînant des modifications majeures dans l'intégration des stimulus périphériques.

Au niveau cérébral, des atypies de transmission et de plasticité synaptiques ont été décrites. Elles impliquent, potentiellement, des changements morphologiques et fonctionnels et des déséquilibres de la balance excitation/inhibition au niveau du cortex somato-sensoriel ou de l'amygdale [36]. Ces modifications pourraient altérer les processus d'intégration et d'encodage des stimulus nociceptifs et ainsi perturber l'élaboration de la sensation de douleur.

L'activité de plusieurs molécules a pu être testée grâce à ces différents modèles animaux. Certaines se sont révélées avoir un potentiel thérapeutique intéressant dans les TSA. Des traitements ciblant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, les récepteurs GABA-A, ou les récepteurs NMDA du glutamate ont ainsi permis des améliorations des déficits sociaux et une réduction des comportements stéréotypés, ainsi qu'une amé-

⁴ Ce modèle de souris BTBR se caractérise par des interactions sociales atypiques, des troubles de la communication et un comportement répétitif.

Espèce, Sexe, Modèle	Modalité thermique au chaud (1)	Modalité thermique au froid (2)	Modalité mécanique (3)
Rat ♂ VPA	Hypo-sensibilité	–	Hyper-sensibilité (période juvénile seulement)
Souris ♂ VPA	Hypo-sensibilité	–	–
Souris ♂ <i>Syngap1</i> ^{-/+}	Hypo-sensibilité	–	–
Souris ♂ <i>Shank2</i> ^{-/-}	Hypo-sensibilité	–	Hypo-sensibilité
Rat ♂ <i>Shank3</i> ^{-/-} et ^{-/+}	Hypo-sensibilité	–	Hypo-sensibilité
Souris ♂ <i>Shank3</i> ^{-/-} et ^{-/+}	Normo-sensibilité	Normo-sensibilité	Normo-sensibilité
Rat ♂ <i>Mecp2</i> ^{-Y}	Hypo-sensibilité	Hyper-sensibilité	Hyper-sensibilité
Rat ♀ <i>Mecp2</i> ^{-X}	Normo-sensibilité	Hyper-sensibilité	Hyper-sensibilité
Souris ♂ <i>Fmr1</i> ^{-Y}	Hypo-sensibilité	Hypo-sensibilité	–
Souris ♂ <i>Fmr1</i> ^{-Y}	Normo -sensibilité	–	Normo -sensibilité
Souris ♂♀ <i>Gabrb3</i> ^{-/+}	Hyper-sensibilité	–	Hyper-sensibilité (♂ seulement)
Souris ♂♀ BTBR	Hypo-sensibilité	Hypo-sensibilité	–

Tableau II. Sensibilité nociceptive dans les modèles animaux d'autisme. La sensibilité nociceptive thermique est testée par l'observation de comportements nociceptifs (retrait de la patte ou de la queue, léchage, secousse) lors d'exposition à une température fixe (52 °C ou 0 °C) ou croissante (30-52 °C) pour le chaud et décroissante (25-0 °C) pour le froid. Le seuil de sensibilité mécanique est mesuré en appliquant au niveau de la patte arrière de l'animal une force croissante à l'aide de filaments en nylon de diamètre calibrés (filaments de von Frey) ou à l'aide de pinces calibrées en observant un éventuel retrait du membre. La sensibilité viscérale peut être évaluée en observant les comportements consécutifs à une injection intrapéritonéale d'acide acétique (grattages abdominaux, étirement des pattes postérieures, torsions de la musculature dorso-abdominale) ou par distension colorectale à l'aide d'un ballon et enregistrement électromyographique de la réponse viscéro-motrice. Le modèle de douleur aiguë évoquée par la capsaïcine consiste

Autres (4)	Hypothèses cyto-moléculaires	Références
–	(1) Hyperfonction des récepteurs NMDA du glutamate Modification de la plasticité synaptique NMDA dépendante et déséquilibre de la balance excitation/inhibition au sein de l'amygdale	[32, 36, 37]
–	–	[33, 38]
–	–	[41]
Réduction de la douleur spontanée induite par l'injection intrathécale de NMDA Réduction de l'allodynie mécanique liée aux douleurs chroniques inflammatoire et neuropathique	(4) Diminution de la réponse des neurones de la corne dorsale au NMDA et de la signalisation cellulaire associée	[39, 40]
–	–	[31]
Réduction de la douleur aiguë à la capsaïcine. Réduction de l'hyperalgésie thermique liée aux douleurs chroniques inflammatoires et neuropathiques	(2) Les récepteurs TRPM8 ne sont pas altérés (4) La déficience de Shank3 dans les neurones sensitifs altère le fonctionnement de TRPV1 (4) Moins d'activation neuronale au niveau de la corne dorsale	[43]
–	Modifications transcriptionnelles au sein des neurones sensitifs (1) Hypo-innervation centrale et périphérique des fibres peptidergiques (3) Hyper-innervation périphérique des fibres non peptidergiques	[42]
Hypo-sensibilité viscérale	–	[29]
Hyper-sensibilité viscérale	(1)(2) Augmentation du seuil électrique des fibres C	[35]
Réduction de la douleur inflammatoire aiguë à la formaline Réduction de l'allodynie mécanique liée aux douleurs chroniques neuropathiques	(4) Altération de la plasticité du système nociceptif spinal (4) Dysfonction des récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR1/5 et de la voie de signalisation mTOR	[44]
–	–	[48]
Hyper-sensibilité viscérale	(1)(2) Augmentation du seuil électrique des fibres C (1)(2) Implication du système cholinergique et modification de l'expression des sous-unités des récepteurs de l'acétylcholine	[35]

en l'injection intraplantaire d'un agoniste des récepteurs TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*), et à l'observation des comportements nociceptifs spontanés. Le modèle de douleur inflammatoire aiguë à la formaline repose sur un principe similaire avec l'injection d'un agent chimique pro-inflammatoire qu'est la formaline. La réponse présente deux phases, la première mettant en jeu une activation directe des fibres périphériques et la deuxième phase, plus tardive, mettant en jeu des phénomènes de sensibilisation centrale au niveau de la moelle épinière. Le modèle de douleur chronique de type inflammatoire repose sur l'injection intraplantaire d'un agent pro-inflammatoire comme l'adjuvant complet de Freund alors que le type neuropathique nécessite une chirurgie préalable pour procéder à une ligature, une compression ou une section de certaines racines nerveuses du nerf sciatique.

lioration des atypies somato-sensorielles, notamment nociceptives [35, 37, 45]. Le bumétanide, un traitement très prometteur dans les TSA, en restaurant l'équilibre excitation/inhibition, semble également corriger les altérations de la sensibilité somato-sensorielle [46].

Conclusions et perspectives

Le traitement de l'information nociceptive et la sensation de douleur qui peut en découler présentent des particularités chez les sujets autistes. Sachant qu'ils sont plus souvent confrontés à des situations douloureuses que la population générale, ces particularités sont à prendre en considération afin d'améliorer leur qualité de vie. Cependant, les observations réalisées chez ces patients sont diverses, vraisemblablement en raison des différences de sévérité de leur autisme, de leurs capacités intellectuelles et de leur profil sensoriel qui est propre à chaque individu. Ainsi, des tests standardisés et plus adaptés aux particularités cognitives et sensorielles des patients porteurs de troubles du spectre autistique et à l'hétérogénéité de cette maladie pourraient permettre de mieux appréhender la nature de ces altérations. Bien qu'il soit actuellement difficile d'établir des corrélations entre l'homme et les modèles animaux, le recours à ces derniers paraît pertinent. Ils permettraient de préciser les modalités nociceptives altérées, de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués et de tester des molécules susceptibles de corriger les altérations sensorielles des sujets autistes. ♦

SUMMARY

Nociception pain and autism

Autistic subjects frequently display sensory anomalies. Those regarding nociception and its potential outcome, pain, are of crucial interest. Indeed, because of numerous comorbidities, autistic subjects are more often exposed to painful situation. Despite being often considered as less sensitive, experimental studies evaluating this point are failing to reach consensus. Using animal model can help reduce variability and bring, regarding autism, an overview of potential alterations of the nociceptive system at the cellular and molecular level. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)*, 5th ed. Arlington, VA : APA, 2013.
2. Thye MD, Bednarz HM, Herringshaw AJ, et al. The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. *Dev Cogn Neurosci* 2018 ; 29 : 151-67.
3. Moore DJ. Acute pain experience in individuals with autism spectrum disorders: a review. *Autism* 2015 ; 19 : 387-99.
4. Summers J, Shahrami A, Cali S, et al. Self-injury in autism spectrum disorder and intellectual disability: exploring the role of reactivity to pain and sensory input. *Brain Sci* 2017 ; 7 : 1-16.
5. Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg Clin North Am* 2014 ; 25 : 629-38.
6. Wolf CJ, Ma Q. Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007 ; 55 : 353-64.
7. Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, et al. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* 2016 ; 338 : 230-47.
8. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002 ; 66 : 355-474.
9. Garcia-Larrea L, Peyron R. Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. *Pain* 2013 ; S29-43.
10. Wager TD, Atlas LY, Lindquist MA, et al. An fMRI-based neurologic signature of physical pain. *N Engl J Med* 2013 ; 368 : 1388-97.
11. Fründt O, Grashorn W, Schöttle D, et al. Quantitative sensory testing in adults with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2017 ; 47 : 1183-92.
12. De Jonckheere J, Bonhomme V, Jeanne M, et al. Physiological signal processing for individualized anti-nociception management during general anesthesia: a review. *Yearbook Medical Informatics* 2015 ; 10 : 95-101.
13. Ely E, Chen-Lim ML, Carpenter KM, et al. Pain assessment of children with autism spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr* 2016 ; 37 : 53-61.
14. Zabalia M, Breau LM, Wood C, et al. Validation francophone de la grille d'évaluation de la douleur-déficience intellectuelle: version postopératoire. *Can J Anesth* 2011 ; 58 : 1016-23.
15. Dubois A, Michelon C, Rattaz C, et al. Daily living pain assessment in children with autism: Exploratory study. *Res Dev Disabil* 2017 ; 62 : 238-46.
16. Tordjman S, Anderson GM, Botbol M, et al. Pain reactivity and plasma β -endorphin in children and adolescents with autistic disorder. *PLoS One* 2009 ; 4 : e5289.
17. Cascio C, McGlone F, Folger S, et al. Tactile perception in adults with autism: a multidimensional psychophysical study. *J Autism Dev Disord* 2008 ; 38 : 127-37.
18. Yasuda Y, Hashimoto R, Nakae A, et al. Sensory cognitive abnormalities of pain in autism spectrum disorder: A case-control study. *Ann Gen Psychiatry* 2016 ; 15 : 8.
19. Vaughan S, McGlone F, Poole H, et al. A quantitative sensory testing approach to pain in autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2019 ; 50 : 1607-20.
20. Duerden EG, Taylor MJ, Lee M, et al. Decreased sensitivity to thermal stimuli in adolescents with autism spectrum disorder: relation to symptomatology and cognitive ability. *J Pain* 2015 ; 16 : 463-71.
21. Chien YL, Wu SW, Chu CP, et al. Attenuated contact heat-evoked potentials associated with sensory and social-emotional symptoms in individuals with autism spectrum disorder. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 36887.
22. Failla MD, Moana-Filho EJ, Essick GK, et al. Initially intact neural responses to pain in autism are diminished during sustained pain. *Autism* 2018 ; 22 : 669-83.
23. Riquelme I, Hatem SM, Montoya P. Abnormal pressure pain, touch sensitivity, proprioception, and manual dexterity in children with autism spectrum disorders. *Neural Plast* 2016 ; 2016 : 1723401.
24. Fan YT, Chen C, Chen SC, et al. Empathic arousal and social understanding in individuals with autism: evidence from fMRI and ERP measurements. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2014 ; 9 : 1203-13.
25. Orefice LL. Peripheral somatosensory neuron dysfunction: emerging roles in autism spectrum disorders. *Neuroscience* 2020 ; 445 : 120-9.
26. Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism: a developmental perspective. *J Anatomy* 2017 ; 230 : 4-15.
27. Riquelme I, Hatem SM, Montoya P. Reduction of pain sensitivity after somatosensory therapy in children with autism spectrum disorders. *J Abnorm Child Psychol* 2018 ; 46 : 1731-40.
28. Orefice LL, Zimmerman AL, Chirila AM, et al. Peripheral mechanosensory neuron dysfunction underlies tactile and behavioral deficits in mouse models of ASDs. *Cell* 2016 ; 166 : 299-313.
29. Bhattacherjee A, Winter MK, Eggmann LS, et al. Motor, somatosensory, viscerosensory and metabolic impairments in a heterozygous female rat model of rett syndrome. *Int J Mol Sci* 2018 ; 19 : 97.
30. Das I, Estevez MA, Sarkar AA, et al. A multifaceted approach for analyzing complex phenotypic data in rodent models of autism. *Mol Autism* 2019 ; 10 : 11.
31. Song TJ, Lan XY, Wei MP, et al. Altered behaviors and impaired synaptic function in a novel rat model with a complete Shank3 deletion. *Front Cell Neurosci* 2019 ; 13 : 111.
32. Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 2005 ; 30 : 80-9.
33. Castro K, Baronio D, Perry IS, et al. The effect of ketogenic diet in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Nutr Neurosci* 2017 ; 20 : 343-50.
34. Bossu JL, Roux S. Les modèles animaux d'étude de l'autisme : le modèle valproate. *Med Sci* 2019 ; 35 : 236-43.
35. Wang L, Almeida LEF, Nettleton M, et al. Altered nocifensive behavior in animal models of autism spectrum disorder: The role of the nicotinic cholinergic system. *Neuropharmacology* 2016 ; 111 : 323-34.

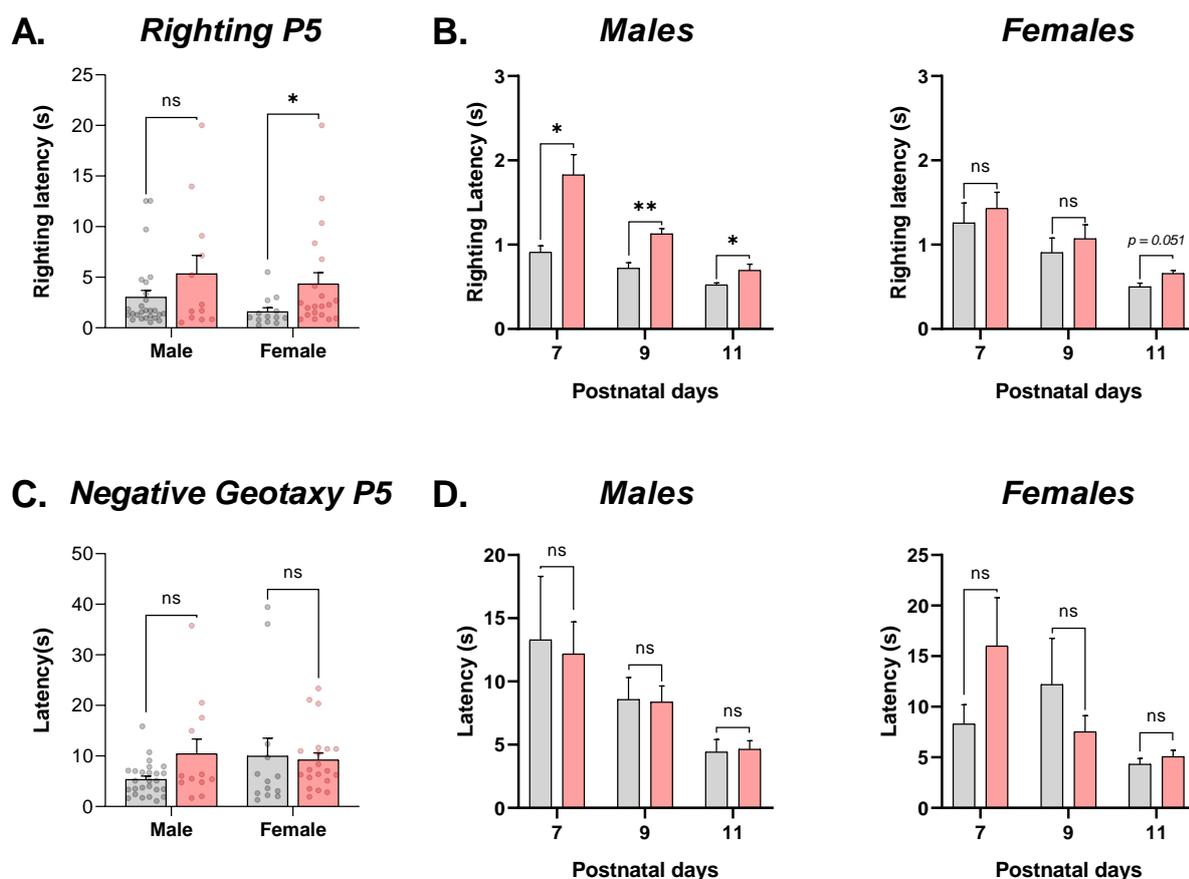
RÉFÉRENCES

36. Wu HF, Chen PS, Chen YJ, *et al.* Alleviation of N-methyl-d-aspartate receptor-dependent long-term depression via regulation of the glycogen synthase kinase-3 pathway in the amygdala of a valproic acid-induced animal model of autism. *Mol Neurobiol* 2017 ; 54 : 5264-76.
37. Mohammadi S, Asadi-Shekaari M, Basiri M, *et al.* Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of NMDA receptor function. *Psychopharmacology* 2020 ; 237 : 199-208.
38. Baronio D, Castro K, Gonchoroski T, *et al.* Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0116363.
39. Ko HG, Oh SB, Zhuo M, *et al.* Reduced acute nociception and chronic pain in Shank2^{-/-} mice. *Mol Pain* 2016 ; 12 : 1744806916647056.
40. Yoon SY, Kwon SG, Kim YH, *et al.* A critical role of spinal Shank2 proteins in NMDA-induced pain hypersensitivity. *Mol Pain* 2017 ; 13 : 1-9.
41. Nakajima R, Takao K, Hattori S, *et al.* Comprehensive behavioral analysis of heterozygous *Syngap1* knockout mice. *Neuropsychopharmacol Reports* 2019 ; 39 : 223-37.
42. Bhattacherjee A, Mu Y, Winter MK, *et al.* Neuronal cytoskeletal gene dysregulation and mechanical hypersensitivity in a rat model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E6952-61.
43. Han Q, Kim YH, Wang X, *et al.* SHANK3 deficiency impairs heat hyperalgesia and trpv1 signaling in primary sensory neurons. *Neuron* 2016 ; 92 : 1279-93.
44. Price TJ, Rashid MH, Millecamps M, *et al.* Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *J Neurosci* 2007 ; 27 : 13958-67.
45. Orefice LL, Mosko JR, Morency DT, *et al.* Targeting peripheral somatosensory neurons to improve tactile-related phenotypes in ASD models. *Cell* 2019 ; 178 : 867-86.
46. He Q, Arroyo ED, Smukowski SN, *et al.* Critical period inhibition of NKCC1 rectifies synapse plasticity in the somatosensory cortex and restores adult tactile response maps in fragile X mice. *Mol Psychiatry* 2019 ; 24 : 1732-47.
47. Bird G, Silani G, Brindley R, *et al.* Empathic brain responses in insula are modulated by levels of alexithymia but not autism. *Brain* 2010 ; 133 : 1515-25.
48. DeLorey TM, Sahbaie P, Hashemi E, *et al.* Somatosensory and sensorimotor consequences associated with the heterozygous disruption of the autism candidate gene, *Gabrb3*. *Behav Brain Res* 2011 ; 216 : 36-45.

TIRÉS À PART

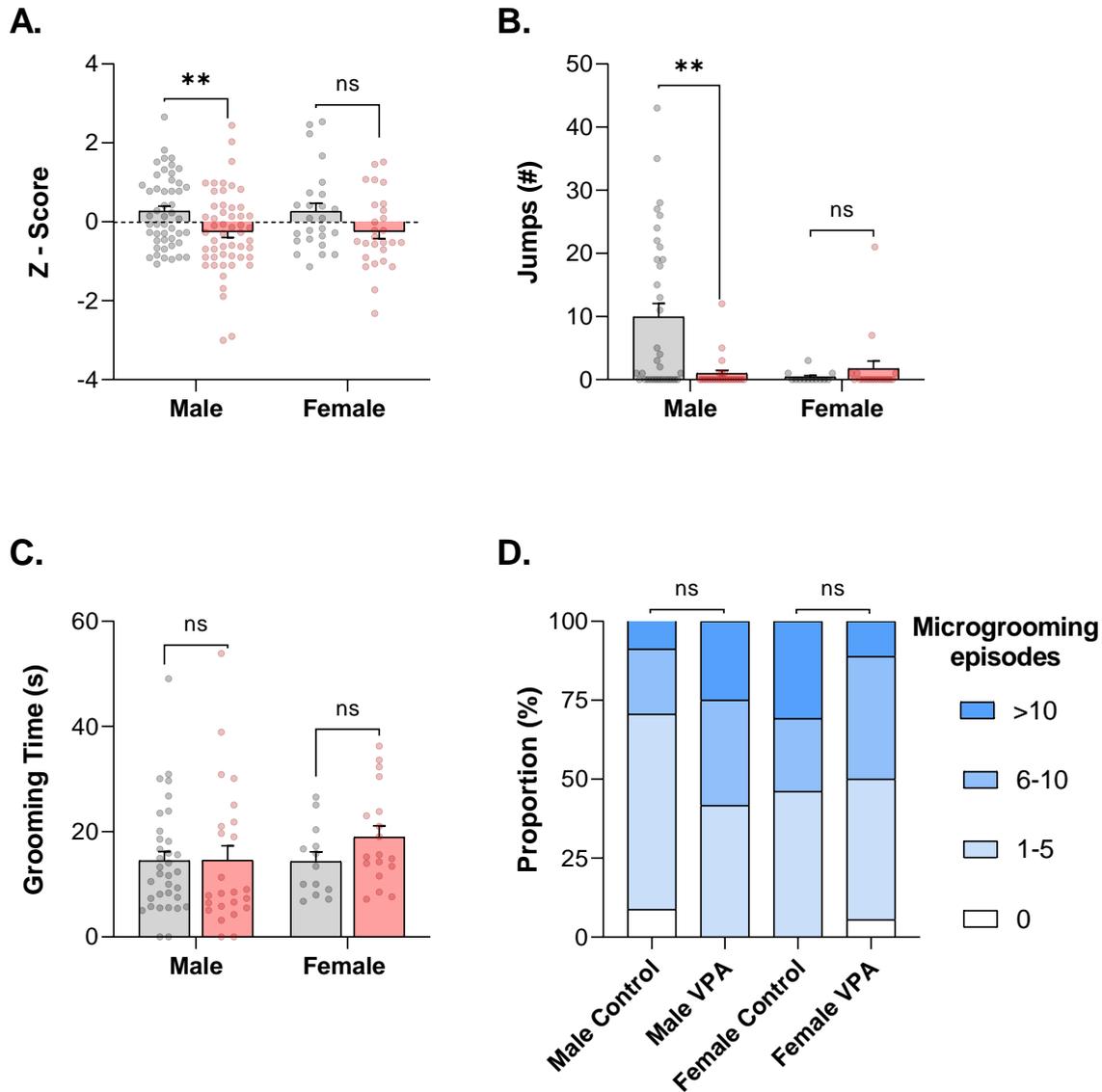
A. Furlan





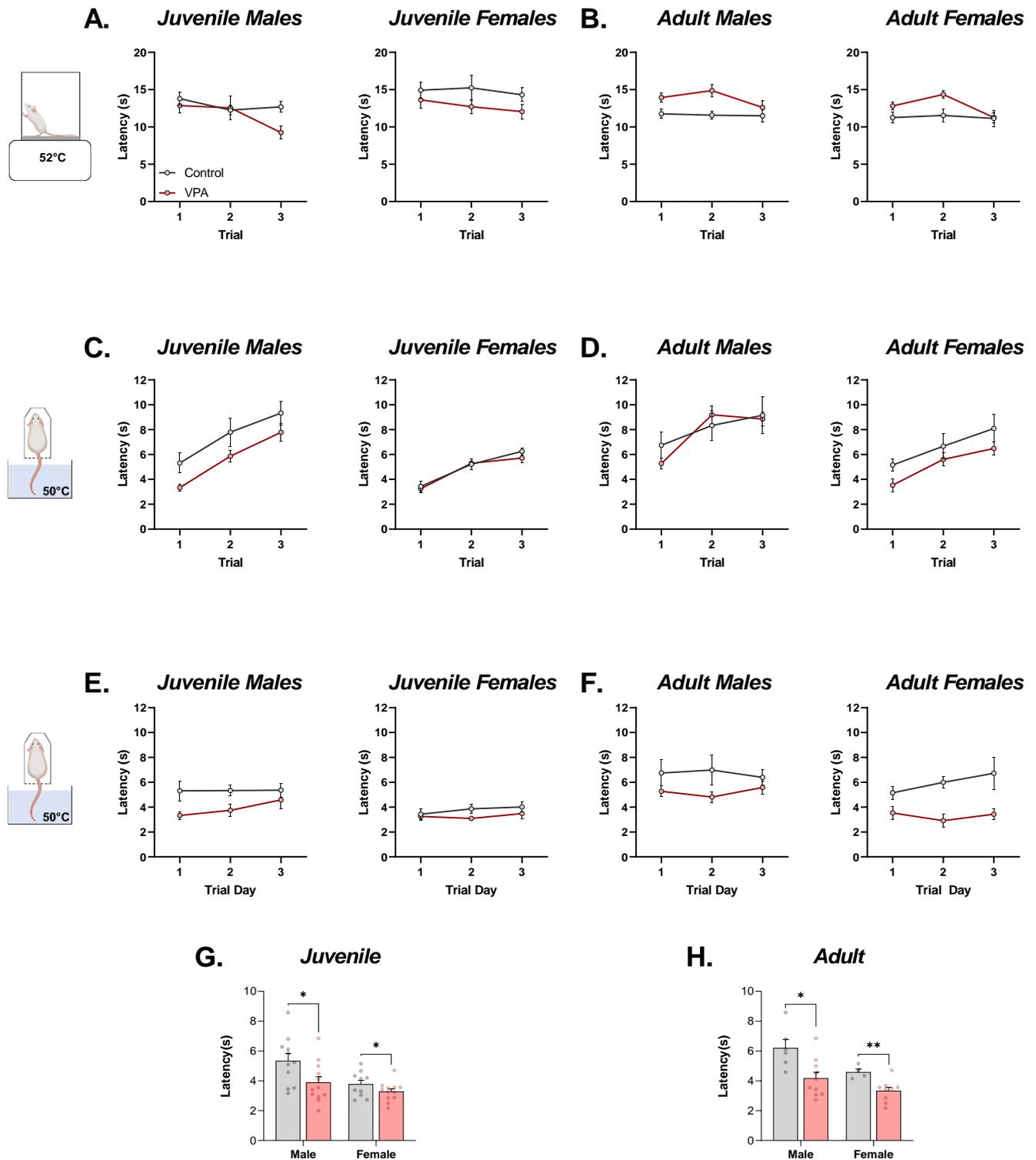
Annexe 2. Tests sensori-moteurs à différents âges du développement.

Latence du souriceau pour se retourner à P5. Nous observons une augmentation significative de la latence chez les femelles VPA (Test sur les rangs de Wilcoxon) (A). Latence du souriceau pour se retourner à P7, P9 et P11 sur un lot d'animaux différent de (A). Nous observons une augmentation significative de la latence chez les mâles VPA à tous les âges alors que seulement une tendance est observée pour les femelles VPA à P11 (Test sur les rangs de Wilcoxon) (B). Latence du souriceau pour se retourner tête orientée en haut de la pente (45°). Nous n'observons aucune différence significative (Test sur les rangs de Wilcoxon) (C). Latence du souriceau pour se retourner tête orientée en haut de la pente (45°) à P7, P9 et P11 sur un lot d'animaux différent de (C). Nous n'observons aucune différence significative (Test sur les rangs de Wilcoxon) (D). Les groupes contrôles sont représentés en gris et le groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



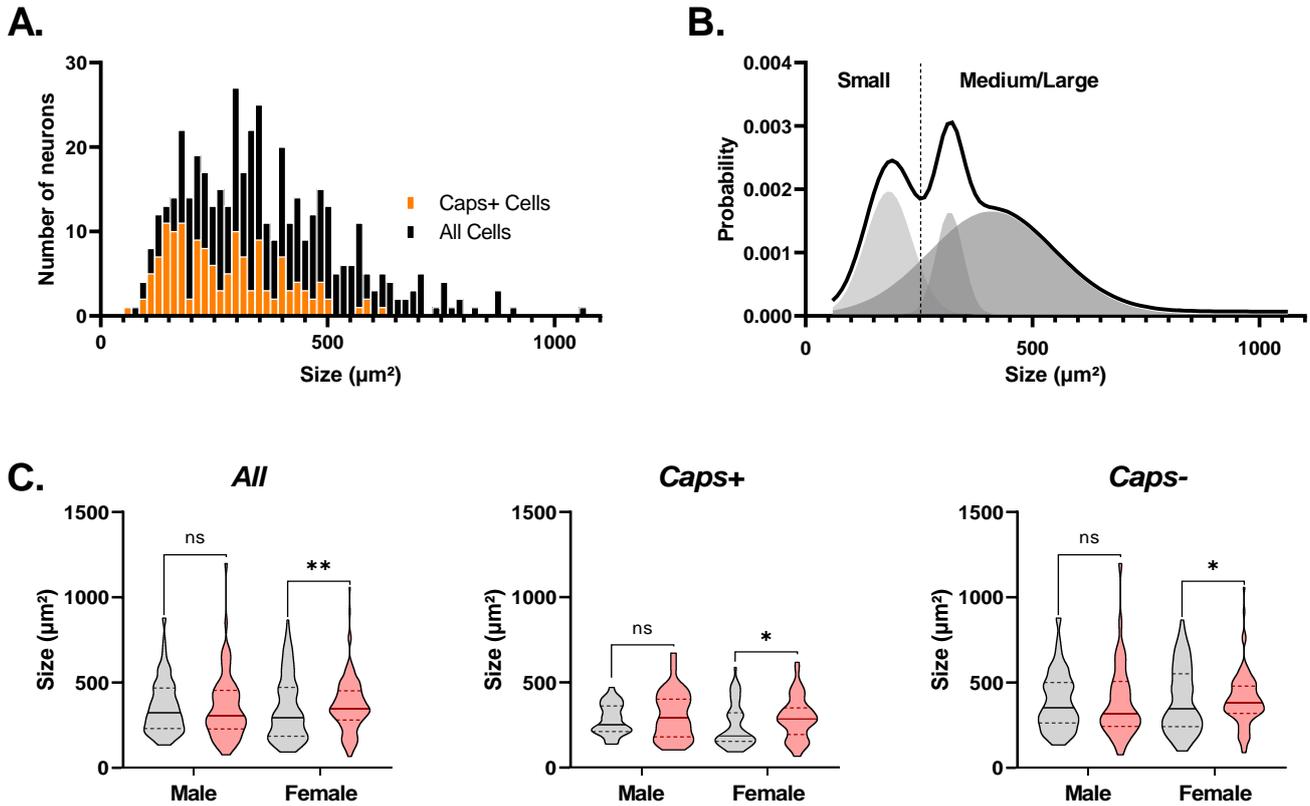
Annexe 3. Comportements TSA-like

Combinaison des données issues de la préférence sociale et de l'interaction sociale directe sous forme d'un index de sociabilité composite normalisé. On observe une diminution significative du Z-score de sociabilité chez les mâles VPA (t-test de Welch) (A). Quantification du nombre de sauts durant 5min dans un bécher. Les mâles VPA présentent une diminution significative du nombre de saut suggérant une réduction des comportements d'échappement (B). Les données en (A) et (B) sont représentées avec moyenne \pm SEM, chaque point représente un animal. Quantification du temps passé à se toiletter durant 5min dans un bécher. Aucune différence significative n'est observée (t-test de Welch) (C). Proportion du nombre d'épisodes de « micro-toilettes » (< 2s) durant 5min dans un bécher. Les mâles VPA ont une proportion plus importante d'animaux avec un nombre d'épisodes > 5 mais cette différence n'est pas significative (Test exact de Fisher) (D). Les données sont représentées avec moyenne \pm SEM ou en proportion, chaque point représente un animal. Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



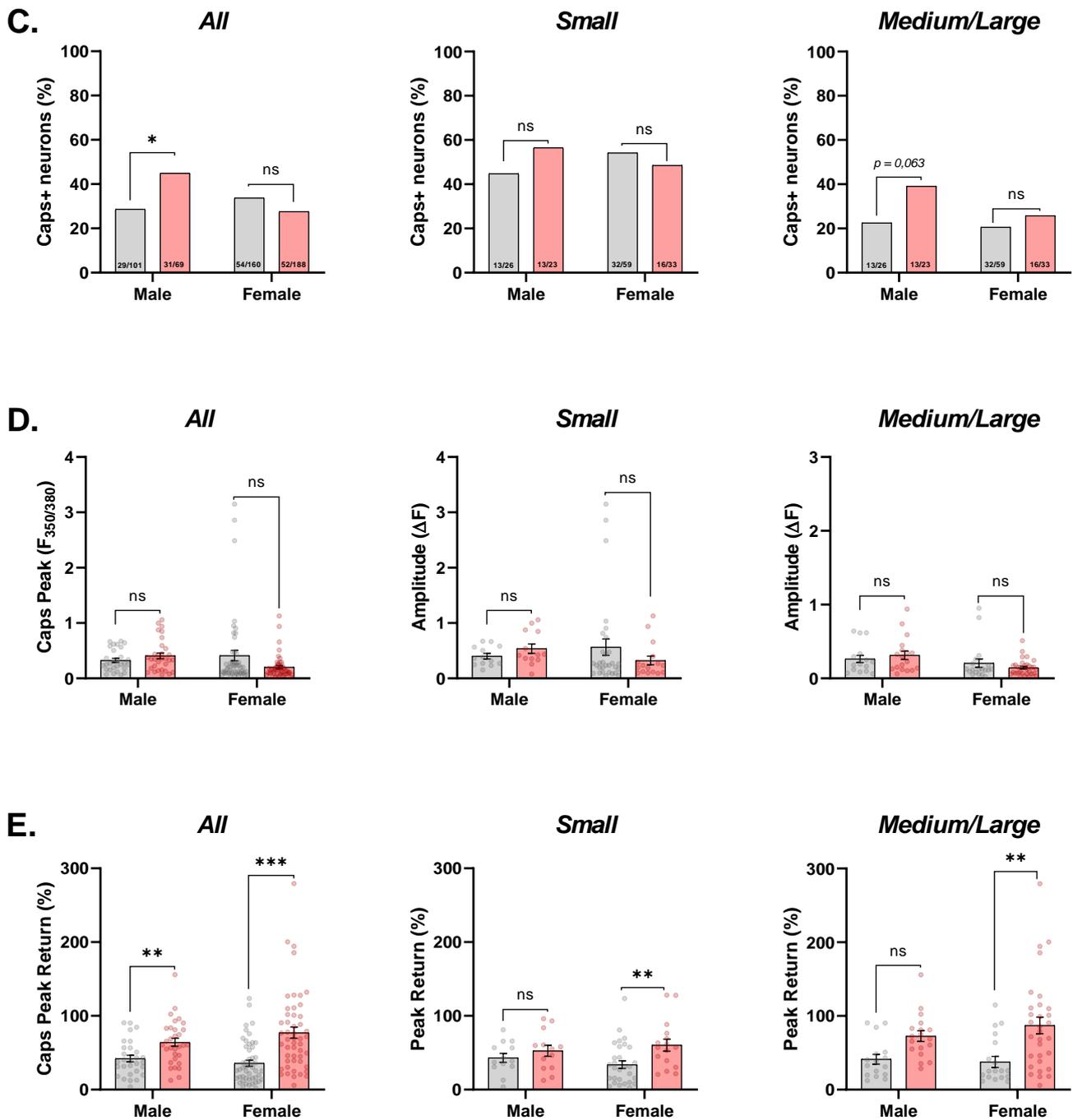
Annexe 4. La variabilité inter et intra-test des animaux VPA

Illustration de trois mesures successives dans le test de la plaque chaude à 52°C chez les animaux juvéniles (A) et Adultes (B). Alors que la latence de réponse des contrôles est stable, celle des VPA démontre une variabilité importante entre les essais. Représentation de trois mesures successives dans le test de l'immersion de la queue (50°C) chez les animaux juvéniles (C) et Adultes (D). La réalisation de mesures successives entraîne une augmentation de la latence de retrait, probablement par diminution progressive de la différence entre la température cutanée de la queue et la température de l'eau comme décrit précédemment⁴²². Représentation de la moyenne des trois mesures sur trois jours consécutifs dans le test de l'immersion de la queue (50°C) chez les animaux juvéniles (G) et Adultes (H). Les animaux VPA juvéniles et adultes, mâles et femelles présentent des latences de retrait de la queue inférieures à leurs contrôles respectifs, suggérant une sensibilité augmentée. Les données sont représentées avec moyenne \pm SEM, chaque point représente un animal. Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



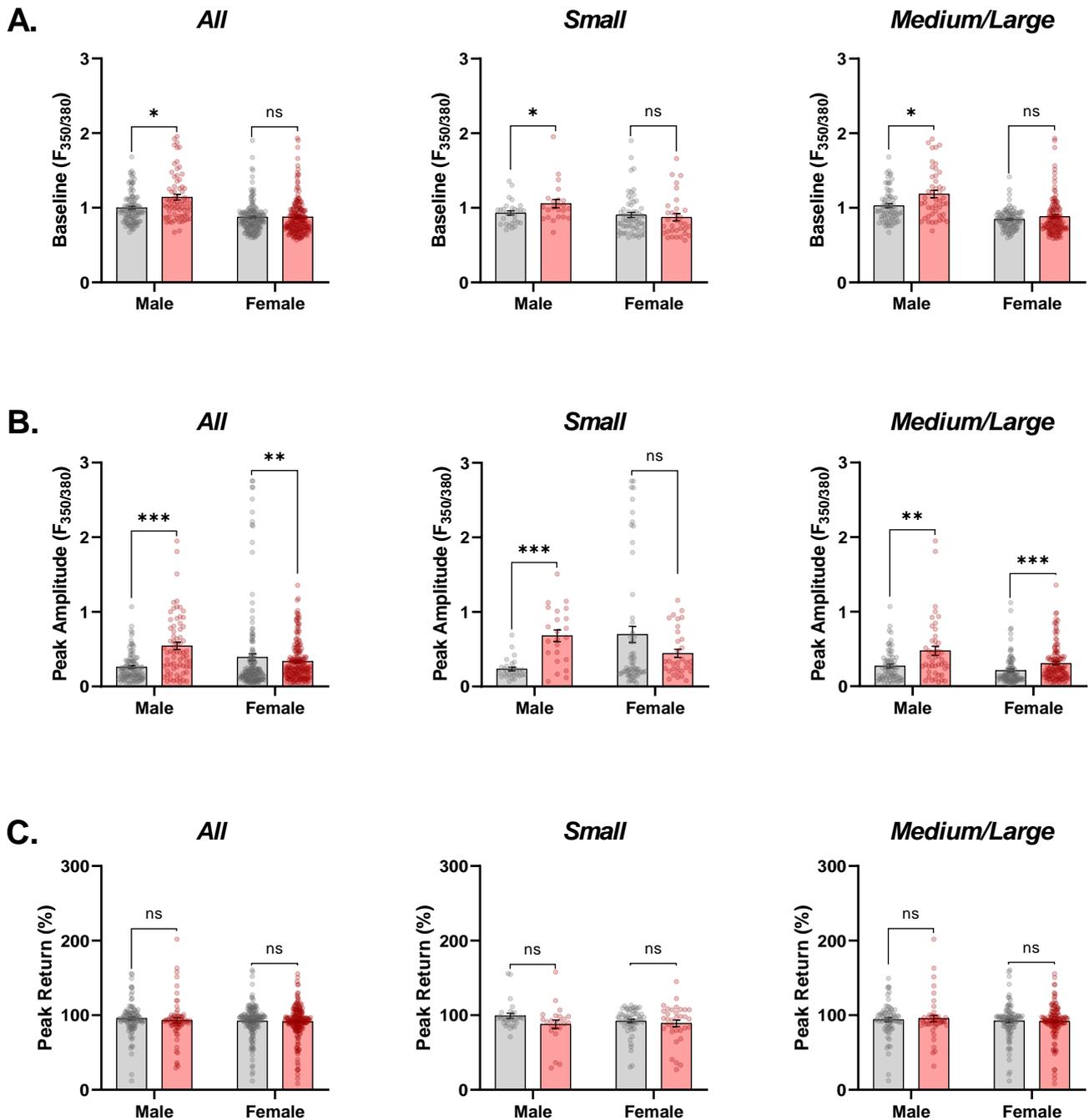
Annexe 5. Distribution de la taille des neurones de DRG en culture.

Histogramme de distribution des tailles de tous les neurones (*All cells*, noir) et des neurones répondant à la capsaïcine (*Caps+ Cells*, orange). Les cellules caps+ sont principalement des cellules de petite ou moyenne taille (A). Représentation d'un fit à trois gaussienne illustrant les populations de cellules de petite (*small*), moyenne (*medium*) et grosse (*large*) taille (B). Cette courbe démontre un creux à $250 \mu\text{m}^2$, défini comme seuil pour l'analyse par taille entre les petites (*small*) et de moyenne/grosses (*medium/large*) cellules. Distribution des tailles de cellules en fonction du sexe et du traitement de toutes les cellules, des cellules sensibles à la capsaïcine (caps+) et des cellules insensibles à la capsaïcine (caps-) (C). Les cultures de neurones de femelles VPA démontrent une distribution de taille différente de leur contrôle. Les données sont représentées en *violin plot* avec médiane (ligne pleine), premier et troisième quartiles (lignes brisée). Les groupes contrôles sont représentés en gris et le groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



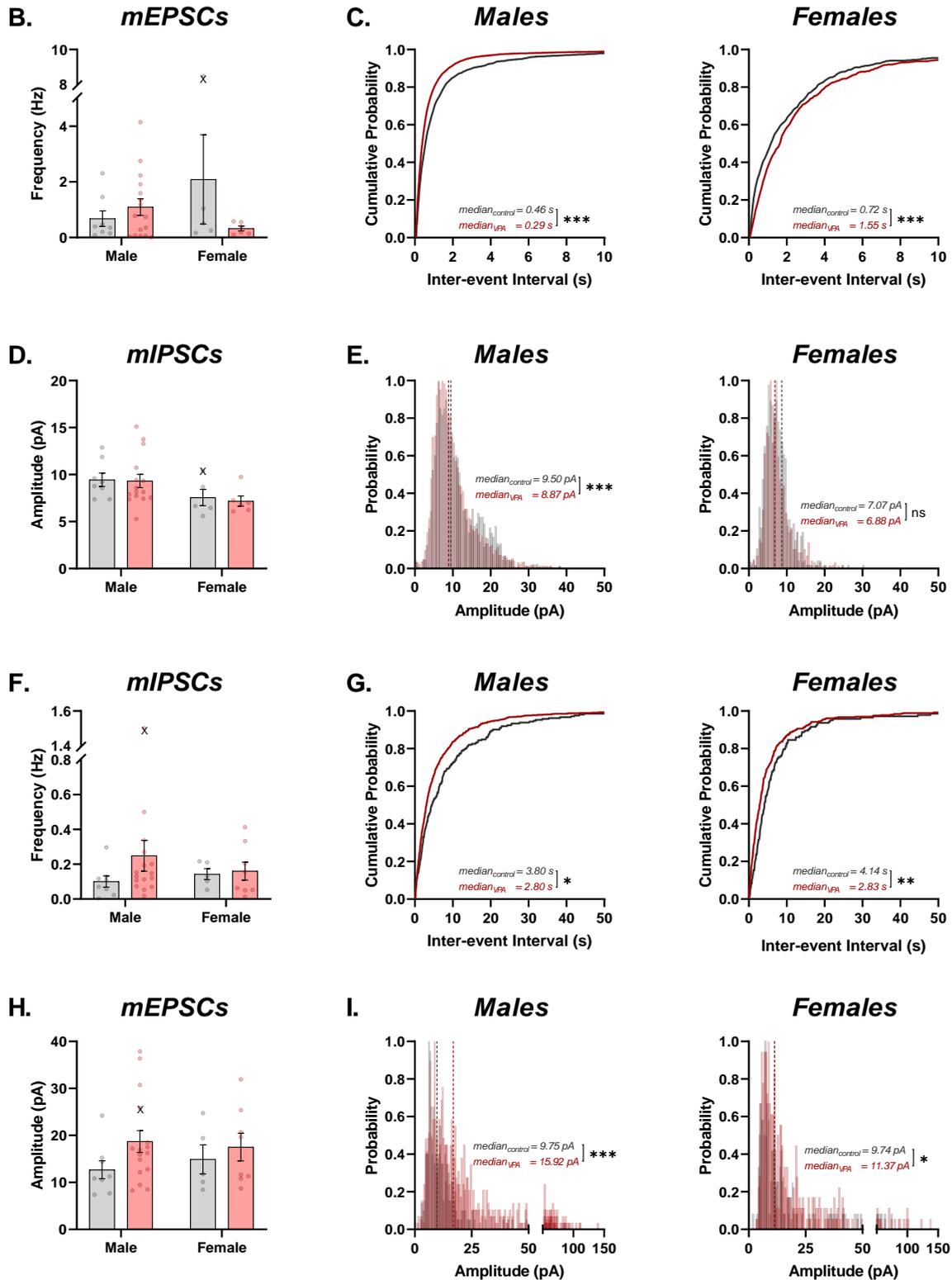
Annexe 6. Réponse à la capsaïcine de neurones sensoriels de différentes tailles en culture.

Pourcentage de neurones répondant à une application de capsaïcine (1 μ M, 10s) en considérant tous les neurones (All), les petits neurones (<250 μ m², *Small*) et les moyens/gros neurones (>250 μ m², *Medium/Large*) (A). L'augmentation de la proportion observée chez les mâles VPA semble être due à une tendance dans les moyen/gros neurones (Tests exacts de Fisher). Amplitude de la réponse calcique en réponse à une application de capsaïcine (1 μ M, 10s) de tous les neurones (All), des petits neurones (<250 μ m², *Small*) et des moyens/gros neurones (>250 μ m², *Medium/Large*) (B). Aucune différence statistiquement significative n'est observée (Test sur les rangs de Wilcoxon). Pourcentage de retour du pic de la réponse, 100 secondes après une application de capsaïcine (1 μ M, 10s) de tous les neurones (All), des petits neurones (<250 μ m², *Small*) et des moyens/gros neurones (>250 μ m², *Medium/Large*) (C). L'augmentation du retour de pic, reflet indirect de la cinétique de la réponse, est significative chez les mâles VPA en regroupant tous les neurones alors qu'elle est significativement différente pour les deux catégories de tailles séparément chez les femelles VPA (Test sur les rangs de Wilcoxon). Les données sont représentées avec moyenne \pm SEM, chaque point représente un neurone. Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



Annexe 7. Réponse à une dépolarisation de neurones sensoriels de différentes tailles en culture.

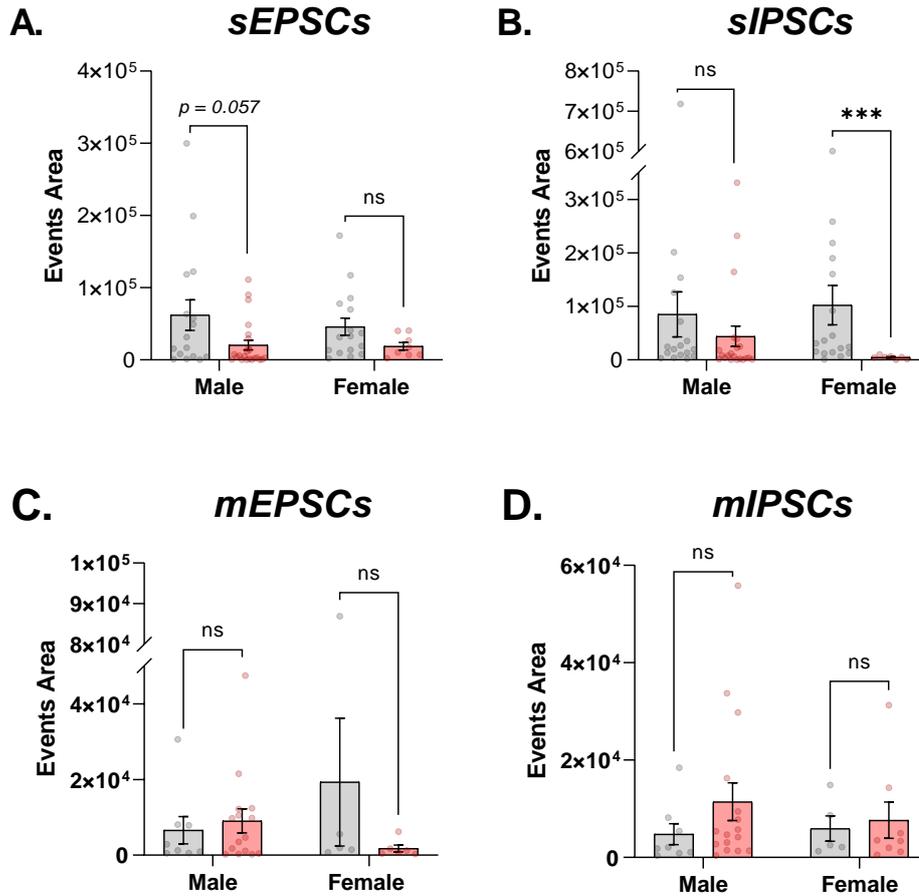
Fluorescence basale, reflet indirect du calcium libre cytosolique, tous les neurones (*All*), des petits neurones ($<250\mu\text{m}^2$, *Small*) et des moyens/gros neurones ($>250\mu\text{m}^2$, *Medium/Large*) (A). L'augmentation de la proportion observée chez les mâles VPA semble être due à une tendance dans les moyen/gros neurones (Tests exacts de Fisher). Amplitude de la réponse calcique en réponse à une application de potassium (50mM, 5s) de tous les neurones (*All*), des petits neurones ($<250\mu\text{m}^2$, *Small*) et des moyens/gros neurones ($>250\mu\text{m}^2$, *Medium/Large*) (B). L'augmentation de l'amplitude de la réponse chez les mâles VPA est retrouvée dans les deux catégories de tailles alors que chez les femelles VPA, une augmentation de l'amplitude est retrouvée que chez les moyen/gros neurones (Test sur les rangs de Wilcoxon). Pourcentage de retour du pic de la réponse, 100 secondes après une application de potassium (50mM, 5s) de tous les neurones (*All*), des petits neurones ($<250\mu\text{m}^2$, *Small*) et des moyens/gros neurones ($>250\mu\text{m}^2$, *Medium/Large*) (C). Aucune différence statistiquement significative n'est observée (Test sur les rangs de Wilcoxon). Les données sont représentées avec moyenne \pm SEM, chaque point représente un neurone. Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



Annexe 8. Transmission synaptique miniature dans la Lamina II de la CDME.

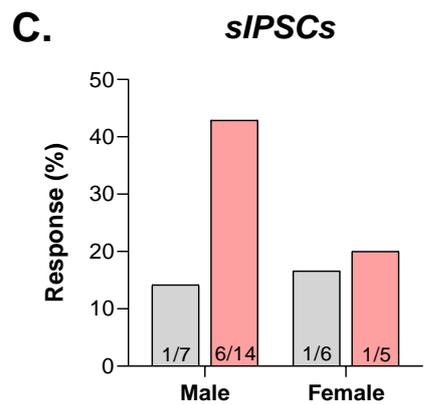
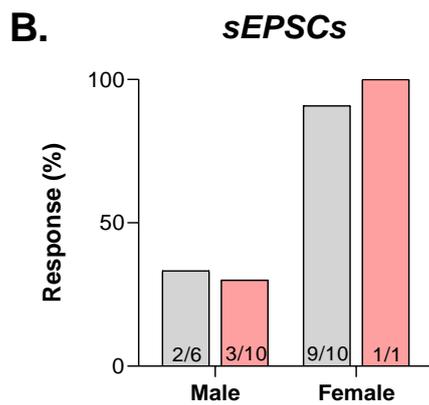
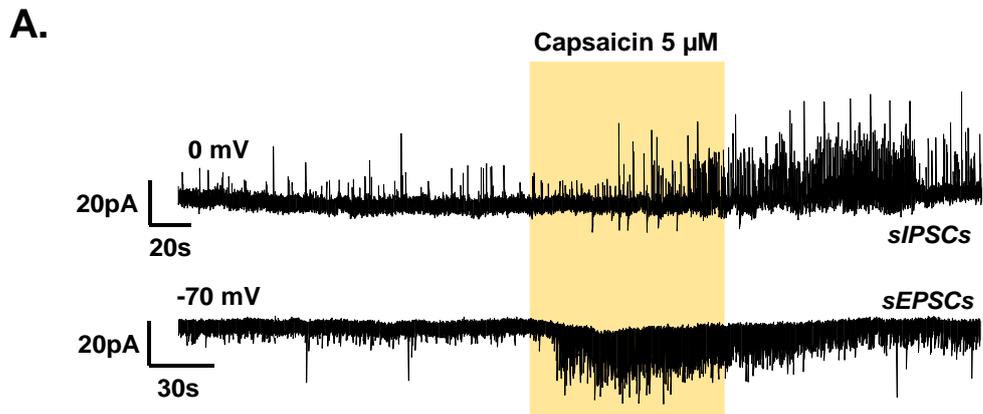
Traces représentatives d'enregistrements *patch-clamp* configuration cellule entière, mode potentiel imposé à -70mV et à 0mV pour l'observation des courant post-synaptique excitateurs (mEPSCs) et inhibiteurs (mIPSCs) respectivement dans les neurones de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière en présence de tétrotoxine (TTX, 1 μ M) (A). Fréquence des mEPSCs sur une période de 5min exprimée à l'aide de la moyenne \pm SEM, chaque point représentant une cellule (B). Distribution cumulée des intervalles inter-mEPSCs dans toutes les cellules combinées. Les neurones d'animaux VPA démontre une distribution différente de leurs contrôles respectifs (Test de Kolmogorov- Smirnov) et une diminution significative de l'intervalle médian (Test des médianes de Mood) (C). Amplitude moyenne des mEPSCs sur une période de 5min exprimée à l'aide de la moyenne \pm SEM, chaque point représentant une cellule (D). Histogramme de distribution de l'amplitude des mEPSCs dans toutes les cellules combinées. Les neurones de mâles VPA démontre une distribution d'amplitude différente des mâles contrôles (Test de Kolmogorov- Smirnov) et une diminution significative de l'amplitude médiane (Test des médianes de Mood) (E). Fréquence des mIPSCs sur une période de 5min exprimée à l'aide de la moyenne \pm SEM, chaque point représentant une cellule (B). Distribution cumulée des intervalles inter-mIPSCs dans toutes les cellules combinées. Les neurones d'animaux VPA démontre une distribution différente de leurs contrôles respectifs (Test de Kolmogorov- Smirnov) et une augmentation significative de l'intervalle médian (Test des médianes de Mood) (C). Amplitude moyenne des mIPSCs sur une période de 5min exprimée à l'aide de la moyenne \pm SEM, chaque point représentant une cellule (D). Histogramme de distribution de l'amplitude des mIPSCs dans toutes les cellules combinées. Les neurones d'animaux VPA démontre une distribution d'amplitude différente de leurs contrôles respectifs (Test de Kolmogorov- Smirnov)

et une augmentation significative de l'amplitude médiane (Test des médianes de Mood) (E). Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (ns : $p > 0.06$, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).



Annexe 9. Quantification de la transmission synaptique dans les neurones de la Lamina II.

Somme de l'aire sous la courbe pour chaque cellule des sEPSCs (A), sIPSCs (B), mEPSCs (C) et mIPSCs (D). Une tendance à une diminution de la transmission spontanée excitatrice est observée chez les mâles VPA alors qu'une diminution significative de la transmission spontanée inhibitrice est observée chez les femelles VPA. Aucune différence significative n'est observée pour la transmission synaptique miniature, en présence de TTX. Les données sont représentées avec moyenne \pm SEM, chaque point représente une cellule. Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge. La significativité statistique est exprimée avec (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



Annexe 10. Effet de la capsaïcine sur la transmission synaptique spontanée dans la Lamina II.

Traces représentatives d'enregistrements *patch-clamp* configuration cellule entière, mode potentiel imposé à -70mV et à 0mV pour l'observation des courant post-synaptique excitateurs (mEPSCs) et inhibiteurs (mIPSCs) respectivement dans les neurones de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière avec une application de capsaïcine (5 μ M, 90s). La capsaïcine entraîne une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des sEPSCs et des sIPSCs (A). Proportion d'augmentation de fréquence des sEPSCs induite par une application de capsaïcine (B). Proportion d'augmentation de fréquence des sIPSCs induite par une application de capsaïcine (C). Les groupes contrôles sont représentés en gris et les groupe VPA en rouge.

BIBLIOGRAPHIE

1. Définitions : autisme - Dictionnaire de français Larousse. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/autisme/6565>.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®), Fifth Edition*. American Psychiatric Association (2013).
3. Lord, C. *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6**, (2020).
4. Wolff, S. The history of autism. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **13**, 201–208 (2004).
5. Manouilenko, I. & Bejerot, S. Sukhareva - Prior to Asperger and Kanner. *Nord. J. Psychiatry* **69**, 1761–1764 (2015).
6. Chown, N. & Hughes, L. History and First Descriptions of Autism: Asperger Versus Kanner Revisited. *J. Autism Dev. Disord.* **46**, 2270–2272 (2016).
7. Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child* **2**, 217–250 (1943).
8. Asperger, H. Die 'Autistischen Psychopathen' im Kindesalter. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* **117**, 76–136 (1944).
9. Wing, L. Autistic spectrum disorders. *British Medical Journal* vol. 312 327–328 (1996).
10. Collège national des universitaires en psychiatrie; Association pour l'enseignement de la sémiologie psychiatrique; Collège universitaire national des enseignants en addictologie. Troubles du Spectre de l'Autisme. in *Référentiel de Psychiatrie et d'Addictologie* 282–286 (2021).
11. Katusic, M. Z., Myers, S. M., Weaver, A. L. & Voigt, R. G. IQ in Autism Spectrum Disorder: A Population-Based Birth Cohort Study. *Pediatrics* **148**, (2021).
12. Lai, M. C. *et al.* Prevalence of co-occurring mental health diagnoses in the autism population: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Psychiatry* **6**, 819–829 (2019).
13. Havdahl, A. & Bishop, S. Heterogeneity in prevalence of co-occurring psychiatric conditions in autism. *The Lancet Psychiatry* **6**, 794–795 (2019).
14. Baxter, A. J. *et al.* The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol. Med.* **45**, 601–613 (2015).
15. Maenner, M. J. *et al.* 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**, 1–16 (2021).
16. Magnusson, C. *et al.* Migration and autism spectrum disorder: population-based study. *Br. J. Psychiatry* **201**, 109–115 (2012).
17. Dyches, T. T., Wilder, L. K., Sudweeks, R. R., Obiakor, F. E. & Algozzine, B. Multicultural issues in autism. *J. Autism Dev. Disord.* **34**, 211–222 (2004).
18. Keen, D. V., Reid, F. D. & Arnone, D. Autism, ethnicity and maternal immigration. *Br. J. Psychiatry* **196**, 274–281 (2010).
19. Elsabbagh, M. *et al.* Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res.* **5**, 160–179 (2012).
20. Tromans, S., Chester, V., Kiani, R., Alexander, R. & Brugha, T. The Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Adult Psychiatric Inpatients: A Systematic Review. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Health* **14**, 177–187 (2018).
21. 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* **56**, 466–474 (2017).
22. Velikonja, T., Fett, A. K. & Velthorst, E. Patterns of Nonsocial and Social Cognitive Functioning in Adults With Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA psychiatry* **76**, 135–151 (2019).
23. Lai, M. C., Lombardo, M. V. & Baron-Cohen, S. Autism. *Lancet (London, England)* **383**, 896–910 (2014).
24. Andreou, M. & Skrimpa, V. Theory of Mind Deficits and Neurophysiological Operations in Autism Spectrum Disorders: A Review. *Brain Sci.* **10**, 1–12 (2020).
25. Modabbernia, A., Velthorst, E. & Reichenberg, A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol. Autism* **8**, (2017).
26. Wu, S. *et al.* Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr. Scand.* **135**, 29–41 (2017).
27. De La Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L. & Geschwind, D. H. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nat. Med.* **22**, 345–361 (2016).
28. Sandin, S. *et al.* The familial risk of autism. *JAMA* **311**, 1770–1777 (2014).
29. Bourgeron, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 551–563 (2015).
30. Huguet, G., Ey, E. & Bourgeron, T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **14**, 191–213 (2013).
31. Iossifov, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216–221 (2014).
32. De Rubeis, S. *et al.* Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**, 209–215 (2014).
33. Devlin, B. & Scherer, S. W. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 229–237 (2012).
34. Sestan, N. & State, M. W. Lost in Translation: Traversing the Complex Path from Genomics to Therapeutics in Autism Spectrum Disorder. *Neuron* **100**, 406–423 (2018).
35. Doyle-Thomas, K. A. R. *et al.* Atypical functional brain connectivity during rest in autism spectrum disorders. *Ann. Neurol.* **77**, 866–876 (2015).
36. Supekar, K. *et al.* Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Rep.* **5**, 738–747 (2013).
37. Wolff, J. J. *et al.* Neural circuitry at age 6 months associated with later repetitive behavior and sensory responsiveness in autism. *Mol. Autism* **8**, (2017).
38. Hazlett, H. C. *et al.* Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature* **542**, 348–351 (2017).
39. Smith, E. *et al.* Cortical thickness change in autism during early childhood. *Hum. Brain Mapp.* **37**, 2616–2629 (2016).
40. Emerson, R. W. *et al.* Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
41. Wolff, J. J. *et al.* Differences in white matter fiber tract development present from 6 to 24 months in infants with autism. *Am. J. Psychiatry* **169**, 589–600 (2012).
42. Uddin, L. Q., Dajani, D. R., Voorhies, W., Bednarz, H. & Kana, R. K. Progress and roadblocks in the search for brain-based biomarkers of autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Transl. Psychiatry* **7**, (2017).
43. Cantor, D. S., Thatcher, R. W., Hrybyk, M. & Kaye, H. Computerized EEG analyses of autistic children. *J. Autism Dev. Disord.* **16**, 169–187 (1986).
44. Lefebvre, A. *et al.* Alpha Waves as a Neuromarker of Autism Spectrum Disorder: The Challenge of Reproducibility and Heterogeneity. *Front. Neurosci.* **12**, (2018).
45. Tierney, A. L., Gabard-Durnam, L., Vogel-Farley, V., Tager-Flusberg, H. & Nelson, C. A. Developmental trajectories of resting EEG power: an endophenotype of autism spectrum disorder. *PLoS One* **7**, (2012).
46. Marco, E. J., Hinkley, L. B. N., Hill, S. S. & Nagarajan, S. S. Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings. *Pediatr. Res.* **69**, (2011).
47. Schwartz, S., Shinn-Cunningham, B. & Tager-Flusberg, H. Meta-analysis and systematic review of the literature characterizing auditory mismatch negativity in individuals with autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **87**, 106–117 (2018).
48. Kang, E. *et al.* Atypicality of the N170 Event-Related Potential in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Biol. psychiatry. Cogn. Neurosci. neuroimaging* **3**, 657–666 (2018).
49. Rippon, G., Brock, J., Brown, C. & Boucher, J. Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the 'new psychophysiology'. *Int. J. Psychophysiol.* **63**, 164–172 (2007).
50. Rosenberg, A., Patterson, J. S. & Angelaki, D. E. A computational perspective on autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 9158–9165 (2015).
51. Masuda, F. *et al.* Motor cortex excitability and inhibitory imbalance in autism spectrum disorder assessed with transcranial magnetic stimulation: a systematic review. *Transl. Psychiatry* **9**, (2019).
52. O'Reilly, C., Lewis, J. D. & Elsabbagh, M. Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies. *PLoS One* **12**, (2017).
53. Velmeshev, D. *et al.* Single-cell genomics identifies cell type-specific

- molecular changes in autism. *Science* **364**, 685–689 (2019).
54. Ferri, S. L., Abel, T. & Brodtkin, E. S. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. *Curr. Psychiatry Rep.* **20**, (2018).
 55. Werling, D. M. & Geschwind, D. H. Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **26**, 146–153 (2013).
 56. Christensen, D. L. *et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill. Summ.* **65**, 1 (2016).
 57. Lai, M. C. *et al.* A behavioral comparison of male and female adults with high functioning autism spectrum conditions. *PLoS One* **6**, (2011).
 58. Giarelli, E. *et al.* Sex differences in the evaluation and diagnosis of autism spectrum disorders among children. *Disabil. Health J.* **3**, 107–116 (2010).
 59. Hartley, S. L. & Sikora, D. M. Sex differences in autism spectrum disorder: an examination of developmental functioning, autistic symptoms, and coexisting behavior problems in toddlers. *J. Autism Dev. Disord.* **39**, 1715–1722 (2009).
 60. Solomon, M., Miller, M., Taylor, S. L., Hinshaw, S. P. & Carter, C. S. Autism symptoms and internalizing psychopathology in girls and boys with autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **42**, 48–59 (2012).
 61. Kreiser, N. L. & White, S. W. ASD in females: are we overstating the gender difference in diagnosis? *Clin. Child Fam. Psychol. Rev.* **17**, 67–84 (2014).
 62. Alaerts, K., Swinnen, S. P. & Wenderoth, N. Sex differences in autism: a resting-state fMRI investigation of functional brain connectivity in males and females. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* **11**, 1002–1016 (2016).
 63. Kirkovski, M., Enticott, P. G., Hughes, M. E., Rossell, S. L. & Fitzgerald, P. B. Atypical Neural Activity in Males But Not Females with Autism Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* **46**, 954–963 (2016).
 64. Van Wijngaarden-Cremers, P. J. M. *et al.* Gender and age differences in the core triad of impairments in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *J. Autism Dev. Disord.* **44**, 627–635 (2014).
 65. Head, A. M., McGillivray, J. A. & Stokes, M. A. Gender differences in emotionality and sociability in children with autism spectrum disorders. *Mol. Autism* **5**, (2014).
 66. Backer van Ommeren, T., Koot, H. M., Scheeren, A. M. & Begeer, S. Sex differences in the reciprocal behaviour of children with autism. *Autism* **21**, 795–803 (2017).
 67. Rynkiewicz, A. *et al.* An investigation of the ‘female camouflage effect’ in autism using a computerized ADOS-2 and a test of sex/gender differences. *Mol. Autism* **7**, (2016).
 68. Lai, D. C., Tseng, Y. C., Hou, Y. M. & Guo, H. R. Gender and geographic differences in the prevalence of autism spectrum disorders in children: analysis of data from the national disability registry of Taiwan. *Res. Dev. Disabil.* **33**, 909–915 (2012).
 69. Beggiato, A. *et al.* Gender differences in autism spectrum disorders: Divergence among specific core symptoms. *Autism Res.* **10**, 680–689 (2017).
 70. Frazier, T. W., Georgiades, S., Bishop, S. L. & Hardan, A. Y. Behavioral and cognitive characteristics of females and males with autism in the simons simplex collection. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **53**, (2014).
 71. Koyama, T., Kamio, Y., Inada, N. & Kurita, H. Sex differences in WISC-III profiles of children with high-functioning pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **39**, 135–141 (2009).
 72. Sedgewick, F., Hill, V., Yates, R., Pickering, L. & Pellicano, E. Gender Differences in the Social Motivation and Friendship Experiences of Autistic and Non-autistic Adolescents. *J. Autism Dev. Disord.* **46**, 1297–1306 (2016).
 73. Lehnhardt, F. G. *et al.* Sex-Related Cognitive Profile in Autism Spectrum Disorders Diagnosed Late in Life: Implications for the Female Autistic Phenotype. *J. Autism Dev. Disord.* **46**, 139–154 (2016).
 74. Kauschke, C., van der Beek, B. & Kamp-Becker, I. Narratives of Girls and Boys with Autism Spectrum Disorders: Gender Differences in Narrative Competence and Internal State Language. *J. Autism Dev. Disord.* **46**, 840–852 (2016).
 75. May, T., Cornish, K. & Rinehart, N. Does gender matter? A one year follow-up of autistic, attention and anxiety symptoms in high-functioning children with autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* **44**, 1077–1086 (2014).
 76. Reinhardt, V. P., Wetherby, A. M., Schatschneider, C. & Lord, C. Examination of sex differences in a large sample of young children with autism spectrum disorder and typical development. *J. Autism Dev. Disord.* **45**, 697–706 (2015).
 77. Frazier, T. W. & Hardan, A. Y. Equivalence of symptom dimensions in females and males with autism. *Autism* **21**, 749–759 (2017).
 78. Harrop, C. *et al.* Does gender influence core deficits in ASD? An investigation into social-communication and play of girls and boys with ASD. *J. Autism Dev. Disord.* **45**, 766–777 (2015).
 79. Harrop, C., Gulsrud, A. & Kasari, C. Does Gender Moderate Core Deficits in ASD? An Investigation into Restricted and Repetitive Behaviors in Girls and Boys with ASD. *J. Autism Dev. Disord.* **45**, 3644–3655 (2015).
 80. Pisula, E. *et al.* Behavioral and emotional problems in high-functioning girls and boys with autism spectrum disorders: Parents’ reports and adolescents’ self-reports. *Autism* **21**, 738–748 (2017).
 81. Hiller, R. M., Young, R. L. & Weber, N. Sex differences in autism spectrum disorder based on DSM-5 criteria: evidence from clinician and teacher reporting. *J. Abnorm. Child Psychol.* **42**, 1381–1393 (2014).
 82. Grove, R., Hoekstra, R. A., Wierda, M. & Begeer, S. Exploring sex differences in autistic traits: A factor analytic study of adults with autism. *Autism* **21**, 760–768 (2017).
 83. Little, L. M., Wallisch, A., Salley, B. & Jamison, R. Do early caregiver concerns differ for girls with autism spectrum disorders? *Autism* **21**, 728–732 (2017).
 84. Cridland, E. K., Jones, S. C., Caputi, P. & Magee, C. A. Being a girl in a boys’ world: investigating the experiences of girls with autism spectrum disorders during adolescence. *J. Autism Dev. Disord.* **44**, 1261–1274 (2014).
 85. Bargiela, S., Steward, R. & Mandy, W. The Experiences of Late-diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism Phenotype. *J. Autism Dev. Disord.* **46**, 3281–3294 (2016).
 86. Dean, M., Harwood, R. & Kasari, C. The art of camouflage: Gender differences in the social behaviors of girls and boys with autism spectrum disorder. **21**, 678–689 (2017).
 87. Schaafsma, S. M. *et al.* Sex-specific gene-environment interactions underlying ASD-like behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1383–1388 (2017).
 88. Gilman, S. R. *et al.* Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron* **70**, 898–907 (2011).
 89. Tsai, L., Stewart, M. A. & August, G. Implication of sex differences in the familial transmission of infantile autism. *J. Autism Dev. Disord.* **11**, 165–173 (1981).
 90. Ziats, M. N. & Rennert, O. M. Sex-biased gene expression in the developing brain: implications for autism spectrum disorders. *Mol. Autism* **4**, (2013).
 91. Shi, L., Zhang, Z. & Su, B. Sex Biased Gene Expression Profiling of Human Brains at Major Developmental Stages. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 92. Baron-Cohen, S. *et al.* Elevated fetal steroidogenic activity in autism. *Mol. Psychiatry* **20**, 369–376 (2015).
 93. Suzuki, K. *et al.* Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA psychiatry* **70**, 49–58 (2013).
 94. Thyne, M. D., Bednarz, H. M., Herringshaw, A. J., Sartin, E. B. & Kana, R. K. The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. *Developmental Cognitive Neuroscience* vol. 29 151–167 (2018).
 95. Leekam, S. R., Nieto, C., Libby, S. J., Wing, L. & Gould, J. Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. *J. Autism Dev. Disord.* **37**, 894–910 (2007).
 96. Ben-Sasson, A. *et al.* A meta-analysis of sensory modulation symptoms in individuals with autism spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **39**, 1–11 (2009).
 97. Ausderau, K. K. *et al.* Sensory subtypes in children with autism spectrum disorder: latent profile transition analysis using a national survey of sensory features. *J. Child Psychol. Psychiatry.* **55**, 935–944 (2014).
 98. Johansson, E. & Gillberg, C. Oculomotor findings in autistic children. *J. Laryngol. Otol.* **102**, 435–439 (1988).
 99. Goldberg, M. C. *et al.* Deficits in the initiation of eye movements in the absence of a visual target in adolescents with high functioning autism. *Neuropsychologia* **40**, 2039–2049 (2002).
 100. Robertson, C. E. *et al.* Global motion perception deficits in autism are reflected as early as primary visual cortex. *Brain* **137**, 2588–2599 (2014).

101. Robertson, A. E. & Simmons, D. R. The relationship between sensory sensitivity and autistic traits in the general population. *J. Autism Dev. Disord.* **43**, 775–784 (2013).
102. Hellendoorn, A. *et al.* The relationship between atypical visual processing and social skills in young children with autism. *Res. Dev. Disabil.* **35**, 423–428 (2014).
103. Kern, J. K. *et al.* Sensory correlations in autism. *Autism* **11**, 123–134 (2007).
104. Lane, A. E., Molloy, C. A. & Bishop, S. L. Classification of children with autism spectrum disorder by sensory subtype: a case for sensory-based phenotypes. *Autism Res.* **7**, 322–33 (2014).
105. Franklin, A., Sowden, P., Burley, R., Notman, L. & Alder, E. Color perception in children with autism. *J. Autism Dev. Disord.* **38**, 1837–1847 (2008).
106. Song, Y., Hakoda, Y., Sanefuji, W. & Cheng, C. Can they see it? the functional field of view is narrower in individuals with autism spectrum disorder. *PLoS One* **10**, (2015).
107. Vandenbroucke, M. W. G., Steven Scholte, H., Van Engeland, H., Lamme, V. A. F. & Kemner, C. Coherent versus component motion perception in autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* **38**, 941–949 (2008).
108. Simmons, D. R. *et al.* Vision in autism spectrum disorders. *Vision Research* vol. 49 2705–2739 (2009).
109. Kaiser, M. D. & Shiffrar, M. The visual perception of motion by observers with autism spectrum disorders: A review and synthesis. *Psychonomic Bulletin and Review* vol. 16 761–777 (2009).
110. Jolliffe, T. & Baron-Cohen, S. Are people with autism and Asperger syndrome faster than normal on the Embedded Figures Test? *J. Child Psychol. Psychiatry.* **38**, 527–534 (1997).
111. Kaldy, Z., Kraper, C., Carter, A. S. & Blaser, E. Toddlers with Autism Spectrum Disorder are more successful at visual search than typically developing toddlers. *Dev. Sci.* **14**, 980–988 (2011).
112. Baldassi, S. *et al.* Search superiority in autism within, but not outside the crowding regime. *Vision Res.* **49**, 2151–2156 (2009).
113. Khalfa, S. *et al.* Increased perception of loudness in autism. *Hear. Res.* **198**, 87–92 (2004).
114. Paul, R., Chawarska, K., Fowler, C., Cicchetti, D. & Volkmar, F. ‘Listen my children and you shall hear’: auditory preferences in toddlers with autism spectrum disorders. *J. Speech. Lang. Hear. Res.* **50**, 1350–1364 (2007).
115. Järvinen-Pasley, A., Pasley, J. & Heaton, P. Is the linguistic content of speech less salient than its perceptual features in autism? *J. Autism Dev. Disord.* **38**, 239–248 (2008).
116. Järvinen-Pasley, A., Peppé, S., King-Smith, G. & Heaton, P. The relationship between form and function level receptive prosodic abilities in autism. *J. Autism Dev. Disord.* **38**, 1328–1340 (2008).
117. Lepistö, T. *et al.* Auditory stream segregation in children with Asperger syndrome. *Biol. Psychol.* **82**, 301–307 (2009).
118. Teder-Sälejärvi, W. A., Pierce, K. L., Courchesne, E. & Hillyard, S. A. Auditory spatial localization and attention deficits in autistic adults. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* **23**, 221–234 (2005).
119. Suzuki, Y., Critchley, H. D., Rowe, A., Howlin, P. & Murphy, D. G. M. Impaired olfactory identification in Asperger’s syndrome. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **15**, 105–107 (2003).
120. Bennetto, L., Kuschner, E. S. & Hyman, S. L. Olfaction and Taste Processing in Autism. *Biol. Psychiatry* **62**, 1015–1021 (2007).
121. Dudova, I. *et al.* Odor detection threshold, but not odor identification, is impaired in children with autism. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **20**, 333–340 (2011).
122. Tavassoli, T. & Baron-Cohen, S. Taste identification in adults with autism spectrum conditions. **42**, 1419–1424 (2012).
123. Lane, A. E., Dennis, S. J. & Geraghty, M. E. Brief report: Further evidence of sensory subtypes in autism. *J. Autism Dev. Disord.* **41**, 826–831 (2011).
124. Crane, L., Goddard, L. & Pring, L. Sensory processing in adults with autism spectrum disorders. *Autism* **13**, 215–228 (2009).
125. Ben-Sasson, A. *et al.* Extreme sensory modulation behaviors in toddlers with autism spectrum disorders. *Am. J. Occup. Ther.* **61**, 584–592 (2007).
126. Tomchek, S. D. & Dunn, W. Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. *Am. J. Occup. Ther.* **61**, 190–200 (2007).
127. Cascio, C. *et al.* Tactile perception in adults with autism: A multidimensional psychophysical study. *J. Autism Dev. Disord.* **38**, 127–137 (2008).
128. Blakemore, S. J. *et al.* Tactile sensitivity in Asperger syndrome. **61**, 5–13 (2006).
129. Tannan, V., Holden, J. K., Zhang, Z., Baranek, G. T. & Tommerdahl, M. A. Perceptual metrics of individuals with autism provide evidence for disinhibition. **1**, 223–230 (2008).
130. Bogdashina, O. Sensory perceptual issues in autism and Asperger syndrome: Different sensory experiences--different perceptual worlds. (2003).
131. Danièle Caucal, R. B. Les aspects sensoriels et moteurs de l’autisme. (2010).
132. Fründt, O. *et al.* Quantitative Sensory Testing in adults with Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **47**, 1183–1192 (2017).
133. Williams, Z. J. *et al.* Thermal Perceptual Thresholds are typical in Autism Spectrum Disorder but Strongly Related to Intra-individual Response Variability. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
134. International Association for the Study of Pain | IASP. <https://www.iasp-pain.org/>.
135. Scholz, J. & Woolf, C. J. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* **5 Suppl.**, 1062–7 (2002).
136. Woolf, C. J. & Ma, Q. Nociceptors--Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* vol. 55 353–364 (2007).
137. Todd, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 823–836 (2010).
138. Abraira, V. E. & Ginty, D. D. The sensory neurons of touch. *Neuron* **79**, 618–639 (2013).
139. T, R. & SA, S. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. *TRP Ion Channel Funct. Sens. Transduct. Cell. Signal. Cascades* 91–106 (2007).
140. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nat.* 1997 3896653 **389**, 816–824 (1997).
141. Peirs, C. & Seal, R. P. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* vol. 354 578–584 (2016).
142. Cordero-Erausquin, M., Inquimbert, P., Schlichter, R. & Hugel, S. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* **338**, 230–247 (2016).
143. Peirs, C. *et al.* Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* **87**, 797–812 (2015).
144. Polgár, E., Durrieux, C., Hughes, D. I. & Todd, A. J. A quantitative study of inhibitory interneurons in laminae I–III of the mouse spinal dorsal horn. *PLoS One* **8**, (2013).
145. Fitzgerald, M. The development of nociceptive circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 507–520 (2005).
146. Petitjean, H., Rodeau, J.-L. & Schlichter, R. Interactions between superficial and deep dorsal horn spinal cord neurons in the processing of nociceptive information. *Eur. J. Neurosci.* **36**, 3500–3508 (2012).
147. Almarestani, L., Waters, S. M., Krause, J. E., Bennett, G. J. & Ribeiro-Da-Silva, A. Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **504**, 287–297 (2007).
148. Yu, X. H., Da Silva, A. R. & De Koninck, Y. Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **491**, 56–68 (2005).
149. Djouhri, L. & Lawson, S. N. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **46**, 131–145 (2004).
150. Gangadharan, V. & Kuner, R. Unravelling Spinal Circuits of Pain and Mechanical Allodynia. *Neuron* vol. 87 673–675 (2015).
151. Bourne, S., Machado, A. G. & Nagel, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurgery Clinics of North America* vol. 25 629–638 (2014).
152. Zeilhofer, H. U., Wildner, H. & Yébenes, G. E. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol. Rev.* **92**, 193–235 (2012).
153. Yaksh, T. L. Regulation of spinal nociceptive processing: Where we went when we wandered onto the path marked by the gate. *Pain* **82**, (1999).
154. Moayed, M. & Davis, K. D. Theories of pain: From specificity to gate

- control. *J. Neurophysiol.* **109**, 5–12 (2013).
155. Millan, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* vol. 66 355–474 (2002).
156. Garcia-Larrea, L. & Bastuji, H. Pain and consciousness. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **87**, 193–199 (2018).
157. Bastuji, H. *et al.* Thalamic Responses to Nociceptive-Specific Input in Humans: Functional Dichotomies and Thalamo-Cortical Connectivity. *Cereb. Cortex* **26**, 2663–2676 (2016).
158. Garcia-Larrea, L. & Peyron, R. *Pain matrices and neuropathic pain matrices: A review.* *Pain* vol. 154 S29–S43 (2013).
159. Dum, R. P., Levinthal, D. J. & Strick, P. L. The spinothalamic system targets motor and sensory areas in the cerebral cortex of monkeys. *J. Neurosci.* **29**, 14223–14235 (2009).
160. Garcia-Larrea, L. Insights gained into pain processing from patients with focal brain lesions. *Neurosci. Lett.* **520**, 188–191 (2012).
161. Garcia-Larrea, L. The posterior insular-opercular region and the search of a primary cortex for pain. *Neurophysiol. Clin.* **42**, 299–313 (2012).
162. Van Ryckeghem, D. M. L. & Vervoort, T. Towards an integrative view of cognitive biases in pain. *Eur. J. Pain* **20**, 1201–1202 (2016).
163. Tracey, I. & Mantyh, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* **55**, 377–391 (2007).
164. Wiech, K. Deconstructing the sensation of pain: The influence of cognitive processes on pain perception. *Science* **354**, 584–587 (2016).
165. Kucyi, A. & Davis, K. D. The Neural Code for Pain: From Single-Cell Electrophysiology to the Dynamic Pain Connectome. *Neuroscientist* **23**, 397–414 (2017).
166. Lockwood, S. & Dickenson, A. H. What goes up must come down: insights from studies on descending controls acting on spinal pain processing. *J. Neural Transm.* **127**, 541–549 (2020).
167. Tsuda, M., Koga, K., Chen, T. & Zhuo, M. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. *J. Neurochem.* **141**, 486–498 (2017).
168. Lu, Y. & Perl, E. R. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J. Physiol.* **582**, 127–136 (2007).
169. Accueil - SFETD - Site web de la Société Française d'Etude et du Traitement de la Douleur. <https://www.sfetd-douleur.org/>.
170. Main, C. J. Pain assessment in context: A state of the science review of the McGill pain questionnaire 40 years on. *Pain* **157**, 1387–1399 (2016).
171. Boureau, F., Luu, M. & Doubrère, J. F. Comparative study of the validity of four French McGill Pain Questionnaire (MPQ) versions. *Pain* **50**, 59–65 (1992).
172. Craig, K. D., Versloot, J., Goubert, L., Vervoort, T. & Crombez, G. Perceiving pain in others: automatic and controlled mechanisms. *J. pain* **11**, 101–108 (2010).
173. Craig, K. D. The social communication model of pain. *Can. Psychol.* **50**, 22–32 (2009).
174. Poole, G. D. & Craig, K. D. Judgments of genuine, suppressed, and faked facial expressions of pain. *J. Pers. Soc. Psychol.* **63**, 797–805 (1992).
175. Rolke, R. *et al.* Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur. J. Pain* **10**, 77 (2006).
176. Kyle, B. N. ichola. & McNeil, D. W. Autonomic arousal and experimentally induced pain: a critical review of the literature. *Pain Res. Manag.* **19**, 159–167 (2014).
177. De Jonckheere, J. *et al.* Physiological Signal Processing for Individualized Anti-nociception Management During General Anesthesia: a Review. *Yearbook of medical informatics* vol. 10 95–101 (2015).
178. Argüello, E., Bermeo, L. & Castillo, J. Exploring the Abilities of Peripheral Autonomic Parameters to Describe Pain: Another Dead End? *Pain Physician* **25**, E1–E14 (2022).
179. Mogil, J. S. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 353–365 (2020).
180. Abraham, A. *et al.* Sex differences in neuropathic pain intensity in diabetes. *J. Neurol. Sci.* **388**, 103–106 (2018).
181. Cardinez, N. *et al.* Sex differences in neuropathic pain in longstanding diabetes: Results from the Canadian Study of Longevity in Type 1 Diabetes. *J. Diabetes Complications* **32**, 660–664 (2018).
182. Zheng, H. *et al.* Age and preoperative pain are major confounders for sex differences in postoperative pain outcome: A prospective database analysis. *PLoS One* **12**, (2017).
183. Ostrom, C. *et al.* Demographic Predictors of Pain Sensitivity: Results From the OPPERA Study. *J. pain* **18**, 295–307 (2017).
184. Gobina, I. *et al.* Prevalence of self-reported chronic pain among adolescents: Evidence from 42 countries and regions. *Eur. J. Pain* **23**, 316–326 (2019).
185. Mogil, J. S. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 859–866 (2012).
186. Craft, R. M. Modulation of pain by estrogens. *Pain* **132 Suppl 1**, S3 (2007).
187. Craft, R. M., Mogil, J. S. & Maria Aloisi, A. Sex differences in pain and analgesia: The role of gonadal hormones. *Eur. J. Pain* **8**, 397–411 (2004).
188. Chesler, E. J., Wilson, S. G., Lariviere, W. R., Rodriguez-Zas, S. L. & Mogil, J. S. Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**, 907–923 (2002).
189. Langford, D. J. *et al.* Social approach to pain in laboratory mice. *Soc. Neurosci.* **5**, 163–170 (2010).
190. Edwards, R., Eccleston, C. & Keogh, E. Observer influences on pain: an experimental series examining same-sex and opposite-sex friends, strangers, and romantic partners. *Pain* **158**, 846–855 (2017).
191. Allely, C. S. Pain sensitivity and observer perception of pain in individuals with autistic spectrum disorder. *The Scientific World Journal* vol. 2013 20 at <https://doi.org/10.1155/2013/916178> (2013).
192. Tordjman, S. *et al.* Relationships between self-injurious behaviors, pain reactivity, and β -endorphin in children and adolescents with autism. *J. Clin. Psychiatry* **79**, 19558 (2018).
193. Ely, E., Chen-Lim, M. L., Carpenter, K. M., Wallhauser, E. & Friedlaender, E. Pain assessment of children with autism spectrum disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **37**, 53–61 (2016).
194. Lee, L. C., Harrington, R. A., Chang, J. J. & Connors, S. L. Increased risk of injury in children with developmental disabilities. *Res. Dev. Disabil.* **29**, 247–255 (2008).
195. Madra, M., Ringel, R. & Margolis, K. G. Gastrointestinal Issues and Autism Spectrum Disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* **44**, 69–81 (2021).
196. Whitney, D. G. & Shapiro, D. N. National Prevalence of Pain Among Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorders. *JAMA Pediatr.* **173**, 1203–1205 (2019).
197. Tudor, M. E., Walsh, C. E., Mulder, E. C. & Lerner, M. D. Pain as a predictor of sleep problems in youth with autism spectrum disorders. *Autism* **19**, 292–300 (2015).
198. Craig, K. D. The construct and definition of pain in developmental disability. in *Pain in children & adults with developmental disabilities*. 7–18 (Paul H. Brookes Publishing Co., 2006).
199. Zabalía, M. *et al.* Validation francophone de la grille d'évaluation de la douleur-déficience intellectuelle - version postopératoire. *Can. J. Anesth.* **58**, 1016–1023 (2011).
200. Dubois, A., Michelon, C., Rattaz, C., Zabalía, M. & Baghdadli, A. Daily living pain assessment in children with autism: Exploratory study. *Res. Dev. Disabil.* **62**, 238–246 (2017).
201. Rattaz, C. *et al.* How do children with autism spectrum disorders express pain? A comparison with developmentally delayed and typically developing children. *Pain* **154**, 2007–2013 (2013).
202. Tordjman, S. *et al.* Pain reactivity and plasma β -endorphin in children and adolescents with autistic disorder. *PLoS One* **4**, (2009).
203. Chien, Y. L. *et al.* Attenuated contact heat-evoked potentials associated with sensory and social-emotional symptoms in individuals with autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
204. Bogdanova, O. V. *et al.* The Current View on the Paradox of Pain in Autism Spectrum Disorders. *Front. psychiatry* **13**, (2022).
205. Elwin, M., Ek, L., Schröder, A. & Kjellin, L. Autobiographical accounts of sensing in Asperger syndrome and high-functioning autism. *Arch. Psychiatr. Nurs.* **26**, 420–429 (2012).
206. Grandin, T. Thinking in Pictures : and other reports from my life with autism. (1995).

207. Bursch, B., Ingman, K., Vitti, L., Hyman, P. & Zeltzer, L. K. Chronic pain in individuals with previously undiagnosed autistic spectrum disorders. *J. Pain* **5**, 290–295 (2004).
208. Mieres, A. C., Smallwood, V. & Nicholson, S. K. Retrospective case report: evaluation of pain in a child with pervasive developmental disorder. *Pediatr. Phys. Ther.* **23**, 194–200 (2011).
209. Ross-Russell, M. & Sloan, P. Autoextraction in a child with autistic spectrum disorder. *Br. Dent. J.* **198**, 473–474 (2005).
210. Klintwall, L. *et al.* Sensory abnormalities in autism. A brief report. **32**, 795–800 (2011).
211. Nader, R., Oberlander, T. F., Chambers, C. T. & Craig, K. D. Expression of Pain in Children with Autism. *Clin. J. Pain* **20**, 88–97 (2004).
212. Bandstra, N. F., Johnson, S. A., Filliter, J. H. & Chambers, C. T. Self-reported and parent-reported pain for common painful events in high-functioning children and adolescents with autism spectrum disorder. *Clin. J. Pain* **28**, 715–721 (2012).
213. Daughters, H., Palermo, T. & Koh, J. Procedural pain and distress in children with autism—a pilot study. *J. Pain* **8**, S31 (2007).
214. Duerden, E. G. *et al.* Decreased sensitivity to thermal stimuli in adolescents with autism spectrum disorder: Relation to symptomatology and cognitive ability. *J. Pain* **16**, 463–471 (2015).
215. Vaughan, S., McGlone, F., Poole, H. & Moore, D. J. A Quantitative Sensory Testing Approach to Pain in Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **0**, 0 (2019).
216. Yasuda, Y. *et al.* Sensory cognitive abnormalities of pain in autism spectrum disorder: A case-control study. *Ann. Gen. Psychiatry* **15**, (2016).
217. Riquelme, I., Hatem, S. M. & Montoya, P. Abnormal Pressure Pain, Touch Sensitivity, Proprioception, and Manual Dexterity in Children with Autism Spectrum Disorders. *Neural Plast.* **2016**, (2016).
218. Fan, Y. T., Chen, C., Chen, S. C., Decety, J. & Cheng, Y. Empathic arousal and social understanding in individuals with autism: Evidence from fMRI and ERP measurements. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* **9**, 1203–1213 (2014).
219. Summers, J. *et al.* Self-injury in autism spectrum disorder and intellectual disability: Exploring the role of reactivity to pain and sensory input. *Brain Sci.* **7**, 1–16 (2017).
220. Bird, G. *et al.* Empathic brain responses in insula are modulated by levels of alexithymia but not autism. *Brain* **133**, 1515–1525 (2010).
221. Failla, M. D. *et al.* Initially intact neural responses to pain in autism are diminished during sustained pain. *Autism* **22**, 669–683 (2018).
222. Dubois, A. *et al.* Pain Modulation Mechanisms in ASD Adults. *J. Autism Dev. Disord.* **50**, 2931–2940 (2020).
223. Ohara, R., Kanejima, Y., Kitamura, M. & Izawa, K. P. Association between Social Skills and Motor Skills in Individuals with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Eur. J. Investig. Heal. Psychol. Educ.* **10**, 276–296 (2019).
224. Briot, K., Pizano, A., Bouvard, M. & Amestoy, A. New Technologies as Promising Tools for Assessing Facial Emotion Expressions Impairments in ASD: A Systematic Review. *Front. psychiatry* **12**, (2021).
225. Trevisan, D. A., Hoskyn, M. & Birmingham, E. Facial Expression Production in Autism: A Meta-Analysis. *Autism Res.* **11**, 1586–1601 (2018).
226. Gu, X. *et al.* Heightened brain response to pain anticipation in high-functioning adults with autism spectrum disorder. **47**, 592–601 (2018).
227. Goodwin, M. S., Mazefsky, C. A., Ioannidis, S., Erdogmus, D. & Siegel, M. Predicting aggression to others in youth with autism using a wearable biosensor. *Autism Res.* **12**, 1286–1296 (2019).
228. Chien, Y. L. *et al.* Small fiber pathology in autism and clinical implications. *Neurology* **95**, e2697–e2706 (2020).
229. Sener, E. F. *et al.* Altered Global mRNA Expressions of Pain and Aggression Related Genes in the Blood of Children with Autism Spectrum Disorders. *J. Mol. Neurosci.* **67**, 89–96 (2019).
230. Bennett, D. L., Clark, X. A. J., Huang, J., Waxman, S. G. & Dib-Hajj, S. D. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol. Rev.* **99**, 1079–1151 (2019).
231. Brown, C. O., Uy, J. & Singh, K. K. A mini-review: Bridging the gap between autism spectrum disorder and pain comorbidities. *Can. J. pain Rev.* **4**, 37–44 (2020).
232. Schuetze, M. *et al.* Morphological Alterations in the Thalamus, Striatum, and Pallidum in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology* **41**, 2627–2637 (2016).
233. Nair, A., Treiber, J. M., Shukla, D. K., Shih, P. & Müller, R. A. Impaired thalamocortical connectivity in autism spectrum disorder: a study of functional and anatomical connectivity. *Brain* **136**, 1942–1955 (2013).
234. Woodward, N. D., Giraldo-Chica, M., Rogers, B. & Cascio, C. J. Thalamocortical dysconnectivity in autism spectrum disorder: An analysis of the Autism Brain Imaging Data Exchange. *Biol. psychiatry. Cogn. Neurosci. neuroimaging* **2**, 76–84 (2017).
235. Tamura, R., Kitamura, H., Endo, T., Hasegawa, N. & Someya, T. Reduced thalamic volume observed across different subgroups of autism spectrum disorders. *Psychiatry Res.* **184**, 186–188 (2010).
236. Cheon, K. A. *et al.* Involvement of the anterior thalamic radiation in boys with high functioning autism spectrum disorders: a Diffusion Tensor Imaging study. *Brain Res.* **1417**, 77–86 (2011).
237. Khan, S. *et al.* Somatosensory cortex functional connectivity abnormalities in autism show opposite trends, depending on direction and spatial scale. *Brain* **138**, 1394–1409 (2015).
238. Duerden, E. G. *et al.* Self-injurious behaviours are associated with alterations in the somatosensory system in children with autism spectrum disorder. *Brain Struct. Funct.* **219**, 1251–1261 (2014).
239. Thakkar, K. N. *et al.* Response monitoring, repetitive behaviour and anterior cingulate abnormalities in autism spectrum disorders (ASD). *Brain* **131**, 2464–2478 (2008).
240. Laidi, C. *et al.* Decreased Cortical Thickness in the Anterior Cingulate Cortex in Adults with Autism. *J. Autism Dev. Disord.* **49**, 1402–1409 (2019).
241. Caria, A. & de Falco, S. Anterior insular cortex regulation in autism spectrum disorders. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, (2015).
242. Uddin, L. Q. & Menon, V. The anterior insula in autism: under-connected and under-examined. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **33**, 1198–1203 (2009).
243. Ong, W.-Y., Stohler, C. S. & Herr, D. R. Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. *Mol. Neurobiol.* **56**, 1137–1166 (2019).
244. Schudlo, L. C., Anagnostou, E., Chau, T. & Doyle-Thomas, K. Investigating sensory response to physical discomfort in children with autism spectrum disorder using near-infrared spectroscopy. *PLoS One* **16**, (2021).
245. Fetit, R., Hillary, R. F., Price, D. J. & Lawrie, S. M. The neuropathology of autism: A systematic review of post-mortem studies of autism and related disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **129**, 35–62 (2021).
246. Banker, S. M., Gu, X., Schiller, D. & Foss-Feig, J. H. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. *Trends Neurosci.* **44**, 793–807 (2021).
247. Ibrahim, K. *et al.* Reduced Amygdala-Prefrontal Functional Connectivity in Children With Autism Spectrum Disorder and Co-occurring Disruptive Behavior. *Biol. psychiatry. Cogn. Neurosci. neuroimaging* **4**, 1031–1041 (2019).
248. Sato, W., Uono, S. & Kochiyama, T. Neurocognitive Mechanisms Underlying Social Atypicalities in Autism: Weak Amygdala's Emotional Modulation Hypothesis. *Front. psychiatry* **11**, (2020).
249. Cascio, C. J., Moore, D. & McGlone, F. Social touch and human development. *Dev. Cogn. Neurosci.* **35**, 5–11 (2019).
250. Elias, L. J. & Abdus-Saboor, I. Bridging skin, brain, and behavior to understand pleasurable social touch. **73**, 102527 (2022).
251. Richer, J. The social-avoidance behaviour of autistic children. *Anim. Behav.* **24**, 898–906 (1976).
252. Lee Masson, H. *et al.* Intact neural representations of affective meaning of touch but lack of embodied resonance in autism: a multi-voxel pattern analysis study. *Mol. Autism* **10**, (2019).
253. Voos, A. C., Pelphrey, K. A. & Kaiser, M. D. Autistic traits are associated with diminished neural response to affective touch. **8**, 378–386 (2013).
254. Kaiser, M. D. *et al.* Brain Mechanisms for Processing Affective (and Nonaffective) Touch Are Atypical in Autism. *Cereb. Cortex* **26**, 2705–2714 (2016).
255. Riquelme, I., Hatem, S. M. & Montoya, P. Reduction of Pain Sensitivity after Somatosensory Therapy in Children with Autism Spectrum Disorders. *J. Abnorm. Child Psychol.* **46**, 1731–1740 (2018).
256. Singer, T. *et al.* Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science* **303**, 1157–1162 (2004).
257. Li, Y. *et al.* Linking brain structure and activation in anterior insula cortex to explain the trait empathy for pain. *Hum. Brain Mapp.* **41**, 1030–1042

- (2020).
258. Botvinick, M. *et al.* Viewing facial expressions of pain engages cortical areas involved in the direct experience of pain. *Neuroimage* **25**, 312–319 (2005).
259. Hadjikhani, N. *et al.* Emotional contagion for pain is intact in autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry* **4**, (2014).
260. Lassalle, A. *et al.* Effect of visual stimuli of pain on empathy brain network in people with and without Autism Spectrum Disorder. *Eur. J. Neurosci.* **48**, 2333–2342 (2018).
261. Gu, X. *et al.* Autonomic and brain responses associated with empathy deficits in autism spectrum disorder. *Hum. Brain Mapp.* **36**, 3323–3338 (2015).
262. Shah, P., Hall, R., Catmur, C. & Bird, G. Alexithymia, not autism, is associated with impaired interoception. *Cortex* **81**, 215–220 (2016).
263. Campbell, M. *et al.* Naltrexone in Autistic Children: Behavioral Symptoms and Attentional Learning. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **32**, 1283–1291 (1993).
264. Leboyer, M. *et al.* Difference between plasma N- and C-terminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. *Am. J. Psychiatry* **151**, 1797–1801 (1994).
265. Leboyer, M. *et al.* Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol. Psychiatry* **45**, 158–163 (1999).
266. Bouvard, M. P. *et al.* Low-dose naltrexone effects on plasma chemistries and clinical symptoms in autism: a double-blind, placebo-controlled study. *Psychiatry Res.* **58**, 191–201 (1995).
267. Weizman, R. *et al.* Low Plasma Immunoreactive β -Endorphin Levels in Autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* vol. 27 430–433 (1988).
268. Nagamitsu, S. CSF beta-endorphin levels in pediatric neurologic disorders. *Kurume Med. J.* **40**, 233–241 (1993).
269. Pizzarelli, R. & Cherubini, E. Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural Plast.* **2011**, (2011).
270. Horder, J. *et al.* Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Transl. Psychiatry* **8**, (2018).
271. Pietropaolo, S. & Provenzano, G. Editorial: Targeting Excitation-Inhibition Imbalance in Neurodevelopmental and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroscience* vol. 16 (2022).
272. Gaetz, W. *et al.* GABA estimation in the brains of children on the autism spectrum: measurement precision and regional cortical variation. *Neuroimage* **86**, 1–9 (2014).
273. Puts, N. A. J. *et al.* Reduced GABA and altered somatosensory function in children with autism spectrum disorder. *Autism Res.* **10**, 608–619 (2017).
274. Sapay-Triomphe, L. A., Lamberton, F., Sonié, S., Mattout, J. & Schmitz, C. Tactile hypersensitivity and GABA concentration in the sensorimotor cortex of adults with autism. *Autism Res.* **12**, 562–575 (2019).
275. Umesawa, Y. *et al.* Altered GABA Concentration in Brain Motor Area Is Associated with the Severity of Motor Disabilities in Individuals with Autism Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* **50**, 2710–2722 (2020).
276. Zhang, L. *et al.* Symptom improvement in children with autism spectrum disorder following bumetanide administration is associated with decreased GABA/glutamate ratios. *Transl. Psychiatry* **10**, (2020).
277. Elphick, M. R. & Egertová, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**, 381–408 (2001).
278. Wei, D., Allsop, S., Tye, K. & Piomelli, D. Endocannabinoid Signaling in the Control of Social Behavior. *Trends Neurosci.* **40**, 385–396 (2017).
279. Carbone, E., Manduca, A., Cacchione, C., Vicari, S. & Trezza, V. Healing autism spectrum disorder with cannabinoids: a neuroinflammatory story. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **121**, 128–143 (2021).
280. de Camargo, R. W. *et al.* Implications of the endocannabinoid system and the therapeutic action of cannabinoids in autism spectrum disorder: A literature review. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **221**, 173492 (2022).
281. Krueger, D. D. & Brose, N. Evidence for a common endocannabinoid-related pathomechanism in autism spectrum disorders. *Neuron* **78**, 408–410 (2013).
282. Aran, A. *et al.* Lower circulating endocannabinoid levels in children with autism spectrum disorder. *Mol. Autism* **10**, (2019).
283. Woodhams, S. G., Sagar, D. R., Burston, J. J. & Chapman, V. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb. Exp. Pharmacol.* **227**, 119–143 (2015).
284. Das, I., Estevez, M. A., Sarkar, A. A. & Banerjee-Basu, S. A multifaceted approach for analyzing complex phenotypic data in rodent models of autism. *Mol. Autism* **10**, (2019).
285. Bossu, J. L. & Roux, S. The valproate model of autism. *Medecine/Sciences* **35**, 236–243 (2019).
286. Möhrle, D. *et al.* What we can learn from a genetic rodent model about autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **109**, 29–53 (2020).
287. Pasciuto, E. *et al.* Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol. Learn. Mem.* **124**, 71–87 (2015).
288. Ellegood, J. & Crawley, J. N. Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. *Neurotherapeutics* **12**, 521–533 (2015).
289. McFarlane, H. G. *et al.* Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes. Brain. Behav.* **7**, 152–163 (2008).
290. Meyza, K. Z. & Blanchard, D. C. The BTBR mouse model of idiopathic autism - Current view on mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **76**, 99–110 (2017).
291. MindSpec | Informatics for Neurodevelopmental disorders. <https://www.mindspec.org/>.
292. Mueller, F. S., Polesel, M., Ricketto, J., Meyer, U. & Weber-Stadlbauer, U. Mouse models of maternal immune activation: Mind your caging system! *Brain. Behav. Immun.* **73**, 643–660 (2018).
293. Roux, S. & Bossu, J. L. Valproic acid and autism spectrum disorder : from clinical observations to animal studies. *Curr. Trends Neurol.* (2018).
294. Tomson, T., Battino, D. & Perucca, E. The remarkable story of valproic acid. *The Lancet Neurology* vol. 15 141 (2016).
295. Tomson, T., Battino, D. & Perucca, E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: Time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *The Lancet Neurology* vol. 15 210–218 (2016).
296. Christensen, J. *et al.* Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *309*, 1696–1703 (2013).
297. Schneider, T. & Przewlocki, R. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* **30**, 80–89 (2005).
298. Nicolini, C. & Fahnstock, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp. Neurol.* **299**, 217–227 (2018).
299. Romoli, M. *et al.* Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Curr. Neuropharmacol.* **17**, 926–946 (2019).
300. Kataoka, S. *et al.* Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **16**, 91–103 (2013).
301. Orefice, L. L. Peripheral Somatosensory Neuron Dysfunction: Emerging Roles in Autism Spectrum Disorders. *Neuroscience* vol. 445 120–129 (2020).
302. Song, T. J. *et al.* Altered behaviors and impaired synaptic function in a novel rat model with a complete Shank3 deletion. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).
303. Castro, K., Baronio, D., Perry, I. S., Riesgo, R. dos S. & Gottfried, C. The effect of ketogenic diet in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Nutr. Neurosci.* **20**, 343–350 (2017).
304. Martin, L. J. *et al.* Altered nociceptive behavior and emotional contagion of pain in mouse models of autism. *Genes. Brain Behav.* **21**, (2022).
305. Baronio, D. *et al.* Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PLoS One* **10**, (2015).
306. Wang, L. *et al.* Altered nocifensive behavior in animal models of autism spectrum disorder: The role of the nicotinic cholinergic system. *Neuropharmacology* **111**, 323–334 (2016).
307. Wu, H. F. *et al.* Alleviation of N-Methyl-d-Aspartate Receptor-Dependent Long-Term Depression via Regulation of the Glycogen Synthase Kinase-3 β Pathway in the Amygdala of a Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. *Mol. Neurobiol.* **54**, 5264–5276 (2017).
308. Mohammadi, S. *et al.* Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of NMDA receptor function. *Psychopharmacology (Berl)*. **237**, 199–208 (2020).

309. Ko, H. G., Oh, S. B., Zhuo, M. & Kaang, B. K. Reduced acute nociception and chronic pain in Shank2^{-/-} mice. *Mol. Pain* **12**, (2016).
310. Yoon, S. Y. *et al.* A critical role of spinal Shank2 proteins in NMDA-induced pain hypersensitivity. *Mol. Pain* **13**, 1–9 (2017).
311. Nakajima, R. *et al.* Comprehensive behavioral analysis of heterozygous *Syngap1* knockout mice. *Neuropsychopharmacol. Reports* **39**, 223–237 (2019).
312. Bhattacharjee, A. *et al.* Neuronal cytoskeletal gene dysregulation and mechanical hypersensitivity in a rat model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E6952–E6961 (2017).
313. Han, Q. *et al.* SHANK3 Deficiency Impairs Heat Hyperalgesia and TRPV1 Signaling in Primary Sensory Neurons. *Neuron* **92**, 1279–1293 (2016).
314. Orefice, L. L. *et al.* Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. *Cell* **166**, 299–313 (2016).
315. Dawes, J. M. *et al.* Immune or Genetic-Mediated Disruption of CASPR2 Causes Pain Hypersensitivity Due to Enhanced Primary Afferent Excitability. *Neuron* **97**, 806–822.e10 (2018).
316. Bhattacharjee, A. *et al.* Motor, somatosensory, viscerosensory and metabolic impairments in a heterozygous female rat model of rett syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
317. Zhang, R. *et al.* MeCP2 plays an analgesic role in pain transmission through regulating CREB / miR-132 pathway. *Mol. Pain* **11**, (2015).
318. Price, T. J. *et al.* Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: Role of mGluR1/5 and mTOR. *J. Neurosci.* **27**, 13958–13967 (2007).
319. DeLorey, T. M. *et al.* Somatosensory and sensorimotor consequences associated with the heterozygous disruption of the autism candidate gene, *Gabrb3*. *Behav. Brain Res.* **216**, 36–45 (2011).
320. Imado, E. *et al.* Prenatal exposure to valproic acid causes allodynia associated with spinal microglial activation. *Neurochem. Int.* **160**, 105415 (2022).
321. Lin, H. C., Gean, P. W., Wang, C. C., Chan, Y. H. & Chen, P. S. The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model. *PLoS One* **8**, (2013).
322. Antoine, M. W., Langberg, T., Schnepel, P. & Feldman, D. E. Increased Excitation-Inhibition Ratio Stabilizes Synapse and Circuit Excitability in Four Autism Mouse Models. *Neuron* **101**, 648–661.e4 (2019).
323. White, A. M., An, X. & Debiec, J. Intact maternal buffering of stress response in infant rats despite altered responsivity towards maternal olfactory cues in the valproic acid model of autism-like behavior. *Front. Behav. Neurosci.* **16**, 321 (2022).
324. Yang, M., Silverman, J. L. & Crawley, J. N. Automated three-chambered social approach task for mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* (2011).
325. Moy, S. S., Nonneman, R. J., Young, N. B., Demyanenko, G. P. & Maness, P. F. Impaired sociability and cognitive function in *Nrcam*-null mice. *Behav. Brain Res.* **205**, 123–131 (2009).
326. Machado, C., Reis-Silva, T., Lyra, C., Felicio, L. & Malnic, B. Buried Food-seeking Test for the Assessment of Olfactory Detection in Mice. *Bio-protocol* **8**, (2018).
327. Kremer, M., Becker, L. J., Barrot, M. & Yalcin, I. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *Eur. J. Neurosci.* **53**, 236–270 (2021).
328. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. & Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **53**, 55–63 (1994).
329. Bonin, R. P., Bories, C. & De Koninck, Y. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Mol. Pain* **10**, (2014).
330. Gonzalez-Cano, R. *et al.* Up–Down Reader: An Open Source Program for Efficiently Processing 50% von Frey Thresholds. *Front. Pharmacol.* **9**, 433 (2018).
331. Peirs, C. *et al.* Mechanical Allodynia Circuitry in the Dorsal Horn Is Defined by the Nature of the Injury. *Neuron* **109**, 73–90.e7 (2021).
332. Touska, F. *et al.* Comprehensive thermal preference phenotyping in mice using a novel automated circular gradient assay. *Temp. (Austin, Tex.)* **3**, 77–91 (2016).
333. Brenner, D. S., Golden, J. P. & Gereau IV, R. W. A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice. *PLoS One* **7**, (2012).
334. Lopes, D. M., Cater, H. L., Thakur, M., Wells, S. & McMahon, S. B. A refinement to the formalin test in mice. *F1000Research* **8**, (2019).
335. Henry, J. L., Yashpal, K., Pitcher, G. M. &Coderre, T. J. Physiological evidence that the ‘interphase’ in the formalin test is due to active inhibition. *Pain* **82**, 57–63 (1999).
336. Kremer, M. *et al.* A Dual Noradrenergic Mechanism for the Relief of Neuropathic Allodynia by the Antidepressant Drugs Duloxetine and Amitriptyline. *J. Neurosci.* **38**, 9934–9954 (2018).
337. Liu, R. H., Foster, G., Cone, E. J. & Kumar, S. D. Selecting an appropriate isotopic internal standard for gas chromatography/mass spectrometry analysis of drugs of abuse—pentobarbital example. *J. Forensic Sci.* **40**, 983–989 (1995).
338. Scheerer, N. E. *et al.* Exploring sensory phenotypes in autism spectrum disorder. *Mol. Autism* **12**, (2021).
339. Ruelle-Le Glaunec, L., Inquimbert, P., Hugel, S., Schlichter, R. & Bossu, J. L. Nociception pain and autism. *Medecine/Sciences* vol. 37 141–151 (2021).
340. Moore, D. J. Acute pain experience in individuals with autism spectrum disorders: A review. *Autism* vol. 19 387–399 (2015).
341. Aldinger, K. A., Sokoloff, G., Rosenberg, D. M., Palmer, A. A. & Millen, K. J. Genetic variation and population substructure in outbred CD-1 mice: implications for genome-wide association studies. *PLoS One* **4**, (2009).
342. Jiang, S. *et al.* The GABAB receptor agonist STX209 reverses the autism-like behaviour in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Mol. Med. Rep.* **25**, (2022).
343. Kaluff, A. V. *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 45–59 (2016).
344. Lin, Y. L., Bialer, M., Cabrera, R. M., Finnell, R. H. & Wlodarczyk, B. J. Teratogenicity of valproic acid and its constitutional isomer, amide derivative valnoctamide in mice. *Birth Defects Res.* **111**, 1013–1023 (2019).
345. Yang, E. J., Ahn, S., Lee, K., Mahmood, U. & Kim, H. S. Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice. *PLoS One* **11**, (2016).
346. Al Sagheer, T. *et al.* Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **21**, 871–882 (2018).
347. Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C. & Depino, A. M. Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* **72**, 11–21 (2016).
348. Moles, A., Kieffer, B. L. & D’Amato, F. R. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* **304**, 1983–1986 (2004).
349. Thornton, A. M., Humphrey, R. M., Kerr, D. M., Finn, D. P. & Roche, M. Increasing Endocannabinoid Tone Alters Anxiety-Like and Stress Coping Behaviour in Female Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid. *Molecules* **26**, (2021).
350. Melancia, F. *et al.* Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 3699–3712 (2018).
351. Anshu, K., Nair, A. K., Srinath, S. & Laxmi, T. R. Altered Developmental Trajectory in Male and Female Rats in a Prenatal Valproic Acid Exposure Model of Autism Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 1–22 (2022).
352. Haida, O. *et al.* Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Transl. Psychiatry* **9**, (2019).
353. Moy, S. S. *et al.* Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav.* **3**, 287–302 (2004).
354. Qi, C. *et al.* Excitatory and Inhibitory Synaptic Imbalance Caused by Brain-Derived Neurotrophic Factor Deficits During Development in a Valproic Acid Mouse Model of Autism. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, (2022).
355. Norton, S. A. *et al.* Long-lasting Behavioral and Neuroanatomical Effects of Postnatal Valproic Acid Treatment. *Neuroscience* **434**, 8–21 (2020).
356. Kim, K. C. *et al.* Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J. Neurochem.* **124**, 832–843 (2013).
357. Kerr, D. M., Gilmartin, A. & Roche, M. Pharmacological inhibition of fatty acid amide hydrolase attenuates social behavioural deficits in male rats prenatally exposed to valproic acid. *Pharmacol. Res.* **113**, 228–235 (2016).
358. Hendershott, T. R., Cronin, M. E., Langella, S., McGuinness, P. S. & Basu,

- A. C. Effects of environmental enrichment on anxiety-like behavior, sociability, sensory gating, and spatial learning in male and female C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* **314**, 215–225 (2016).
359. Vakili Shahrabaki, S. S., Jonaidi, H., Sheibani, V. & Bashiri, H. Early postnatal handling alters social behavior, learning, and memory of pre- and postnatal VPA-induced rat models of autism in a context-based manner. *Physiol. Behav.* **249**, (2022).
360. Azogu, I., Cossette, I., Mukunzi, J., Ibeke, O. & Plamondon, H. Sex-specific differences in adult cognition and neuroplasticity following repeated combinatorial stress and TrkB receptor antagonism in adolescence. *Horm. Behav.* **113**, 21–37 (2019).
361. Olexová, L., Senko, T., Štefánek, P., Talarovičová, A. & Kršková, L. Habituation of exploratory behaviour in VPA rats: Animal model of autism. *Interdiscip. Toxicol.* **6**, 222–227 (2013).
362. Peng, M. *et al.* Battery of behavioral tests in mice to study postoperative delirium. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
363. Wu, Y. *et al.* RhANP attenuates endotoxin-derived cognitive dysfunction through subdiaphragmatic vagus nerve-mediated gut microbiota-brain axis. *J. Neuroinflammation* **18**, (2021).
364. Anshu, K. *et al.* Altered attentional processing in male and female rats in a prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Autism Res.* **10**, 1929–1944 (2017).
365. Kordás, K. *et al.* Measuring sociability of mice using a novel three-chamber apparatus and algorithm of the LABORAS™ system. *J. Neurosci. Methods* **343**, (2020).
366. Hsieh, L. S., Wen, J. H., Miyares, L., Lombroso, P. J. & Bordey, A. Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks. *Neurosci. Lett.* **637**, 142–147 (2017).
367. Martínez-Torres, S., Gomis-González, M., Navarro-Romero, A., Maldonado, R. & Ozaita, A. Use of the Vsoc-maze to Study Sociability and Preference for Social Novelty in Rodents. *BIO-PROTOCOL* **9**, (2019).
368. Matas, E. *et al.* Major motor and gait deficits with sexual dimorphism in a Shank3 mutant mouse model. *Mol. Autism* **12**, (2021).
369. Nolan, S. O. *et al.* Deletion of Fmr1 results in sex-specific changes in behavior. *Brain Behav.* **7**, (2017).
370. Murray, E. K., Hien, A., De Vries, G. J. & Forger, N. G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology* **150**, 4241–4247 (2009).
371. Filice, F., Lauber, E., Vörckel, K. J., Wöhr, M. & Schwaller, B. 17- β estradiol increases parvalbumin levels in Pvalb heterozygous mice and attenuates behavioral phenotypes with relevance to autism core symptoms. *Mol. Autism* **9**, (2018).
372. Konopko, M. A., Densmore, A. L. & Krueger, B. K. Sexually Dimorphic Epigenetic Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Fetal Brain in the Valproic Acid Model of Autism Spectrum Disorder. *Dev. Neurosci.* **39**, 507–518 (2017).
373. Parra, A., Rama, E., Vinader-Caerols, C. & Monleón, S. Inhibitory avoidance in CD1 mice: Sex matters, as does the supplier. *Behav. Processes* **100**, 36–39 (2013).
374. Walczak, J. S. & Beaulieu, P. Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: The double plate technique. *Neurosci. Lett.* **399**, 240–244 (2006).
375. Podgorac, J. *et al.* The influence of continuous prenatal exposure to valproic acid on physical, nociceptive, emotional and psychomotor responses during adolescence in mice: Dose-related effects within sexes. *Front. Behav. Neurosci.* **16**, 385 (2022).
376. Fereshetyan, K., Chavushyan, V., Danielyan, M. & Yenkovyan, K. Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
377. Gunn, A., Bobeck, E. N., Weber, C. & Morgan, M. M. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J. Pain* **12**, 222–227 (2011).
378. Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M. J., Barrot, M. & Poisbeau, P. Differentiating Thermal Allodynia and Hyperalgesia Using Dynamic Hot and Cold Plate in Rodents. *J. Pain* **10**, 767–773 (2009).
379. Turner, P. V., Pang, D. S. J. & Lofgren, J. L. S. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. *Comp. Med.* **69**, 451–467 (2019).
380. Menendez, L., Andrés-Trelles, F., Hidalgo, A. & Baamonde, A. Gender and test dependence of a type of kappa mediated stress induced analgesia in mice. *Gen. Pharmacol.* **25**, 903–908 (1994).
381. Gårdmark, M., Höglund, A. U. & Hammarlund-Udenaes, M. Aspects on tail-flick, hot-plate and electrical stimulation tests for morphine antinociception. *Pharmacol. Toxicol.* **83**, 252–258 (1998).
382. Casarrubea, M., Sorbera, F. & Crescimanno, G. Effects of 7-OH-DPAT and U 99194 on the behavioral response to hot plate test, in rats. *Physiol. Behav.* **89**, 552–562 (2006).
383. Casarrubea, M., Faulisi, F., Magnusson, M. S. & Crescimanno, G. The effects of morphine on the temporal structure of Wistar rat behavioral response to pain in hot-plate. *Psychopharmacology (Berl.)* **233**, 2891–2900 (2016).
384. Casarrubea, M., Sorbera, F., Santangelo, A. & Crescimanno, G. The effects of diazepam on the behavioral structure of the rat's response to pain in the hot-plate test: Anxiolysis vs. pain modulation. *Neuropharmacology* **63**, 310–321 (2012).
385. Commons, K. G., Cholanians, A. B., Babb, J. A. & Ehlinger, D. G. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chemical Neuroscience* vol. 8 955–960 (2017).
386. Nakasato, A. *et al.* Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. *Brain Res.* **1193**, 128–135 (2008).
387. Saadé, N. E. *et al.* Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *Journal of Physiology* vol. 545 241–253 (2002).
388. Aloisi, A. M., Albonetti, M. E. & Carli, G. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. *Neurosci. Lett.* **179**, 79–82 (1994).
389. Gaumond, I., Arsenault, P. & Marchand, S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* **958**, 139–145 (2002).
390. Nazarian, A., Tenayuca, J. M., Almasarweh, F., Armendariz, A. & Are, D. Sex differences in formalin-evoked primary afferent release of substance P. *Eur. J. Pain* **18**, 39–46 (2014).
391. Perez-Pouchoulen, M. *et al.* Prenatal exposure to sodium valproate alters androgen receptor expression in the developing cerebellum in a region and age specific manner in male and female rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **53**, 46–52 (2016).
392. Wilzopolski, J. *et al.* TRPV1 and TRPA1 Channels Are Both Involved Downstream of Histamine-Induced Itch. *Biomolecules* **11**, (2021).
393. Bleakman, D., Brorson, J. R. & Miller, R. J. The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 423–431 (1990).
394. Cao, D. S., Yu, S. Q. & Premkumar, L. S. Modulation of transient receptor potential vanilloid 4-mediated membrane currents and synaptic transmission by protein kinase C. *Mol. Pain* **5**, (2009).
395. Chen, X. *et al.* Long-term diabetic microenvironment augments the decay rate of capsaicin-induced currents in mouse dorsal root ganglion neurons. *Molecules* **24**, (2019).
396. Giacobassi, M. J. *et al.* An integrative approach to the facile functional classification of dorsal root ganglion neuronal subclasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 5494–5501 (2020).
397. Crosson, T. & Talbot, S. Anatomical differences in nociceptor neurons sensitivity. *Bioelectron. Med.* **8**, (2022).
398. Koplas, P. A., Rosenberg, R. L. & Oxford, G. S. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3525–3537 (1997).
399. Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A. & Planells-Cases, R. Agonist- and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *J. Biol. Chem.* **287**, 19462–19471 (2012).
400. Nguyen, R. L., Medvedeva, Y. V., Ayyagari, T. E., Schmunk, G. & Gargus, J. J. Intracellular calcium dysregulation in autism spectrum disorder: An analysis of converging organelle signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1865 1718–1732 (2018).
401. Orefice, L. L. *et al.* Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. *Cell* **178**, 867–886.e24 (2019).
402. Maier, S. *et al.* Increased prefrontal GABA concentrations in adults with autism spectrum disorders. *Autism Res.* **15**, 1222–1236 (2022).
403. Puig-Lagunes, Á. A., Rocha, L., Morgado-Valle, C., Beltran-Parrazal, L. & Lopez-Meraz, M.-L. Brain and plasma amino acid concentration in infant

- rats prenatally exposed to valproic acid. *An. Acad. Bras. Cienc.* **93**, 1–13 (2021).
404. Narita, N. *et al.* Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr. Res.* **52**, 576–579 (2002).
405. Anderson, G. M. *et al.* Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. *J. Child Psychol. Psychiatry.* **28**, 885–900 (1987).
406. Hranilovic, D. *et al.* Hyperserotonemia in adults with autistic disorder. *J. Autism Dev. Disord.* **37**, 1934–1940 (2007).
407. Bast, N., Poustka, L. & Freitag, C. M. The locus coeruleus-norepinephrine system as pacemaker of attention - a developmental mechanism of derailed attentional function in autism spectrum disorder. *Eur. J. Neurosci.* **47**, 115–125 (2018).
408. Jin, X., Cui, N., Zhong, W., Jin, X. T. & Jiang, C. GABAergic synaptic inputs of locus coeruleus neurons in wild-type and Mecp2-null mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**, (2013).
409. Bódi, V. *et al.* Alterations of the Hippocampal Networks in Valproic Acid-Induced Rat Autism Model. *Front. Neural Circuits* **16**, 7 (2022).
410. Westphalen, R. I., Yu, J., Krivitski, M., Jih, T. Y. & Hemmings, H. C. Regional differences in nerve terminal Na⁺ channel subtype expression and Na⁺ channel-dependent glutamate and GABA release in rat CNS. *J. Neurochem.* **113**, 1611–1620 (2010).
411. Bao, J., Li, J. J. & Perl, E. R. Differences in Ca²⁺ channels governing generation of miniature and evoked excitatory synaptic currents in spinal laminae I and II. *J. Neurosci.* **18**, 8740–8750 (1998).
412. Bardoni, R. *et al.* Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1279**, 90–6 (2013).
413. He, H. Y. & Cline, H. T. What Is Excitation/Inhibition and How Is It Regulated? A Case of the Elephant and the Wisemen. *Journal of Experimental Neuroscience* vol. 13 (2019).
414. Lee, E., Lee, J. & Kim, E. Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry* vol. 81 838–847 (2017).
415. Park, G. *et al.* Decreased in vivo glutamate/GABA ratio correlates with the social behavior deficit in a mouse model of autism spectrum disorder. *Mol. Brain* **15**, (2022).
416. Pourtavakoli, A. & Ghafouri-Fard, S. Calcium signaling in neurodevelopment and pathophysiology of autism spectrum disorders. *Molecular Biology Reports* vol. 49 10811–10823 (2022).
417. Ferron, L. *et al.* FMRP regulates presynaptic localization of neuronal voltage gated calcium channels. *Neurobiol. Dis.* **138**, 104779 (2020).
418. Roca-Lapirot, O. *et al.* Calcium signalling through L-type calcium channels: role in pathophysiology of spinal nociceptive transmission. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 2362–2374 (2018).
419. Bronzuoli, M. R. *et al.* Neuroglia in the autistic brain: Evidence from a preclinical model 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences 17 Psychology and Cognitive Sciences 1701 Psychology. *Mol. Autism* **9**, 1–17 (2018).
420. Lee, H., Thacker, S., Sarn, N., Dutta, R. & Eng, C. Constitutional mislocalization of Pten drives precocious maturation in oligodendrocytes and aberrant myelination in model of autism spectrum disorder. *Transl. Psychiatry* **9**, (2019).
421. Cunningham, C. L., Gremel, C. M. & Groblewski, P. A. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat. Protoc.* **1**, 1662–1670 (2006).
422. Benoist, J. M., Pinedé, I., Ballantyne, K., Plaghki, L. & Le Bars, D. Peripheral and central determinants of a nociceptive reaction: an approach to psychophysics in the rat. *PLoS One* **3**, (2008).

Résumé

Les individus atteints de troubles du spectre autistique (TSA) sont souvent décrits comme moins sensibles à la douleur mais les études à ce sujet sont contrastées. Nous avons utilisé des souris exposées de manière prénatale au valproate (VPA) comme modèle de TSA et évalué la sensibilité comportementale ainsi que le fonctionnement de certains acteurs cellulaires du système nociceptif. Nous décrivons une hypo-réactivité au chaud nociceptif ainsi qu'à l'injection intraplantaire de capsaïcine et de formaline, modèles de douleur aiguë. De plus, nous observons une réponse plus courte à la capsaïcine des neurones sensoriels primaires à l'aide d'imagerie du calcium libre cytosolique ainsi que des modifications de la transmission synaptique dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière grâce à des enregistrements électrophysiologiques. Ce travail suggère que certaines modifications au sein d'acteurs cellulaires pourraient sous-tendre le phénotype nociceptif des individus TSA.

Mots clés : Troubles du Spectre Autistique ; Troubles Neurodéveloppementaux ; Douleur ; Valproate ; Neurones sensoriels ; Corne dorsale de la moelle épinière

Résumé en anglais

Individuals with autism spectrum disorder (ASD) are often described as less sensitive to pain even though scientific evidence is sparse and heterogeneous. In this study, we used mice prenatally exposed to valproate (VPA) as a model of ASD, evaluated nociceptive sensitivity with behavioral tests as well the functioning of some cellular actors of the nociceptive system with *ex-vivo* preparations. We found a hypo-reactivity to nociceptive heat and a diminished response to intraplantar capsaicin and formalin induced acute pain models. Moreover, we observed a faster calcium regulation in response to capsaicin in cultured sensory neurons using calcium imaging and some synaptic transmission changes in dorsal horn neurons using electrophysiology. Thus, using animal models, this study suggests that alterations in some neuronal actors could underly the complex nociceptive phenotype found in ASD.

Keywords :

Autism Spectrum Disorder ; Neurodevelopmental disorder ; Pain ; Valproate ; Sensory Neurons ; Dorsal Horn of the Spinal Cord