THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques - LNEC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences Biologiques et Santé (Limoges)
Secteur de recherche : Neurosciences

Présentée par :
Mathieu Thabault

Altérations comportementales et striatales au cours du vieillissement dans deux modèles murins de troubles du spectre autistique

Directeur(s) de Thèse :
Mohamed Jaber, Laurie Galvan

Soutenue le 30 septembre 2022 devant le jury

Jury :

Président	**David Blum**	Directeur de recherche, Lille Neuroscience & Cognition, Lille
Rapporteur	**Jérôme Baufreton**	Chargé de recherche CNRS, IMN, Bordeaux
Rapporteur	**Élodie Ey**	Chargée de recherche CNRS, IGBMC, Illkirch

Pour citer cette thèse :
Mathieu Thabault. *Altérations comportementales et striatales au cours du vieillissement dans deux modèles murins de troubles du spectre autistique* [En ligne]. Thèse Neurosciences. Poitiers : Université de Poitiers, 2022. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

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

École Doctorale n°615 Sciences Biologiques et Santé
Secteur de Recherche : Neurosciences

Présentée par

Mathieu THABAULT

* *

Altérations comportementales et striatales au cours du vieillissement dans deux modèles murins de troubles du spectre autistique

Directeur de thèse : Mohamed JABER, PU-PH
Co-Directrice de thèse : Laurie GALVAN, MCU

* *

Soutenue le 30 Septembre 2022
Devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Jérôme BAUFRETON	DR CNRS, IMN, CNRS UMR 5293, Université de Bordeaux	Rapporteur
Dr Élodie EY	CR-HDR, IGBMC, CNRS UMR 7104 - INSERM U1258, Université de Strasbourg	Rapportrice
Dr David BLUM	DR INSERM, Lille Neurosciences et Cognition, INSERM U1172, Université de Lille	Examinateur
Pr Mohamed JABER	PU-PH, LNEC, INSERM U1084, Université de Poitiers	Examinateur
Dr Laurie GALVAN	MCU, LNEC, INSERM U1084, Université de Poitiers	Examinatrice

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier mon encadrante de thèse, Laurie Galvan, pour tout ce que vous avez fait pour moi, depuis la 2e année de Master jusqu'à maintenant. J'ai tant appris grâce à vous, et je vous suis reconnaissant de me permettre de poursuivre notre travail pour un an encore. Je vous souhaite également le meilleur pour votre nouvelle aventure sous le soleil du Sud !

Je voudrais également remercier mon chef d'équipe, Pierre-Olivier Fernagut, pour m'avoir accueilli dans son équipe et Mohamed Jaber, directeur de l'unité, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je voudrais maintenant remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidé pendant ces quelques années passées au LNEC, Catherine en premier lieu pour toute l'aide et pour toutes les fois où on s'est retrouvé à parler de l'Alsace et des Vosges dans la laverie. Qui aurait cru qu'il fallait venir à Poitiers pour trouver quelqu'un qui connait Saint-Dié ! Merci aussi à Maureen, Éric, Anaïs, Jean-Emmanuel et Marie-Laure pour tous vos conseils et vos coups de main précieux ! Je sais la chance que j'ai eu de pouvoir travailler avec vous !

Je voudrais adresser un merci particulier à mes collègues du bureau de la bienveillance et de la tolérance, Mélina, Maëlig et Oriane, pour m'avoir supporté d'une part (je sais que ça n'est pas toujours évident…) et pour avoir égayé certaines journées parfois bien nulles. Merci aussi pour vos chansons en boucle et vos caricatures douteuses au dos de la porte… Mais plus jamais je ne pourrai écouter Axelle Red sans penser à vous, ni écouter Dalida tout court d'ailleurs !

Merci également à tous mes collègues en thèse (ou non), particulièrement Anaïs, Manon, Thomas, Amaury, Myriam et Stevenson pour les discussions sur la terrasse ou entre deux manips. Merci aussi aux étudiants et étudiantes que j'ai pu encadrer en stage de licence ou master, vous avez participé à confirmer mon envie de devenir enseignant ! Merci particulièrement à Cloé, tu as été ma première stagiaire à temps plein, ce fut un plaisir !

Plus personnellement, j'aimerais remercier Valentine pour ces presque 3 ans à tes côtés. Je ne te dirai jamais assez merci d'avoir été là pour moi chaque jour qui passe, à me soutenir, m'encourager, me redonner de la motivation chaque fois que j'en ai manqué. Une page se tourne et un nouveau chapitre commence, l'important est de l'écrire à deux.

Merci aussi à mes amis de toujours, Tim et Thomas. Vous avez voulu me lancer en premier seul dans l'aventure de la thèse, me voilà arrivé au bout. Votre tour approche à grands pas ! Qui qu'il en soit, merci infiniment pour vos Skypéro, les week-ends marseillais et poitevins et nos discussions parfois sans aucun sens mais toujours à mourir de rire !

Enfin, merci à mes parents, pour m'avoir toujours porté et encouragé à aller de l'avant à chaque fois. Merci à tous ceux qui ont cru en moi jusqu'ici.

RÉSUMÉ

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont un ensemble de troubles neurodéveloppementaux affectant 1 personne sur 160 dans le monde et se traduisant par des troubles sociaux et de communication, ainsi qu'un ensemble restreint d'intérêts et de comportements. Des altérations dans les niveaux de GABA ont été mises en évidences chez les patients atteints de troubles du spectre autistique depuis plusieurs décennies déjà, mais les mécanismes qui sous-tendent ces altérations ne sont pas clairement définis à ce jour. L'une des structures impliquée dans la physiopathologie des TSA est le striatum, qui est impliqué dans des fonctions motrices, associatives et cognitives, toutes trois altérées dans les TSA. Dans les travaux présentés ici, deux modèles murins transgéniques de TSA ont été utilisés (Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2$^{-/-}$) en raison de leur forte validité conceptuelle, ces mutations étant identifiées dans des formes syndromiques et non-syndromiques de TSA chez l'Homme.

Les travaux présentés ici portent sur l'évolution des symptômes autistiques moteurs avec l'âge et des altérations striatales dans des groupes expérimentaux composés de souris âgées de 10 semaines, 20 semaines et 40 semaines, mâles et femelles, dans ces deux modèles murins transgéniques de TSA. Les résultats présentés ici montrent la présence de stéréotypies motrices aux différents âges, s'aggravant avec l'âge. L'enregistrement électrophysiologique des neurones de projection (« Medium Spiny Neurons », MSN) du striatum dorsolatéral montre des dysfonctions dans la transmission GABAergique évoluant avec l'âge. Afin d'étudier les possibles causes de ces altérations fonctionnelles, la morphologie de ces neurones a été évaluée d'une part, et d'autre part l'étude des interneurones parvalbumine (PV), principale source de GABA sur les neurones de projection a été réalisée par électrophysiologie *ex vivo*, incluant une approche optogénétique pour mesurer la communication PV-MSN. Enfin, une approche chimiogénétique a permis d'étudier la restauration d'un phénotype typique chez les souris TSA.

Les travaux présentés ici permettent donc de caractériser les dysfonctions striatales dans les deux modèles utilisés, ainsi que d'établir une chronologie de leur apparition et de leur mise en place.

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders affecting one person in 160 around the world. They are characterized by communication and social impairments, associated with a restricted pattern of interests and behaviors. Alterations in GABA levels have been highlighted in patients with autism spectrum disorders, but mechanisms underlying these alterations remain unclear. One of the key structures in ASD physiopathology is the striatum, as it is involved in motor, associative and cognitive functions, all three altered in ASD. In this thesis work, two transgenic mouse models of ASD have been used (Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ and Cntnap2$^{-/-}$) as they display a strong face validity. Indeed, both mutations are found in syndromic and non-syndromic ASD patients.

This PhD thesis are about the evolution of ASD motor symptoms with aging as well as the evolution of related striatal alterations, in three experimental groups: 10weeks, 20weeks, 40weeks, with both males and females. Results exposed here show the presence of motor stereotypies at different stages, worsening with aging. Patch-clamp recordings of DLS MSN show dysfunctions in GABAergic transmission, evolving with aging. To go further, we examined the neuronal morphology as well as the functionality of PV interneurons, which are the main source of GABA onto the MSN, with an optogenetic approach. Finally, a chemogenetics approach allowed us to study the phenotypic restoration in ASD mice models.

The work presented here allow to characterize striatal dysfunctions in our models, and to establish a timeline for their evolution.

AVANT-PROPOS

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont un ensemble de troubles neurodéveloppementaux affectant 1 personne sur 160 dans le monde et définis dans la dernière version du « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders » (DSM-5, (American Psychiatric Association, 2013)) par deux dimensions symptomatiques : (i) la présence de déficits persistants de la communication et des interactions sociale et (ii) le caractère restreint et répétitif des comportements, intérêts ou activités. Les premiers signes cliniques des TSA apparaissent durant l'enfance et se maintiennent tout au long de la vie des patients.

Dans le monde, et en particulier dans nos sociétés occidentales, l'espérance de vie des personnes augmente d'année en année, augmentant donc le nombre de personnes âgées dans la population. Ainsi, en France par exemple, l'Institut National de la Statistique et des Études Économiques (INSEE) estime que l'espérance de vie est de 85,4 ans pour les femmes et 79,3 ans pour les hommes, et que les personnes de plus de 60 ans pourraient représenter environ 1/3 de la population d'ici 2040. Bien que l'espérance de vie des patients atteints de TSA soit diminuée d'environ 17 ans (Hirvikoski et al., 2016), ces derniers atteignent communément un âge supérieur à 60 ans. Cependant, la plupart des études cliniques et pré-cliniques se focalisent sur l'aspect développemental de la pathologie.

Il n'existe à ce jour pas de traitement pharmacologique efficace dans la prise en charge des patients atteints de TSA, à l'exception de certaines molécules comme la rispéridone (antipsychotique, agoniste partiel des récepteurs dopaminergiques D2 et sérotoninergiques 5-HT2) ou l'aripiprazol (antipsychotique, agoniste partiel des récepteurs dopaminergiques D2 et sérotoninergiques 5-HT1a) (Salazar de Pablo et al., 2022; Siafis et al., 2022) autorisés dans

certains pays comme les États-Unis pour la prise en charge de l'irritabilité et des troubles de l'humeur chez l'enfant et l'adolescent. Chez l'adulte, les traitements consistent en des interventions comportementales à visée thérapeutique afin d'améliorer la sévérité des symptômes (Speyer et al., 2021; Zeng et al., 2021).

La combinaison du vieillissement de la population associée à l'absence de traitement pour la prise en charge des patients atteints de TSA pose la problématique de comprendre comment les symptômes et leurs corrélats biologiques fonctionnels, cellulaires et moléculaires évoluent avec l'âge. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette optique. Pour ces projets, l'étude des effets du vieillissement dans un contexte autistique s'est focalisée sur une structure particulière, le striatum, qui est l'une des structures clés impliquées dans la physiopathologie des TSA (Pour revue : (Thabault et al., 2022))

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet d'une revue (Thabault et al., 2022), d'une publication en cours de révision, de deux communications écrites au congrès européen de neurosciences : la FENS2020 – Virtuel pour laquelle un *Travel Award* a été obtenu, et la FENS2022 – Paris, ainsi que d'une communication orale lors de la journée Neurogénétique organisée par la SFR FED 4226 Neuroimagerie Fonctionnelle Tours – Poitiers – Orléans.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES **4**

LISTE DES TABLEAUX **4**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **6**

INTRODUCTION ***9***

CHAPITRE 1 – Le striatum **10**

I. Le striatum : anatomie, fonctions 10

I.1. Organisation anatomique du striatum et place au sein des ganglions de la base 10

I.2. Fonctions striatales 12

I.3. Voie directe et indirecte 14

II. Le striatum, centre intégrateur des ganglions de la base 16

II.1. Les populations neuronales striatales 16

II.1.a Les neurones épineux de taille moyenne 16

II.1.b Les neurones non épineux de taille moyenne 18

II.1.c Autres interneurones 20

II.2. Les afférences au striatum : origine et neurotransmetteurs impliqués 22

II.2.a Afférences glutamatergiques 22

II.2.b Afférences dopaminergiques 23

II.2.c Afférences cholinergiques 24

II.2.d Afférences GABAergiques 24

CHAPITRE 2 – Les troubles du spectre autistique **28**

I. Les troubles du spectre autistique : définition, épidémiologie et étiologie 28

I.1. Définition et épidémiologie 28

I.2. Étiologie 29

II. Physiopathologie des troubles du spectre autistique 30

II.1. Symptômes cognitifs et associatifs 30
II.2. Symptômes moteurs 31
II.3. Comorbidités 32
II.4. Approches thérapeutiques 33
III. Les modèles animaux de troubles du spectre autistique 34
III.1. Modéliser les TSA chez l'animal 34
III.2. Modèle murin Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ 35
III.3. Modèle murin Cntnap2$^{-/-}$ 38
IV. Striatum et TSA – *Tiré à part* 41
CHAPITRE 3 : Le vieillissement 43
I. Le vieillissement : définition & chiffres clés 43
II. Vieillissement cérébral 44
II.1. Déclin cognitif et modifications anatomiques 44
II.2. Modifications cellulaires 46
II.3. Modifications moléculaires et neurotransmission 48
III. Troubles du spectre autistique et vieillissement 49
OBJECTIFS DE LA THÈSE 51
PROJET n°1 54
Age-related behavioral and striatal dysfunctions in Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ mouse model of autism spectrum disorder 54
PROJET n°2 78
Age-related behavioral and striatal dysfunctions in Cntnap2$^{-/-}$ mouse model of autism spectrum disorder 78
Méthodes 79
Animaux 79

Analyse comportementale 80
Injections virales intrastriatales 81
Enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* 82
Drogues 84
Analyse morphologique 85
Immunohistochimie 86
Analyses statistiques 87
Résultats 88
Discussion 104
DISCUSSION GÉNÉRALE 113
Mécanismes communs et spécifiques aux deux modèles 115
Altérations des IN PV striataux chez la souris Cntnap2 KO 119
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 122
ANNEXES 125
Annexe 1 : Cerebellar and striatal implications in autism spectrum disorders: from clinical observations to animal models 126
Annexe 2 : Effets du sexe sur les stéréotypies motrices chez les souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ 159
Annexe 3 : Effets du sexe sur les stéréotypies motrices des souris Cntnap2 KO 161
RÉFÉRENCES 163

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de l'organisation anatomique du striatum au sein des ganglions de la base 12

Figure 2 : Boucle motrice, associative et limbique 13

Figure 3 : Voie directe et voie indirecte 15

Figure 4 : Représentation schématique d'un MSN et son patron de décharge 17

Figure 5 : Représentation schématique des interneurones et leur patron de décharge 21

Figure 6 : Structure du récepteur GABA-A α1β2γ2 25

Figure 7 : Schéma bilan des afférences au striatum 27

Figure 8 : Symptomatologie des TSA et troubles moteurs associés 32

Figure 9 : Schéma bilan des altération phénotypiques chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ 37

Figure 10 : Schéma bilan des altération phénotypiques chez la souris Cntnap2$^{-/-}$ 40

Figure 11 : Modifications anatomiques liées au vieillissement 46

Figure 12 : Aggravation des stéréotypies motrices avec l'âge chez les souris Cntnap2 KO 89

Figure 13 : Changement du profil GABAergique striatal avec l'âge 91

Figure 14 : Atteintes morphologiques des MSN des souris Cntnap2 KO avec l'âge 93

Figure 15 : La densité et la morphologie des épines dendritiques sont altérées avec l'âge 95

Figure 16 : Les IN PV du DLS sont hyperexcitables et ont une activité spontanée anormale chez la souris Cntnap2 KO à 10w 98

Figure 17 : L'amplitude de la réponse évoquée semble diminuée dès 10w chez la souris Cntnap2 KO 99

Figure 18 : L'inhibition des IN PV permet de restaurer le phénotype des souris Cntnap2 KO à 10w 102

Figure 19 : Le comportement de grooming n'est pas affecté par le sexe des souris Shank3 WT ou KO 159

Figure 20 : Le comportement de rearing n'est pas affecté par le sexe des souris Shank3 WT ou KO 160

Figure 21 : Le comportement de grooming n'est pas affecté par le sexe des souris Cntnap2 WT ou KO 161

Figure 22 : Le comportement de Rearing n'est pas affecté par le sexe des souris Cntnap2 WT ou KO 162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau de classement des épines dendritiques 86

Tableau 2 : Propriétés de membrane des MSN du DLS 91

Tableau 3 : Tables récapitulatives des résultats 114

LISTE DES ABRÉVIATIONS

0-9

5-HT1a / 5-HT2 : Récepteur sérotoninergique 5-HT1a / 5-HT2

A

A2A : Récepteur adénosinergique A2A

ABA : Applied Behavior Analysis

ACSF : Artificial cerebrospinal fluid

AMM : Autorisation de mise sur le marché

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

APOE : Apolipoprotéine E

APV : (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid, or (2R)-amino-5-phosphonopentanoate

ARN : Acide ribonucléique

ASD : Autism Spectrum Disorder

ATP : Adénosine triphosphate

B

Bic : Bicuculline

BSA : Bovine serum albumin

BTBR : Black and Tan BRachyury

C

CA1 : Corne d'Ammon 1

Cal : Calrétinine

CASPR2 : Contactin-associated protein-like 2

ChR2 : Channelrhodopsin-2

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

cKI : conditional Knock-In

cKO : conditional Knock-Out

CNO : Clozapine N-oxide

CNQX : Cyanquixaline

Cntnap2 : Contactin Associated Protein 2

CPF : Cortex préfrontal

D

D1 / D2 / D5 : Récepteurs dopaminergiques de type 1 / 2 / 5

DLS : Striatum dorsolatéral

DMS : Striatum dorsomédian

DREADD : Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs

DSM-5 : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

E

E9/11/14/15/16 : Jour embryonnaire 9 / 11 / 14 / 15 / 16

EEG : Electroencéphalogramme

EGL : Eminence ganglionnaire latérale

EGM : Eminence ganglionnaire médiale

EGTA : Acide éthylène-di-(oxy-éthylènenitrilo) tétraacétique, Acide bis-(aminoéthyl)-glycoléther-N,N,N',N,'-tétraacétique

EHMT1/2 : Histone-lysine-N-méthyl-transférases 1 et 2

EYFP : Enhanced yellow fluorescent protein

F

FDA : Food and Drug Administration

Fmr1 : Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1

G

GABA : Acide Gamma Amino Butyrique

GABA-A/B : Récepteurs GABAergiques de type A et B

GPe / GPi : Globus Pallidus externe / interne

GTP : Guanosine triphosphate

H

HCN : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated

HDAC2 : Histone désacétylase 2

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique

hM3/4 : Récepteur muscarinique M3/4 humain

hSyn : Synapsine humaine

I

IN ACh : Interneurones cholinergiques

IN PV : Interneurones parvalbumine

INSEE : Institut National de la Statistique et des Études Économiques

IP3 : Inositol triphosphate

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

K

KCC2 : Cotransporteur K^+/Cl^-

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

Kv1.2 / Kv1.4 / Kv7 : Canaux potassiques voltage dépendants

L

LCR : Liquide céphalo-rachidien

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine

LED : Light-emitting diode

LTS : Low Threshold Spiking

LY294002 : Inhibiteur d'Akt

M

mEPSC : Courant post-synaptique excitateur miniature

mGluR / mGluR5 : Récepteurs glutamatergiques métabotropiques mGluR / mGluR5

mIPSC Courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures

MOR : Récepteur aux opioïdes μ

MSN : Neurones moyens épineux

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

N

N/D : Non disponible

Ngln3 : Neuroligine 3

NMDA : Acide (2R)-2-(méthylamino) butanedioïque

NOS : Nitric Oxyde Synthase

NPY : Neuropeptide Y

NST : Noyau Sous-Thalamique

O-P

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P14 / P28 : Jour post-natal 14 / 28

PB : Tampon phosphate

PBS : Tampon phosphate / saline

PCR : Réaction de polymérisation en chaine

PFA : Paraformaldéhyde

PI3K-Akt : Phospoinositide-3-kinase – protéine kinase B

PKC : Protéine Kinase C

PSD95 : Post Density 95 Associated Protein

PV : Parvalbumine

S

SAPAP : Synapse Associated Protein 90/Post Density 95 Associated Protein

sEPSC : Courants post-synaptiques excitateurs spontanés

SFARI : Simons Foundation Autism Research Initiative

Shank1 : SH1 and multiple ankyrin repeat domains

Shank3 : SH3 and multiple ankyrin repeat domains

Shank3B : SH3B and multiple ankyrin repeat domains

sIPSC : Courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés

SNc : Substance Noire compacte

SNr : Substance Noire réticulée

SOM : Somatostatine

T

TEACCH : Treatment and Education of Autistic and related Communication Handicapped Children

TSA : Troubles du Spectre Autistique

U-V-W

UNC0642 : Inhibiteur spécifique de EHMT1 et 2

VFT : Venus Flytrap

vGlut 1/2 : Transporteur vésiculaire du glutamate vGlut 1/2

VIP : Vasoactive Intestinal Polypeptide

VPA : Acide valproïque

WT : Wild-Type

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 – Le striatum

I. Le striatum : anatomie, fonctions

I.1. Organisation anatomique du striatum et place au sein des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont un ensemble de structures sous-corticales, remarquablement conservées dans l'évolution. Les ganglions de la base, aussi appelés noyaux gris centraux, sont classiquement décrit au nombre de six chez l'Homme, à savoir : le noyau caudé, le putamen, le noyau accumbens, le globus pallidus, le noyau sous-thalamique et la substance noire (Graybiel, 2000). Cependant, le terme de ganglions de la base se réfère dans son sens anatomique le plus strict au noyau caudé, au putamen, au noyau accumbens et au globus pallidus seulement, faisant du noyau sous-thalamique et de la substance noire des noyaux associés, en raison de leurs liens fonctionnels avec les ganglions de la base (Lanciego et al., 2012).

Le striatum tire son nom du latin, anciennement *Corpus Striatum*, signifiant corps strié, en raison du grand nombre de faisceaux de fibres qui le traversent. Chez les primates et chez l'Homme, il est formé pour sa partie dorsale du noyau caudé et du putamen, situé respectivement en médial et en latéral, tandis que la partie ventrale du striatum est formée par le noyau accumbens. Ici, le noyau caudé et le putamen sont anatomiquement séparés par la capsule interne, qui est absente chez les autres mammifères pour qui les deux structures ne sont pas physiquement séparés, formant une unique structure appelée striatum dorsal (Lanciego et al., 2012). Les autres noyaux des ganglions de la base sont organisés de la même façon entre les espèces.

Le striatum a longtemps été considéré comme une structure très hétérogène, tant dans ses populations neuronales que dans les neurotransmetteurs et modulateurs impliqués. La structure a en effet la particularité d'avoir une organisation cellulaire non-laminaire, contrairement au cortex, à l'hippocampe ou au cervelet par exemple. Ceci implique que les afférences reçues en un point précis du striatum ne peuvent être intégrées de façon séquentielle. L'organisation striatale n'est cependant pas totalement hétérogène, mais partagée entre deux compartiments biochimiquement distincts : le striosome et la matrice (Brimblecombe & Cragg, 2017). Le premier est défini biochimiquement comme étant les zones de forte expression de plusieurs marqueurs spécifiques comme le récepteur aux opioïdes μ (MOR), la substance P, la met-enképhaline ou encore la calrétinine et la matrice correspond aux zones de forte expression de calbindine, de somatostatine, d'enképhaline ou encore de marqueurs cholinergiques comme l'acétylcholinestérase ou l'acétyltransférase. Certaines études ont même proposé l'existence d'un troisième compartiment qui serait une zone circulaire autour des striosomes où les marqueurs striosomaux et matriciels sont coexprimés. L'existence de ce troisième compartiment ne fait cependant pas consensus à ce jour (pour revue : Brimblecombe and Cragg, 2017).

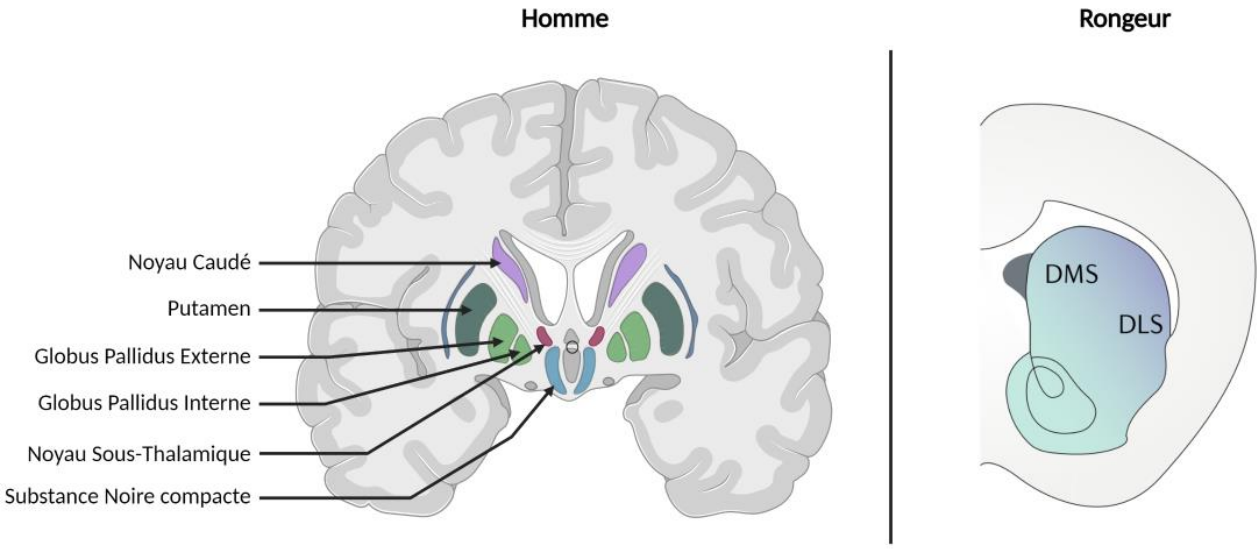


Figure 1 : Schéma de l'organisation anatomique du striatum au sein des ganglions de la base
Coupe coronale de cerveau humain (gauche) et de rongeur (droite). Légende : DMS = Striatum dorsomédian. DLS = striatum dorsolatéral. Adapté de (Cox & Witten, 2019; Graybiel, 2000).

I.2. <u>Fonctions striatales</u>

Le striatum dorsal est impliqué dans de nombreux processus, moteurs, associatifs et cognitifs (Pour revue : Subramanian et al., 2017). Ces fonctions sont régulées par ses différents territoires, principalement ségrégés par la provenance de leurs afférences. Ainsi, le striatum dorsolatéral (DLS) est impliqué dans la coordination sensori-motrice, le contrôle oculomoteur, la marche, l'équilibre et le contrôle postural (Figure 2). Le striatum dorsolatéral est également impliqué dans la formation et le maintien des habitudes, définies comme étant des composantes essentielles et persévérantes de la vie quotidienne permettant de réaliser des tâches de routine (Graybiel & Grafton, 2015; Malvaez & Wassum, 2018; Subramanian et al., 2017). Le striatum dorsomédian (DMS) est quant à lui impliqué dans les comportements compulsifs, l'inhibition de l'action, l'attention, la sociabilité et les comportements dirigés vers un but, définis comme étant l'ensemble des comportements visant à obtenir une récompense

(Figure 2) (Báez-Mendoza & Schultz, 2013; Malvaez & Wassum, 2018; Subramanian et al., 2017). Le striatum ventral, composé du noyau accumbens, est quant à lui un acteur central du système de la récompense, impliqué dans la motivation, l'apprentissage renforçant et le traitement de la récompense (Yang et al., 2018).

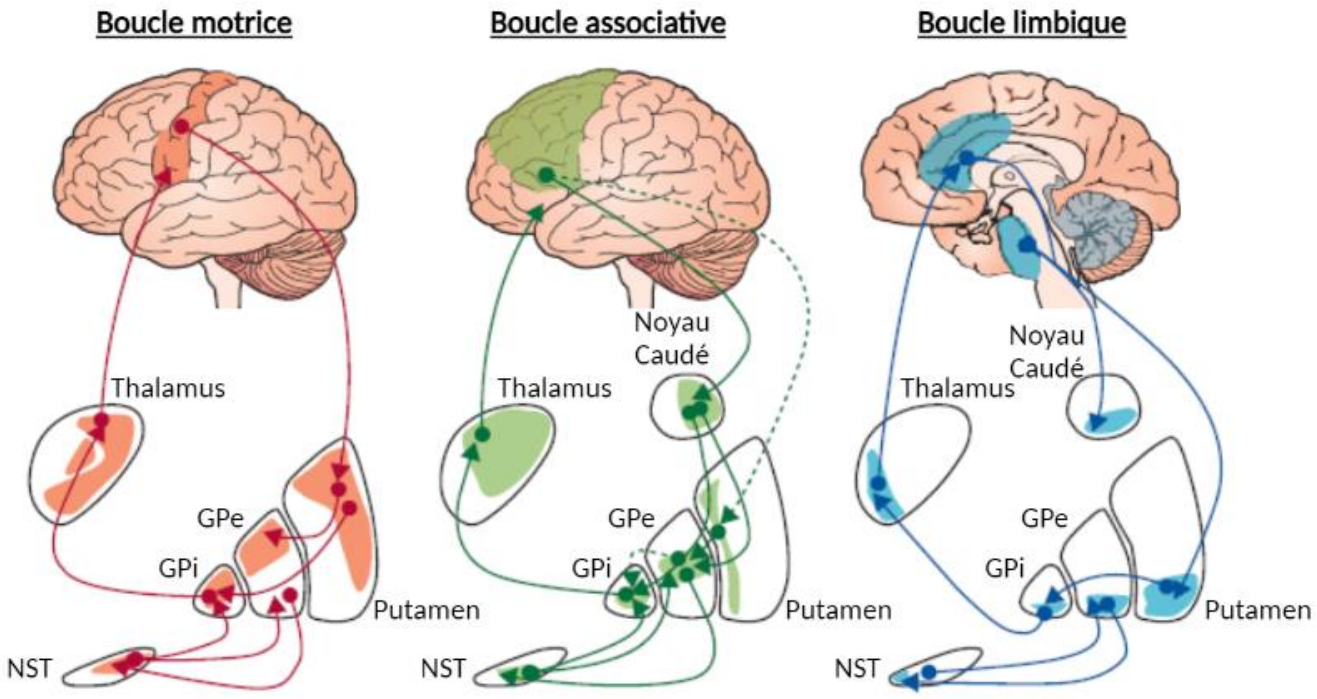


Figure 2 : Boucle motrice, associative et limbique
Les boucles motrice, associative et limbique ont une origine corticale différente mais ont toutes trois un relai au niveau du striatum. Dans la boucle motrice par exemple, les neurones pyramidaux de la couche V du cortex projettent leurs axones sur la partie dorsolatérale du striatum, ici le Putamen, d'où partent des projections vers le Globus Pallidus interne ou externe selon la voie de sortie du striatum (voir Chapitre 1, Partie I.3). Adapté de (Obeso et al., 2008).

I.3. Voie directe et indirecte

Les neurones épineux de projection (*medium spiny neurons*, MSN) sont la seule voie de sortie du striatum. En fonction de la cible de ces neurones de projection (substance noire réticulée ou segment externe du globus pallidus), deux voies se distinguent : la voie striato-nigrale et la voie striato-pallidale, impliquant les neurones de projections correspondants. Ces voies sont gérées par les influx dopaminergiques en provenance de la substance noire compacte (SNc), qui assurent alors le contrôle de la boucle cortico-striato-thalamo-corticale.

La voie striato-nigrale est appelée voie directe en raison de la présence d'une seule structure relai entre le striatum et le thalamus (Figure 3). Dans cette voie, la dopamine provenant de la SNc active les récepteurs D1 dopaminergique des MSN striato-nigraux, facilitant leur excitation. L'activation de ces neurones provoque la libération de d'acide gamma-amino-butyrique (GABA) au niveau de la substance noire réticulée, qui est alors inhibée et n'est plus en mesure d'inhiber le thalamus. Ce dernier peut donc facilement décharger au niveau du cortex. Les projections thalamo-corticales étant glutamatergiques, le cortex est alors excité et l'information est ensuite transmise à la moelle épinière et aux circuits cérébelleux.

La voie striato-pallidale est quant à elle appelée voie indirecte en raison du plus grand nombre de structures relais (3 au total) entre le striatum et le thalamus (Figure 3). Dans ce cas, la dopamine libérée au niveau du striatum active les récepteurs D2 dopaminergiques des MSN striato-pallidaux, inhibant leur fonctionnement. Ces derniers étant GABAergiques, ils ne peuvent plus assurer l'inhibition du segment externe du globus pallidus qui va alors être activé. Cette structure GABAergique va alors fortement inhiber le noyau sous-thalamique. En

réponse à cette inhibition, l'activation de la substance noire réticulée est levée, et elle exerce alors une forte inhibition au niveau du thalamus. À l'inverse de la voie directe, ici les afférences thalamiques du cortex ne sont pas activées et le message est interrompu. Ces deux voies sont actives en parallèle, permettant d'ajuster le niveau de réponse au niveau du thalamus puis du cortex.

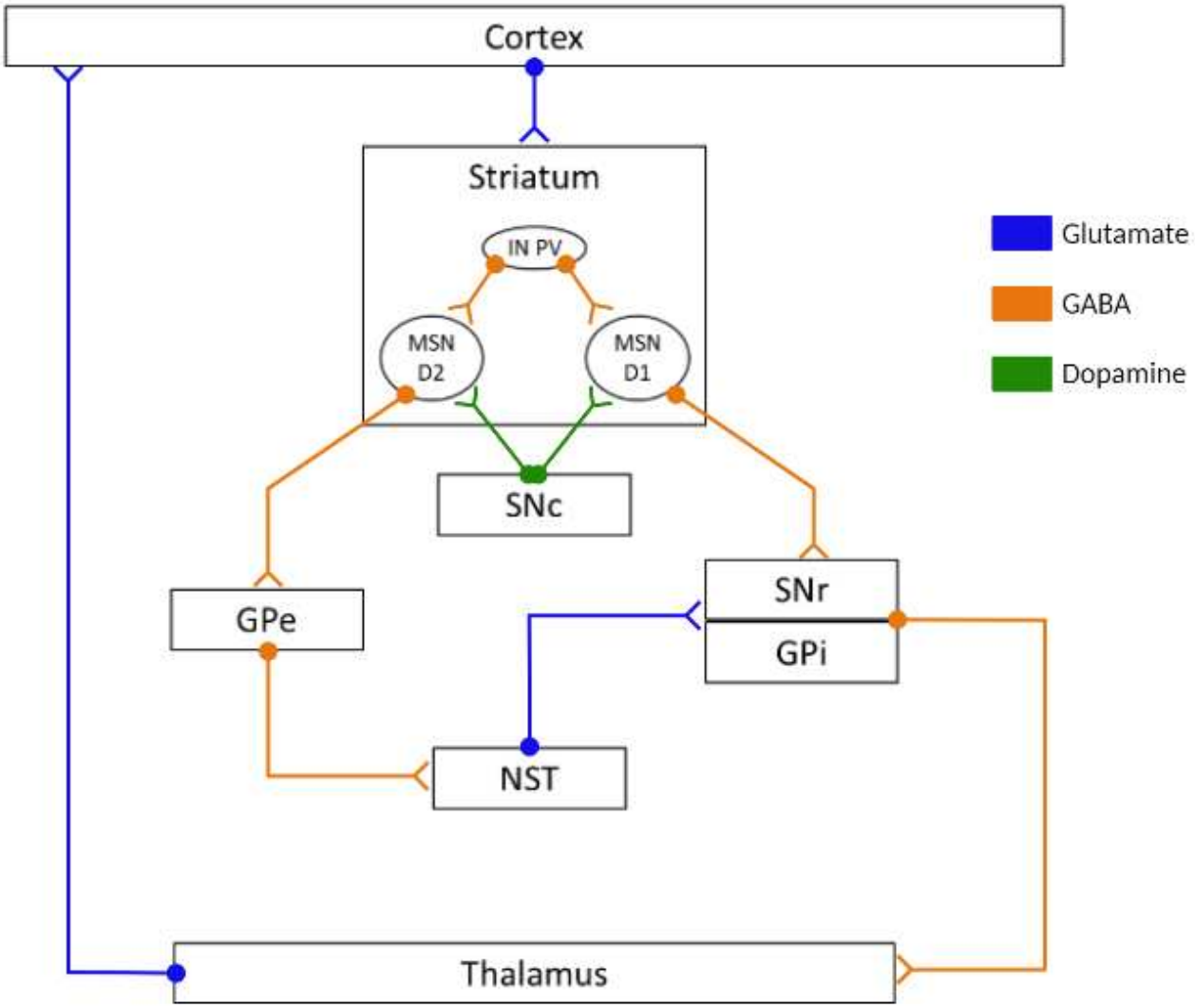


Figure 3 : Voie directe et voie indirecte
La voie directe, médiée par les MSN exprimant le récepteur dopaminergique D1, ne présente qu'un relai entre le striatum et le thalamus : SNr/GPi. La voie indirecte, médiée par les MSN exprimant le récepteur dopaminergique D2 présente 3 relais entre le striatum et le thalamus : GPe – NST – SNr/GPi. Légende : SNc : Substance Noire compacte | SNr : Substance Noire réticulée | GPe : Globus Pallidus externe | GPi : Globus Pallidus interne | NST : Noyau Sous-Thalamique. Adapté de (Thabault et al., 2022).

II. Le striatum, centre intégrateur des ganglions de la base

II.1. Les populations neuronales striatales

II.1.a Les neurones épineux de taille moyenne

Les MSN sont la principale population neuronale du striatum puisqu'ils représentent plus de 95% des neurones du striatum (Kreitzer, 2009). Ces neurones partagent tous une morphologie similaire, à savoir un soma d'environ 20µm de diamètre et un grand nombre de prolongements qui sont caractérisés par le grand nombre d'épines dendritiques, à l'origine du nom de ces neurones (Lanciego et al., 2012). L'ensemble des MSN partagent des paramètres fonctionnels communs, à l'exception des paramètres d'excitabilité. Ainsi, ils sont éléctrophysiologiquement caractérisés par un potentiel de repos hyperpolarisé (environ -80mV) et une faible valeur de résistance d'entrée. Ces caractéristiques sont permises par la forte inhibition assurée par les interneurones locaux mais également par l'expression de canaux potassiques avec rectification entrante, à savoir les canaux Kirs (Nisenbaum et al., 1996; Uchimura et al., 1989). Leur patron de décharge est également caractéristique. Il comprend d'une part un délai dans l'initiation des potentiels d'action sous la forme d'une dépolarisation lente, provoqué par l'activité de canaux potassiques voltage dépendants (Kv1.2 et Kv4.2) et avec une conductance persistante (Kv7) (Kreitzer, 2009; Nisenbaum et al., 1996). D'autre part, la fréquence de décharge des MSN est relativement faible, en raison de l'activation de canaux potassiques calcium-dépendants (Bargas et al., 1998; Kreitzer, 2009). Les paramètres d'excitabilité des MSN sont cependant légèrement différents selon qu'ils

soient striato-nigraux ou striato-pallidaux (Kreitzer & Malenka, 2007). En effet, parmi les paramètres d'excitabilité mesurés par les auteurs, seule la fréquence de décharge en réponse à des stimuli dépolarisants est différente entre les deux populations (+50% pour les MSN striato-pallidaux) alors que les valeurs de potentiel de repos (-91 ± 1 mV dans les deux cas) et de résistance d'entrée (51 ± 8 MΩ MSN striato-nigraux, 64 ± 8 MΩ MSN striato-pallidaux) sont semblables entre les deux populations.

Au niveau moléculaire, les MSN des deux voies expriment des marqueurs spécifiques permettant de les différencier. Ainsi, les MSN striato-nigraux expriment les récepteurs D1 dopaminergiques, les récepteurs muscariniques M4 cholinergiques et d'autres peptides comme la substance P et la dynorphine. Les MSN striato-pallidaux quant à eux expriment le récepteur D2 à la dopamine, le récepteur A2A à l'adénosine ainsi que l'enképhaline (Lobo, 2009).

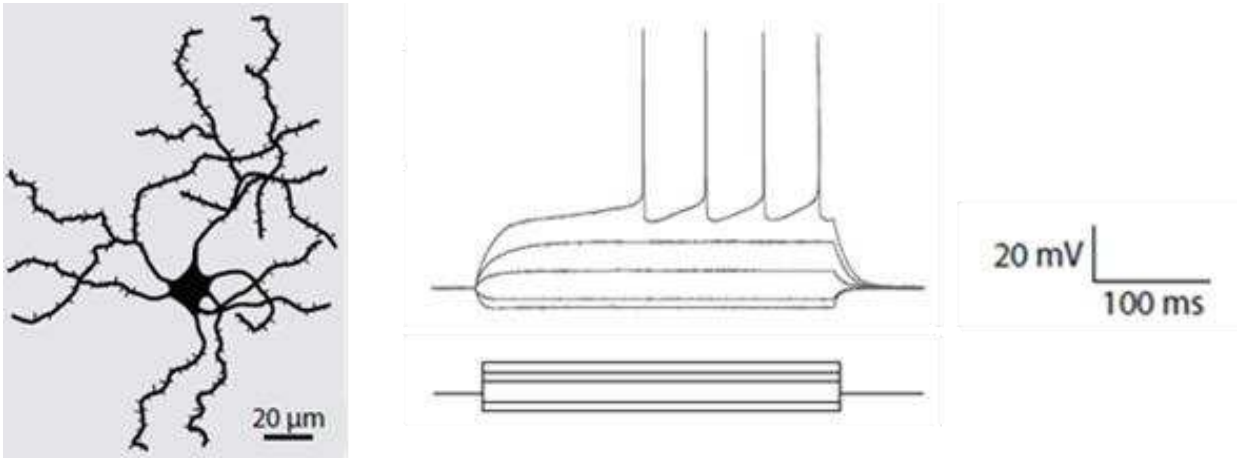


Figure 4 : Représentation schématique d'un MSN et son patron de décharge
Les MSN sont caractérisés par la taille moyenne de leur soma et le grand nombre d'épines dendritiques portées par les dendrites. Leur patron de décharge est caractéristique avec un délai à l'initiation des potentiels d'action et une faible résistance d'entrée. Adapté de (Kreitzer, 2009).

II.1.b Les neurones non épineux de taille moyenne

Les neurones non épineux de taille moyenne du striatum sont des interneurones (IN) avec un soma d'environ 16 à 18µm de diamètre, exprimant la parvalbumine (PV), et représentent moins de 1% de la population neuronale totale du striatum (Tepper et al., 2008). La PV est une protéine de faible poids moléculaire (10-12.5 kDa) codée chez l'Homme par le gène PVALB situé sur le bras long du chromosome 22 (22q12.3). Cette protéine est un chélateur calcique capable de fixer 2 ions Ca^{2+} (Arif, 2009). Dans le striatum, l'expression de la PV est un marqueur spécifique d'une population d'interneurones partageant des similitudes sur les plans morphologiques et moléculaires, mais différents d'un point de vue fonctionnel. Sur le plan morphologique tout d'abord, les IN PV sont caractérisés par un plexus axonal extrêmement dense, s'étendant au-delà de leur arborisation dendritique, elle-même dépourvue d'épines dendritiques. Cette complexité axonale leur permet d'établir un grand nombre de synapse, notamment au niveau des épines dendritiques des MSN. Pour preuve, il est estimé qu'au moins 25% des MSN se trouvant dans un rayon de 250µm d'un IN PV sont innervés par ce dernier (Tepper et al., 2008). Il est également estimé qu'un unique MSN reçoit des afférences de 4 à 27 IN PV différents, et qu'un unique IN PV peut établir des synapses avec pas moins de 135 à 541 MSN différents (Kreitzer, 2009). Cette très haute connectivité sur les MSN permet aux IN PV d'assurer le phénomène d'inhibition en amont, c'est-à-dire en amont de l'intégration du message excitateur provenant du cortex ou du thalamus. Sur le plan moléculaire, les IN PV expriment, en plus de leur marqueur spécifique (PV), les récepteurs D5 dopaminergiques ainsi que des récepteurs nicotiniques et muscariniques cholinergiques ou encore des connexines permettant la formation de jonctions communicantes (Abudukeyoumu et al., 2019; English et al., 2012; Kreitzer, 2009; Tepper et al., 2010).

Les IN PV sont distribués de manière graduelle, avec une plus forte concentration dans la partie dorsolatérale et une concentration plus faible dans la partie dorsomédiale. Les IN PV sont des interneurones dit « à décharge rapide » (*fast-spiking*) (Figure 5A), pouvant dépasser les 200Hz en cas de très forte stimulation (Tepper et al., 2008). Cette capacité à décharger à des fréquences élevées s'explique par la faible durée de la phase d'hyperpolarisation à l'issue d'un potentiel d'action, permise par l'expression de la sous-unité Kv3.4 des canaux potassiques voltage dépendants Kv3.1 (Baranauskas et al., 2003). Les IN PV striataux montrent également des oscillations de leur potentiel de membrane de façon voltage dépendante. Des enregistrements de potentiels de champs montrent que ces oscillations se situent dans les fréquences caractéristiques des oscillations gamma (40-100 Hz). De plus, les IN PV ont une fréquence de décharge supérieure aux MSN *in vivo* et seraient à l'origine et en charge du maintien des oscillations gamma observées dans les enregistrements de potentiels de champs (Kreitzer, 2009). Différents modèles biophysiques viennent confirmer cette hypothèse, montrant que des IN PV en réseau sont directement responsable de la génération de ces oscillations gamma (Chartove et al., 2020). Enfin, les paramètres d'excitabilité des IN PV diffèrent d'un territoire striatal à l'autre chez la souris, les IN PV du striatum dorsolatéral présentant une valeur de rhéobase plus importante (DLS = 583,6 ± 36,17 pA *vs* DMS = 424,4 ± 26,05 pA), une résistance de membrane réduite (DLS = 84,7 ± 7,44 MΩ *vs* DMS = 118,1 ± 8,68 MΩ) et une résistance d'entrée réduite (DLS = 28,21 ± 1,26 MΩ *vs* DMS = 42,76 ± 2,01 MΩ) par rapport aux IN PV du striatum dorsomédian (Monteiro et al., 2018).

II.1.c Autres interneurones

D'autres types d'interneurones sont présents dans le striatum. Parmi eux se trouvent les interneurones exprimant le neuropeptide Y (NPY), la somatostatine (SOM), l'oxyde nitrique synthase (NOS), ou pour certains la calrétinine. Ces interneurones GABAergiques ont un seuil de décharge faible (Low Threshold Spiking, LTS) et ont un patron de décharge caractéristique, associant un potentiel de repos dépolarisé, une importante résistance d'entrée et un seuil de décharge faible (Kreitzer, 2009) (Figure 5B). Leurs axones émettent des contacts synaptiques inhibiteurs sur les MSN et les IN PV (Kreitzer, 2009; Tepper et al., 2010)(Kreitzer, 2009; Tepper et al., 2010) et ces interneurones ont une fréquence d'oscillations dans les ondes beta (10-30 Hz), de façon calcium-dépendante (Tepper et al., 2010).

On retrouve également dans le striatum des interneurones cholinergiques (ACh), qui sont des neurones de grande taille (20-50µm de diamètre), dépourvus d'épines dendritiques et sont actifs de façon tonique (Figure 5C). Ils déchargent de manière spontanée *in vivo*, caractéristique permise par leur potentiel de repos dépolarisé, couplé à une forte expression de canaux sodiques (Kreitzer, 2009). Ces interneurones présentent également un patron de décharge caractéristique, avec une importante résistance d'entrée, et une fréquence de décharge limitée à 2-10 Hz, en raison d'une phase d'hyperpolarisation de grande amplitude et de longue durée à l'issue d'un potentiel d'action. Les IN ACh projettent sur l'ensemble des populations neuronales du striatum, y compris d'autres IN ACh (Kreitzer, 2009; Tepper et al., 2010).

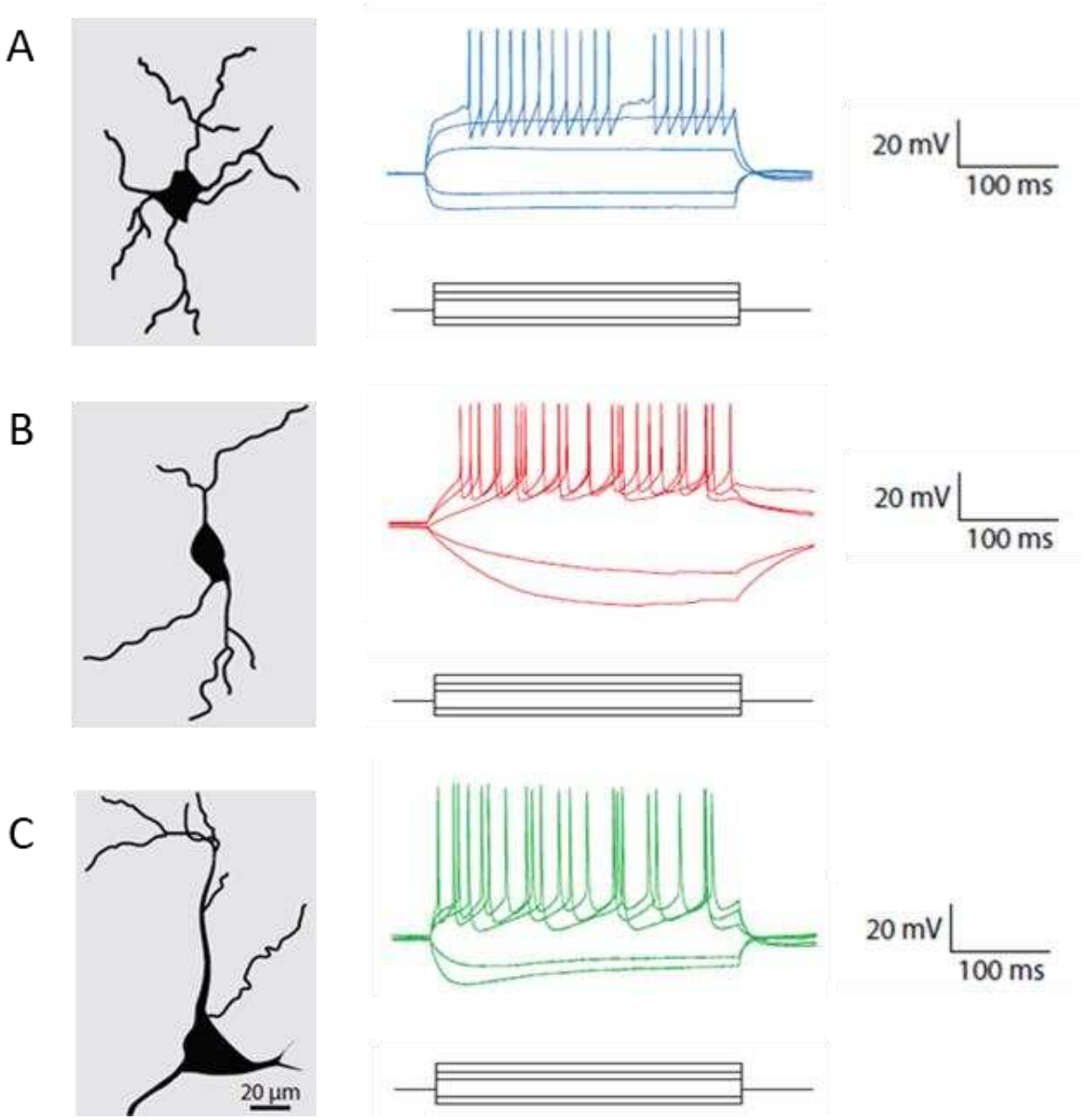


Figure 5 : Représentation schématique des interneurones et leur patron de décharge
Les IN PV (A) sont les neurones de taille moyenne non-épineux du striatum. Leur patron de décharge est caractérisé par la grande fréquence des potentiels d'action. Les IN LTS (B) ont un soma de taille moyenne et ont également un aspect non épineux. Leur patron de décharge se caractérise par un seuil de dépolarisation bas. Les IN ACh (C) ont quant à eux un soma de plus grande taille et leur patron de décharge est caractérisé par une longue phase d'hyperpolarisation. Adapté de (Kreitzer, 2009).

II.2. Les afférences au striatum : origine et neurotransmetteurs impliqués

II.2.a Afférences glutamatergiques

Les principales afférences glutamatergiques striatales proviennent des neurones pyramidaux de la couche V du cortex (Figure 7), qui projettent sur le striatum de façon ipsi- et controlatérale pour les neurones du tractus intratélencéphalique et de façon ipsilatérale via le tractus pyramidal (Li & Pozzo-Miller, 2020; Reiner et al., 2010). Ces afférences corticales se connectent à différents territoires du striatum en fonction de leur provenance. Ainsi, les cortex moteur, sensoriel, insulaire et orbital projettent sur la partie dorsolatérale du striatum, tandis que le cortex cingulaire antérieur, l'amygdale et le cortex visuel projettent sur la partie dorsomédiane du striatum. Le Noyau Accumbens quant à lui reçoit des projections en provenance des cortex limbique, infra-limbique et de l'amygdale (Fuccillo, 2016).

L'autre source de glutamate au sein du striatum correspond aux afférences thalamiques (Figure 7) qui proviennent principalement du noyau médian parafasciculaire mais également des noyaux intralaminaires et du noyau ventral moteur du thalamus (Lanciego et al., 2012; Parievsky et al., 2017). Les projections cortico-striatales et thalamo-striatales ont pour différence le type de transporteur vésiculaire du glutamate (vGlut) qu'elles expriment : les projections cortico-striatales expriment le vGlut1 et les projections thalamo-striatales expriment le vGlut2 (Parievsky et al., 2017).

Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques AMPA (acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque), NMDA (acide (2R)-2-(méthylamino)butanedioïque) et

kaïnate ainsi que les récepteurs métabotropiques (mGluR) sont exprimés dans le striatum aussi bien par les MSN que par les interneurones recevant une innervation glutamatergique.

II.2.b Afférences dopaminergiques

Les afférences dopaminergiques au niveau du striatum proviennent de la SNc, située anatomiquement en dessous du striatum (axe vertical) (Figure2). Les neurones de la substance noire expriment une enzyme, la tyrosine hydroxylase, qui est l'enzyme permettant la conversion de la tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-Dopa), précurseur ensuite transformé en dopamine par la dopa décarboxylase. La dopamine ainsi libérée au niveau du striatum peut alors se fixer sur deux familles de récepteurs à la dopamine, les récepteurs D1 et assimilés (D1 et D5) ou D2 et assimilés (D2, D3 et D4). Ce sont des récepteurs métabotropiques liées à une protéine G_s activatrice pour les premiers, et à une protéine G_i inhibitrice pour les seconds. Les IN PV et LTS expriment le récepteur D5, que l'on retrouve aussi au niveau des interneurones ACh où ils sont coexprimés avec le récepteur D2 (Kreitzer, 2009). C'est en fait au niveau des neurones épineux de projection que la ségrégation D1 vs D2 est la plus importante. En effet, les neurones de projection striato-pallidaux expriment les récepteurs D2 tandis que les neurones de projection striato-nigraux expriment les récepteurs D1 (Gerfen et al., 1990). Cette ségrégation permet de distinguer les deux voies de sortie du striatum, directe et indirecte.

II.2.c Afférences cholinergiques

Les afférences cholinergiques du striatum proviennent du striatum lui-même, grâce aux IN ACh (Figure 7). Ces IN innervent l'ensemble des neurones du striatum, qui expriment différents récepteurs. Les récepteurs cholinergiques nicotiniques, de type ionotropique, ne sont exprimés qu'au niveau des interneurones PV, les autres neurones striataux exprimant des récepteurs métabotropiques dits muscariniques. C'est ainsi que les neurones épineux de projection striato-pallidaux expriment le récepteur M1, couplé à une protéine G_q activant la voie Inositol triphosphate (IP3) / Protéine Kinase C (PKC) alors que les neurones épineux de projection striato-nigraux coexpriment les récepteurs M1 et M4, ces derniers étant couplés à une protéine G_i inhibitrice. Les interneurones LTS coexpriment les récepteurs M1(G_q) et M2(G_i) et les interneurones cholinergiques eux-mêmes coexpriment les récepteurs M2(G_i) et M4(G_i) (Kreitzer, 2009).

II.2.d Afférences GABAergiques

Les afférences inhibitrices GABAergiques du striatum proviennent également du striatum lui-même et forment un réseau local inhibiteur (Figure 7). Selon la population neuronale recevant l'innervation GABAergique, l'origine des afférences diffère. Ainsi, les MSN reçoivent des afférences GABAergiques en provenance des interneurones PV et LTS ainsi que par des collatérales d'autres MSN tandis que les interneurones reçoivent des afférences GABAergiques dont les origines sont moins nombreuses. Les IN PV n'ont pour afférences GABAergiques que d'autres IN alors que celles des IN cholinergiques ne proviennent que des MSN (Kreitzer, 2009; Logie et al., 2013; Tepper et al., 2018).

Les récepteurs GABAergiques striataux sont les récepteurs ionotropiques GABA-A et les récepteurs métabotropiques GABA-B. Les premiers sont des hétéropentamères (Figure 6) dont il existe 19 sous-unités différentes chez les mammifères (6 sous-unités α, 3 sous-unités β, 3 sous-unités γ, 1 sous-unité δ, 1 sous-unité ε, 1 sous-unité π, une sous-unité θ et 3 sous-unités ρ) (Sieghart, 2006). Les récepteurs GABA-A striataux correspondent aux combinaisons α1β2γ2, α2β3γ2, α3β2γ2 et α3β3γ2 pour les récepteurs synaptiques et α4β3δ pour les récepteurs extrasynaptiques (Goetz et al., 2007; Sieghart, 2006). Ces récepteurs ionotropiques sont capables de fixer 2 molécules de GABA et forment un canal anionique perméables d'une part aux ions Cl^-, et d'autres part aux ions HCO_3^- (Figure 6).

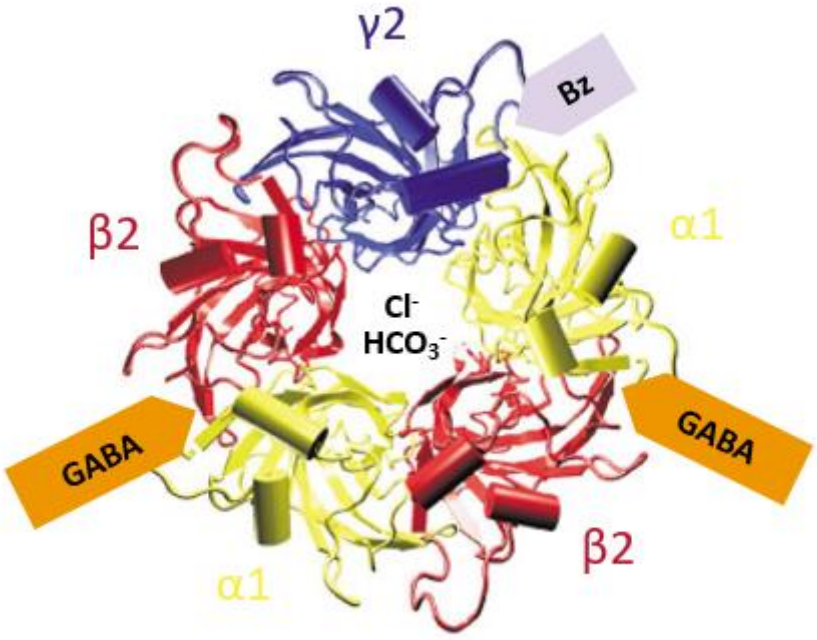


Figure 6 : Structure du récepteur GABA-A α1β2γ2
Les récepteurs GABA-A sont des hétéropentamères constitués d'un assemblage de 3 différentes sous-unités, présentes en un ou deux exemplaires. Dans l'exemple du récepteur GABA-A α1β2γ2, les sites de fixation du GABA si situent à la jonction entre les sous-unités α et β. Le récepteur comprend également un site de fixation aux benzodiazépines (noté Bz) au niveau de la jonction entre la sous-unité α et γ. Le pore formé par le canal est perméable aux ions Cl- et HCO3-. Adapté de (Ernst et al., 2003).

Chez l'adulte, l'expression du cotransporteur K^+/Cl^- KCC2 dans les neurones permets de maintenir une concentration en ions Cl^- intracellulaire faible. Ici, l'activation des récepteurs GABA-A provoque l'entrée massive d'ions Cl^-, conduisant à une hyperpolarisation du neurone, ce qui confère au GABA son rôle inhibiteur (Goetz et al., 2007; Sedmak et al., 2016). Le GABA, via ses récepteurs GABA-A a en revanche un rôle excitateur durant le développement (avant 16 semaines chez l'Homme, avant P6 chez le rongeur), l'expression de KCC2 étant absente ou insuffisante pour refluer les ions Cl^- (Rivera et al., 2005; Sedmak et al., 2016).

Les récepteurs métabotropiques GABA-B sont quant à eux principalement retrouvés au niveau présynaptique (Logie et al., 2013) où ils assurent le rôle d'autorécepteur (Evenseth et al., 2020). Ces récepteurs sont des hétérodimères composés d'une sous-unité GABA-B1 et d'une sous-unité GABA-B2, chacune étant composée d'un domaine Venus Flytrap (VFT) exposé du coté extracellulaire, de 7 domaines transmembranaires et d'une queue C-terminale intracellulaire (Evenseth et al., 2020). Le récepteur GABA-B est couplé à une protéine $G\alpha_{i/o}$ lui permettant d'assurer son rôle inhibiteur (Evenseth et al., 2020).

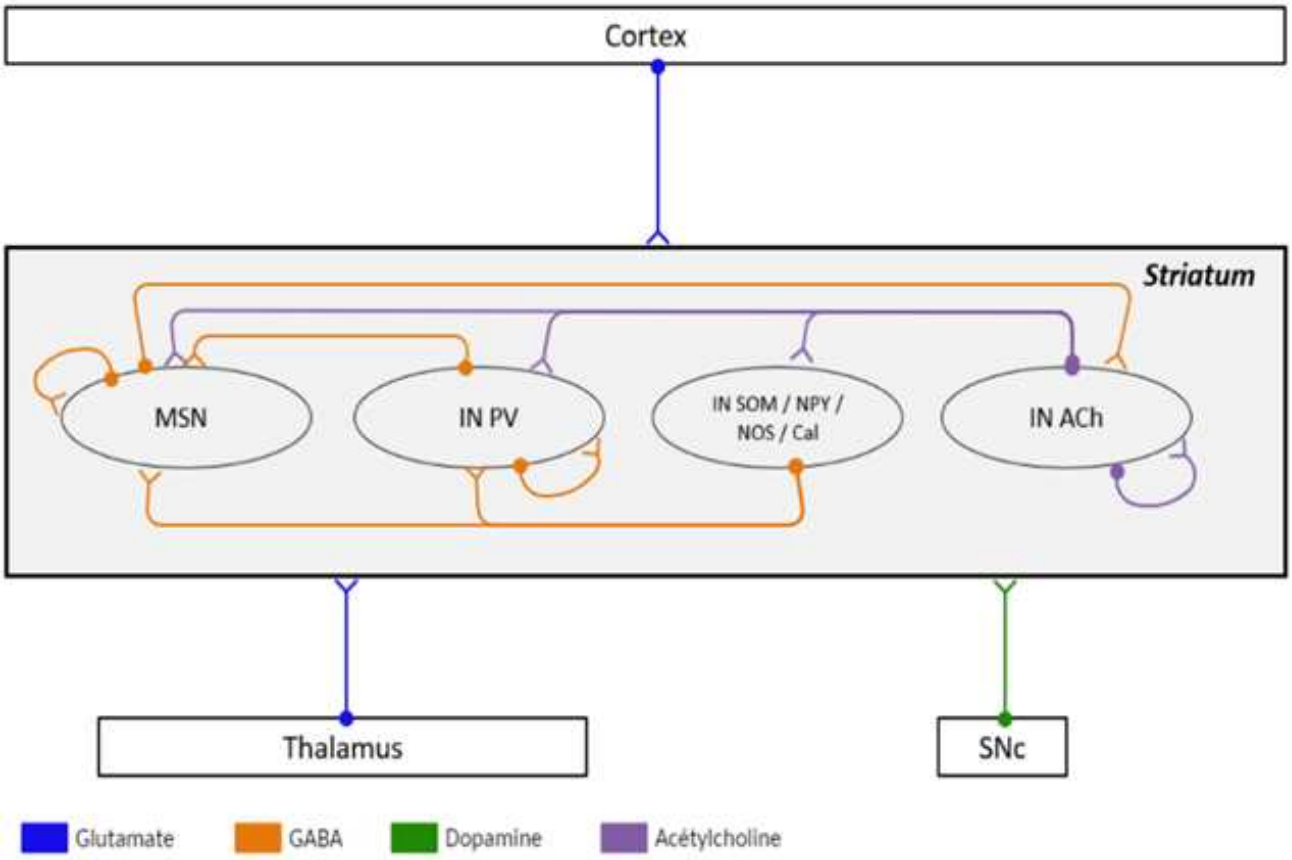


Figure 7 : Schéma bilan des afférences au striatum
Dans le schéma, le terme MSN renvoie aux MSN des deux voies, les deux connectivités étant identiques au sein du striatum. Par soucis de clarté, les flèches connectées au cadre Striatum provenant du cortex, du thalamus et de la SNc illustrent une afférence sur chaque population neuronale du striatum. D'après (Haber, 2015; Kreitzer, 2009; Kreitzer & Malenka, 2008; Lanciego et al., 2012; Li & Pozzo-Miller, 2020; Logie et al., 2013; Subramanian et al., 2017; Tepper et al., 2018).

CHAPITRE 2 – Les troubles du spectre autistique

I. Les troubles du spectre autistique : définition, épidémiologie et étiologie

*I.1. Définition et ép*idémiologie

D'après son organisme « Santé Publique France » le Ministère de la Santé estimait à environ 120 000 le nombre de personnes qui étaient atteintes de troubles du spectre autistique (TSA) en 2017 en France. La prévalence estimée y est d'environ 74 cas pour 10 000 enfants, avec un ratio de 3,7 garçons pour 1 fille atteinte de TSA. L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) estime quant à elle qu'environ 1 personne sur 160 est atteinte de TSA dans le monde. Publiée en février 2022, la 11e version de la Classification Internationale des Maladies (CIM-11) reprend les deux dimensions symptomatiques de la 5e version du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (*Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders*, DSM-V) publié en 2013. Ce dernier définit les troubles du spectre autistique dans deux dimensions symptomatiques, à savoir les déficits persistants de la communication et des interactions sociales observés dans des contextes variés, ainsi que le caractère restreint et répétitif des comportements, des intérêts ou des activités. La sévérité du diagnostic est basée sur le nombre de symptômes relevant des deux dimensions symptomatiques.

I.2. Étiologie

L'étiologie des troubles du spectre autistique est multifactorielle. Les causes peuvent être génétiques ou environnementales par opposition les unes aux autres. Les formes génétiques de TSA sont causées par des mutations dans des gènes de susceptibilité. Ces mutations provoquent des formes syndromiques ou non-syndromiques de TSA, selon que la mutation soit germinale ou *de novo*. La base de données de la fondation Simons pour la recherche sur l'autisme (*Simons Foundation Autism Research Initiative*, SFARI) répertorie 1 120 gènes impliqués dans des cas de TSA. Parmi ces gènes, 239 sont classés comme provoquant des formes syndromiques. Les autres gènes sont classés en 3 catégories selon la probabilité de lien avec des cas de TSA : hautement liés (206 gènes), certainement liés (198 gènes) et probablement liés (477 gènes). Ces 3 catégories regroupent des mutations *de novo* de gènes identifiés chez des patients respectivement au moins 3 fois, 2 fois ou une seule fois.

Les formes non-génétiques de TSA sont dites « environnementales » en raison de la présence de plusieurs facteurs de risques, comme par exemple une exposition prénatale à une infection virale, l'exposition prénatale à des toxines ou des agents pharmacologiques, une déficience en zinc du fœtus, le diabète chez la femme enceinte et l'âge avancé de la mère au moment de la grossesse (pour revue : (Grabrucker, 2013; Karimi et al., 2017; Modabbernia et al., 2017)).

II. Physiopathologie des troubles du spectre autistique

II.1. Symptômes cognitifs et associatifs

Chaque dimension symptomatique décrite par le DSM-V regroupe plusieurs symptômes. Les déficits persistants de la communication et des interactions sociales observés dans des contextes variés, incluent ainsi des déficits dans la réciprocité sociale ou émotionnelle (ex. : incapacité à maintenir une conversation simple, incapacité à initier ou répondre à une situation de sociabilité, etc.), des déficits dans les comportements de communication non verbale communément utilisés pour les interactions sociales (ex. : maintien du regard, langage corporel inadapté, etc.) et des déficits à développer, maintenir et comprendre les relations sociales (ex. : incapacité à s'adapter à différents contextes sociaux, absence d'intérêt envers d'autres personnes, etc.). Le caractère restreint et répétitif des comportements, des intérêts ou des activités, inclut des mouvements, jeux, ou discours stéréotypés ou répétitifs (stéréotypies motrices simples, écholalie, etc.), une insistance ou inflexibilité au changement, des patrons de comportements ritualisés (détresse face à des changements mineurs, difficultés avec les transitions, etc.), des intérêts restreints anormaux en intensité ou au sujet d'intérêts particuliers (attachement fort à des objets inhabituels, intérêts excessivement persévérants, etc.) ou enfin une hyper ou hypoactivité face à des stimulations sensorielles ou intérêt inhabituel pour des aspects sensoriels de l'environnement (indifférence apparente à la douleur ou à la température, réponse aversive à des sons ou des goûts spécifiques, fascination visuelle pour des lumières ou des mouvements, etc.)

II.2. Symptômes moteurs

Les troubles moteurs font partie de la physiopathologie des TSA depuis leur première description par Kanner en 1943 qui décrit pour plusieurs des 11 cas reportés une « maladresse dans leur démarche et dans leurs performances motrices globales » (Kanner, 1943). Ces troubles moteurs ne sont cependant pas considérés comme des symptômes cœur des TSA par la classification actuelle du DSM-V et de la CIM-11, mais davantage comme des troubles associés. La part de patients atteints de TSA et souffrant de troubles moteurs est estimée à 88,2% et le risque de développer un ou plusieurs troubles moteurs est multiplié par 22,2 chez les patients par rapport à la population générale. Toutefois, une faible proportion de patients bénéficie effectivement d'un diagnostic de dyspraxie ou troubles associés et sont effectivement traités pour ces déficits moteurs, conduisant à une probable sous-estimation de leur prévalence (Bhat, 2021). Les déficits moteurs retrouvés chez les patients TSA forment un large éventail de troubles, qui persistent tout au long de la vie du patient. Ainsi, parmi les perturbations motrices les plus souvent décrites se trouvent l'incapacité oculomotrice qui se traduit par une incapacité partielle ou totale de suivre des yeux un mouvement, une atteinte plus ou moins sévère de la posture et de la marche qui se traduit par une démarche hétérogène et saccadée ou encore une incapacité à coordonner les mouvements et/ou à gérer la force de la main et des membres en général qui se traduisent par une apparente maladresse (pour revue : (Zampella et al., 2021)). De plus de récentes études ont également montré que la sévérité des troubles moteurs associés aux TSA semble être d'autant plus importante que les symptômes cœur des TSA (troubles du langage, de la communication, de la sociabilité,

comportements stéréotypés, etc.) sont importants (Bhat, 2021; Ketcheson et al., 2021; Licari et al., 2020).

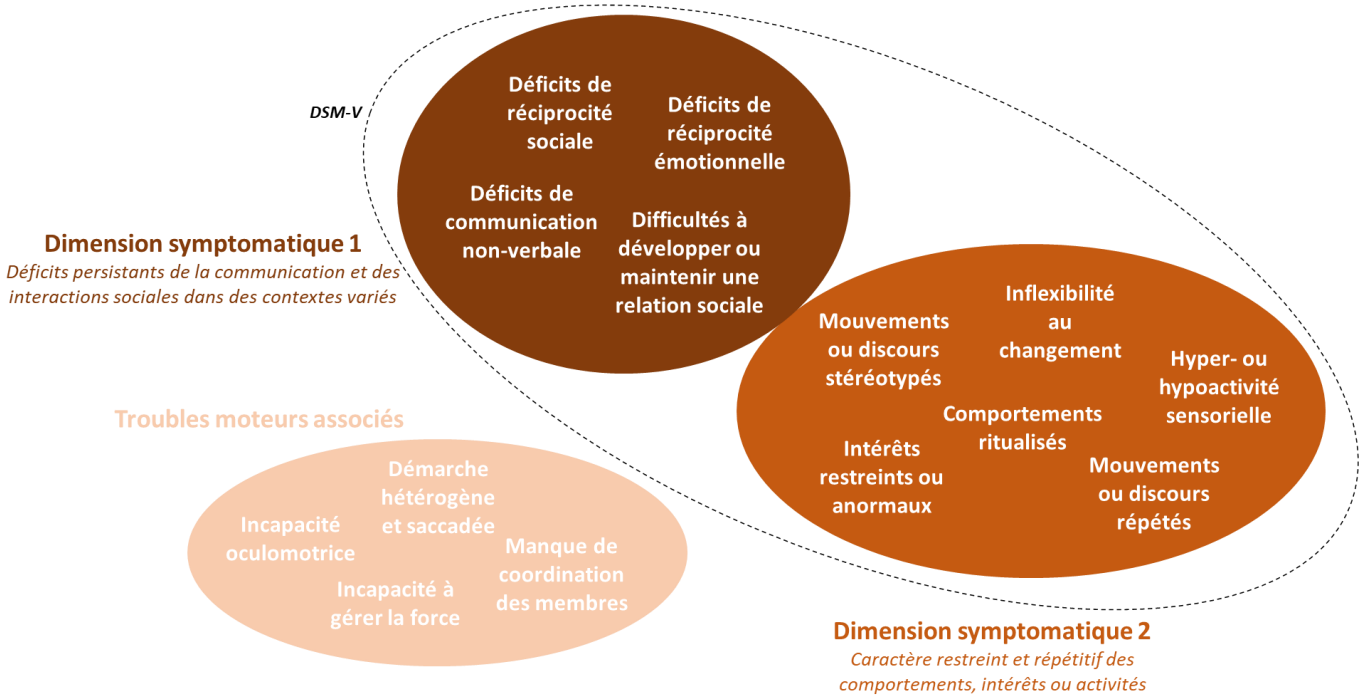


Figure 8 : Symptomatologie des TSA et troubles moteurs associés
Dans le schéma, la ligne en pointillés inclut les symptômes qui entrent dans le périmètre du DSM-V. Les troubles moteurs n'y sont pas inclus car n'entrant pas dans l'une des deux dimensions symptomatiques. D'après : DSM-V et CIM-11

II.3. Comorbidités

En plus des symptômes listés ci-dessus, les patients atteints de TSA présentent fréquemment une ou plusieurs comorbidités, qui peuvent êtres psychiatriques, neurologiques, ou somatiques. Les comorbidités psychiatriques incluent les troubles anxieux, les troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité, différentes phobies (agoraphobie, phobie sociale, etc.), les troubles panique, la dépression, l'agressivité, ou encore les épisodes suicidaires menant au décès du patient ou non (Ivanović, 2021; Simonoff et al., 2008). Les premières études à la fin des années 2000 estiment que 71% des patients

présentent au moins une comorbidité psychiatrique, 41% en présentent au moins 2, et 24% en présentent 3 ou plus (Simonoff et al., 2008).

La principale comorbidité neurologique des TSA est l'épilepsie, qui touche environ 12,1% des patients atteints de TSA (Lukmanji et al., 2019). Cette cooccurrence semble être, au moins partiellement, liée au fait que des gènes codant pour des canaux ioniques, des protéines structurales synaptiques, des facteurs de régulation de la transcription ou encore des protéines impliquées dans la voie mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) sont soit mutés ou dérégulés dans les deux pathologies (Specchio et al., 2022).

II.4. Approches thérapeutiques

Il n'existe à ce jour aucun traitement, pharmacologique ou non, permettant de guérir les TSA. La prise en charge des patients est donc limitée à un traitement symptomatique, dont l'efficacité démontrée est d'autant plus importante que le diagnostic est précoce. Parmi les traitements pharmacologiques, à ce jour seules l'aripiprazol (antipsychotique, agoniste partiel récepteurs dopaminergique D2 et sérotoninergique 5-HT1a) et la rispéridone (antipsychotique, agoniste partiel des récepteurs dopaminergiques D2 et sérotoninergiques 5-HT2) ont montré une efficacité pour le traitement de l'agitation et de l'irritabilité dans des études cliniques double-aveugle contre placebo (Salazar de Pablo et al., 2022; Siafis et al., 2022). Ce sont à ce jour les deux seuls traitements pharmacologiques approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), l'autorité de santé des États-Unis, pour le traitement de l'irritabilité et des troubles de l'humeur chez l'enfant et l'adolescent. En France, aucune spécialité pharmaceutique utilisant ces molécules ne dispose d'une autorisation de mise sur

le marché (AMM) pédiatrique ; elles ne peuvent donc pas être administrées à des enfants. Chez l'adulte, aucune de ces molécules n'est indiquée dans le traitement des TSA.

Les traitements non-pharmacologiques consistent en des interventions thérapeutiques comportementales visant à prévenir le développement de troubles anxieux et/ou dépressif et à limiter certains symptômes comme les troubles de langage et de communication. Parmi ces approches, plusieurs programmes comportementaux comme le programme de traitement et d'éducation des enfants en situation de TSA ou sujets à des troubles de la communication (*Treatment and Education of Autistic and related Communication Handicapped Children*, TEACCH) ou encore l'analyse appliquée du comportement (*Applied Behavior Analysis*, ABA) ont montré leur efficacité dans les domaines de l'apprentissage des compétences de communication, des capacités psychomotrices et des codes sociaux chez des enfants atteints de TSA (Speyer et al., 2021; Zeng et al., 2021).

III. Les modèles animaux de troubles du spectre autistique

III.1. Modéliser les TSA chez l'animal

L'étude d'une pathologie nécessite la modélisation de celle-ci chez l'animal, d'autant plus quand le phénotype caractéristique montre des altérations du comportement. La modélisation chez l'animal de troubles psychiatriques doit respecter les critères de validité de construction, de validité apparente et de validité prédictive, c'est à dire que l'étiologie de la pathologie chez l'animal doit être la même que chez l'Homme, que le modèle doit présenter des symptômes, comportements, altérations fonctionnelles, cellulaires et moléculaires

semblables à ce qui est observé chez l'Homme, et enfin que les prédictions d'efficacité d'un traitement doit être semblable à celle effectuée chez l'Homme (Nestler & Hyman, 2010). Pour les TSA, il existe ainsi des modèles génétiques (ex. : Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (Matas et al., 2021)), environnementaux (ex. : Acide Valproïque (al Sagheer et al., 2018)), immunitaires (ex. : Activation immunitaire maternelle (Haida et al., 2019)) et idiopathiques (ex. : souris BTBR (Meyza & Blanchard, 2017)), dans un large éventail d'espèces animales, du poisson-zèbre aux primates en passant par les rongeurs (al Sagheer et al., 2018; Meshalkina et al., 2018; Tu et al., 2019).

III.2. Modèle murin Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$

Le gène *SH3 and multiple ankyrin repeat domains* (Shank3) est situé sur le chromosome 22q13.3 chez l'Homme et 15E3 chez la souris et code pour la protéine SHANK3. Cette protéine existe sous la forme de plusieurs isoformes, en raison de ses 6 différents promoteurs et des différents épissages possibles (Delling & Boeckers, 2021) et est fortement exprimée au niveau des synapses glutamatergiques de la voie cortico-striatale (Peça et al., 2011). Des mutations de ce gène ont été reportées dans des formes syndromiques (Syndrome Phelan-McDermid) et non-syndromiques de TSA, donnant un intérêt particulier à l'étude de ce gène et de ses dérégulations (pour revue : (Leblond et al., 2014)). Il existe à ce jour 30 modèles animaux caractérisés ciblant le gène Shank3 : 10 modèles murins Knock-Out (KO) ciblant différents exons du gène, 2 modèles de rat KO, 2 modèles de macaque KO, 9 modèles murins de KO conditionnel (cKO), 5 modèles murin Knock-In (KI), 1 modèle murin de KI conditionnel (cKI) et 1 modèle murin de surexpression du gène (Delling & Boeckers, 2021).

Parmi ces modèles, les modèles murins Shank3$^{+/\Delta C}$ et Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ correspondent à la délétion de l'exon 21 du gène chez la souris, respectivement sur l'un ou les deux allèles, entrainant la troncature de la queue C-Terminale de la protéine et empêchant ainsi son adressage à la membrane et donc son activité. Plusieurs études ont montré que les souris Shank3$^{+/\Delta C}$ et Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ présentent des symptômes cœur des TSA, comme une altération de la reconnaissance et de la communication sociale et des stéréotypies (Bidinosti et al., 2016; Duffney et al., 2015; Kouser et al., 2013; Matas et al., 2021). Ces souris font également état de comportements apparentés aux TSA comme de l'inflexibilité, de la peur de la nouveauté, sans pour autant montrer de troubles anxieux (Bidinosti et al., 2016; Kouser et al., 2013). Il a également été montré des altérations de la motricité chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (Matas et al., 2021) et chez la souris Shank3$^{+/\Delta C}$, où ces altérations sont associées à un état d'hypoactivité globale, mais sans perturbations de l'apprentissage moteur chez la souris Shank3$^{+/\Delta C}$ (Bidinosti et al., 2016; Kouser et al., 2013). La caractérisation phénotypique des souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ fait également état d'une hypersensibilité à la douleur, et de d'altération de l'acquisition de la mémoire spatiale, sans altération des sens comme la vue, l'ouïe ou l'odorat (Kouser et al., 2013). Enfin, des perturbations dans les cycles de sommeil ont également été rapportées chez ces souris (Ingiosi et al., 2019).

Au niveau fonctionnel, l'enregistrement électrophysiologique *ex vivo* des neurones pyramidaux de l'hippocampe des souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ montrent une diminution de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (*mini Excitatory Post-Synaptic Currents*, mEPSC), associée à une altération de la plasticité, à la fois à courte terme avec la diminution du ratio NMDA/AMPA et à long terme avec une diminution de la potentialisation à long terme. Ces altérations fonctionnelles ne sont cependant pas corrélées à des modifications morphologiques des neurones de l'hippocampe (Kouser et al., 2013).

Au niveau moléculaire, l'histone désacétylase 2 (HDAC2) est surexprimée dans le cortex préfrontal (CPF) des souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$, résultant en une diminution du niveau d'acétylation de l'histone H3 au niveau de la chromatine (Qin et al., 2018; F. Zhang et al., 2021). De plus, une augmentation des niveaux des histone-lysine-N-méthyltransférases 1 et 2 (EHMT1/2) a également été décrite dans le CPF (Z. J. Wang et al., 2020). Un traitement à la romedepsine qui est un inhibiteur des histones désacétylases ou au UNC0642 qui est un inhibiteur spécifique de EHMT1 et 2 améliore le comportement social de ces souris, sans effet sur les stéréotypies (Qin et al., 2018; Z. J. Wang et al., 2020). Enfin, l'expression du récepteur glutamatergique mGluR5 est réduite dans le cervelet des souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (Matas et al., 2021), alors qu'elle est augmentée dans l'hippocampe (Kouser et al., 2013).

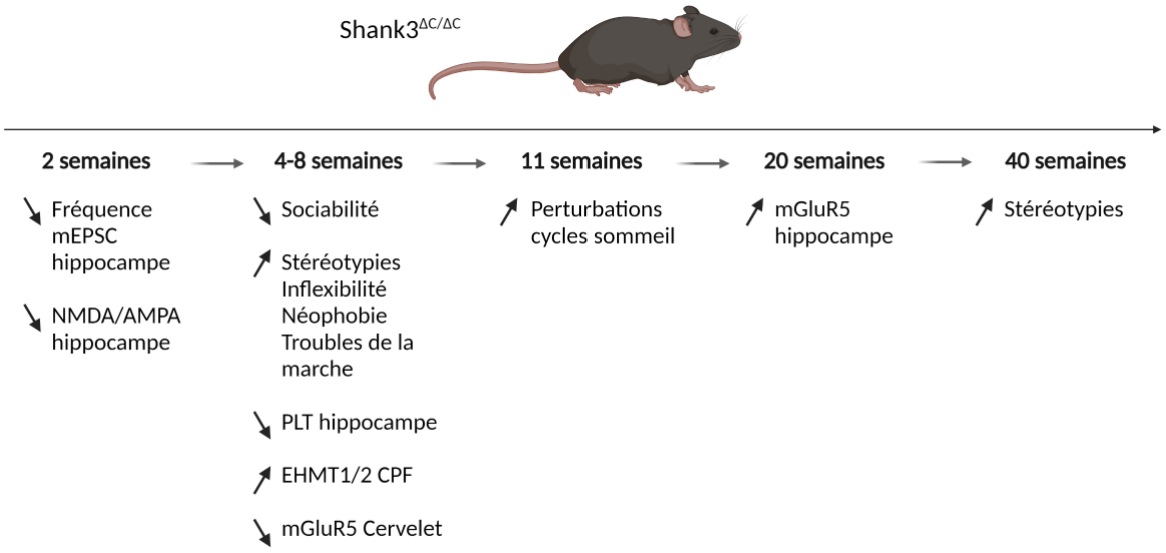


Figure 9 : Schéma bilan des altération phénotypiques chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$
Dans le schéma, les altérations comportementales, fonctionnelles et moléculaires observées chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ sont représentées par des flèches vers le haut ou vers le bas, selon que le paramètre mesuré augmente ou diminue en comparaison avec des souris Shank3 WT. D'après (Duffney et al., 2015; Ingiosi et al., 2019; Kouser et al., 2013; Matas et al., 2021; Qin et al., 2018; Z. J. Wang et al., 2020; F. Zhang et al., 2021)

III.3. Modèle murin Cntnap2$^{-/-}$

Le gène *Contactin Associated Protein 2* (Cntnap2) est situé sur le chromosome 7q35-q36.1 chez l'Homme et 6B2.2-2.3 chez la souris et code pour la protéine *Contactin Associated Protein-like 2* (CASPR2). Cette protéine, de la superfamille des neurexines, est impliquée dans le maintien des synapses et régule le trafic et l'activité des récepteurs AMPA glutamatergiques (Fernandes et al., 2019). La protéine CASPR2 est impliquée dans l'organisation membranaire des canaux potassiques Kir au niveau des nœuds de Ranvier des axones myélinisés au niveau périphérique (Poliak et al., 1999) et central (Scott et al., 2019). En 2006, une équipe américaine identifie pour la première fois une mutation récessive dans le gène Cntnap2, directement liée à une forme syndromique de TSA appelée dysplasie corticale focale épileptiforme (Strauss et al., 2006). Depuis, selon la base de données SFARI, 38 autres mutations du gène ont été identifiées en lien avec des formes syndromiques ou non-syndromiques de TSA.

Le modèle de souris Cntnap2$^{-/-}$ a quant à lui été décrit en 2011 (Peñagarikano et al., 2011). Les souris Cntnap2$^{-/-}$ présentent un phénotype apparenté aux TSA avec la présence des symptômes cœurs comme des déficits sociaux et de communication par vocalisations ultrasoniques (Peñagarikano et al., 2011; Selimbeyoglu et al., 2017; Xing et al., 2019). Il a également été montré que les souris Cntnap2$^{-/-}$ présentent des stéréotypies motrices qui apparaissent entre 4 et 6 semaines (Scott et al., 2019) et un comportement inflexible qui peuvent être améliorés par un traitement à la rispéridone (antipsychotique, agoniste partiel des récepteurs dopaminergiques D2 et sérotoninergiques 5-HT2). Ces souris présentent également des crises d'épilepsie, l'une des comorbidités principales des TSA (Peñagarikano et

al., 2011). De plus, la caractérisation phénotypique de ces souris montre une hypersensibilité à la douleur qui peut être diminuée par un traitement au resvératrol (Z. Zhang et al., 2021). Enfin, il a été montré qu'un dérèglement des cycles de sommeil chez la souris Cntnap2$^{-/-}$ provoque une aggravation des stéréotypies et des déficits de sociabilité alors que les souris Cntnap2$^{+/+}$ ne sont pas impactées. Ces aggravations phénotypiques disparaissent avec un traitement à la mélatonine (H. bin Wang et al., 2020).

Au niveau fonctionnel, l'enregistrement électrophysiologique des neurones pyramidaux de l'hippocampe des souris Cntnap2$^{-/-}$ montre une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (*spontaneous Inhibitory Post-Synaptic Currents* sIPSC) dans la région CA1, ainsi qu'une altération des oscillations gamma (Paterno et al., 2021). Au niveau cortical, l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs spontanés (sEPSC) est quant à elle augmentée au niveau des neurones pyramidaux des couches II/III du cortex somatosensoriel (Scott et al., 2019). L'enregistrement de ces neurones montre également une diminution de leur activité synchronisée (Peñagarikano et al., 2011). De plus, l'activation optogénétique des IN PV du cortex préfrontal permet la restauration des déficits sociaux (Selimbeyoglu et al., 2017). Enfin, au niveau cérébelleux, l'excitabilité des cellules de Purkinje est augmentée, conduisant à une altération du patron de décharge *in vivo* et les potentiels de champs des lobules crus I et II sont altérés (Fernández et al., 2021).

Au niveau moléculaire, l'absence de Cntnap2 conduit à une augmentation de l'activité de la voie phospoinositide-3-kinase – protéine kinase B (PI3K-Akt) dans l'hippocampe et une inhibition de cette voie par un inhibiteur d'Akt (LY294002) restaure les déficits sociaux chez les souris Cntnap2$^{-/-}$ de manière réversible en 7 jours, sans effet sur les stéréotypies (Xing et

al., 2019). Enfin, l'expression de la parvalbumine semble être impactée chez les souris Cntnap2$^{-/-}$: dans le striatum, une baisse d'expression de la PV a été mise en évidence, sans toutefois conduire à une mort des IN PV (Lauber et al., 2018). Dans le cortex en revanche, les études sur l'expression de la PV ne font pas pour l'heure consensus : le nombre de neurones exprimant la PV (PV^{+}) semble diminué dans le cortex (Peñagarikano et al., 2011) quand d'autres études montrent qu'il n'y a pas de diminution du nombre de cellules PV^{+} (Lauber et al., 2018).

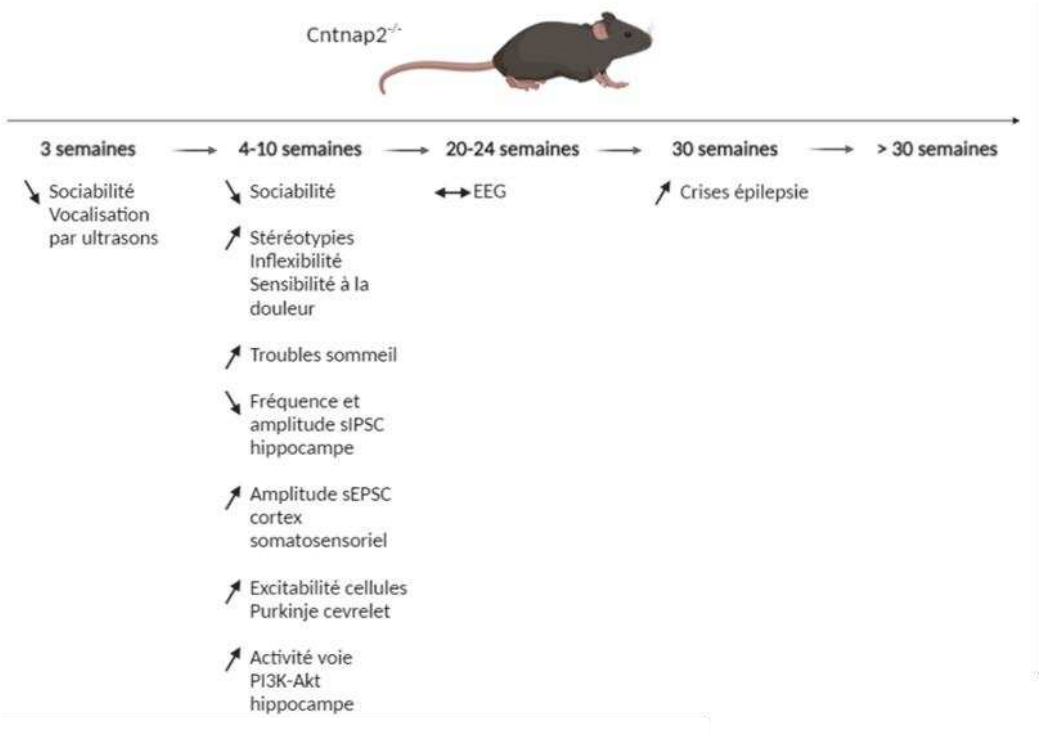


Figure 10 : Schéma bilan des altération phénotypiques chez la souris Cntnap2$^{-/-}$
Dans le schéma, les altérations comportementales, fonctionnelles et moléculaires observées chez la souris Shank3$^{-/-}$ sont représentées par des flèches vers le haut ou vers le bas, selon que le paramètre mesuré augmente ou diminue en comparaison avec des souris Cntnap2 WT. L'absence de texte dans la tranche > 30 semaines indique qu'aucune donnée n'est présente dans la littérature pour cette tranche d'âge. D'après (Fernández et al., 2021; Lauber et al., 2018; Paterno et al., 2021; Peñagarikano et al., 2011; Scott et al., 2019; H. bin Wang et al., 2020; Xing et al., 2019; Z. Zhang et al., 2021)

IV. Striatum et TSA – *Tiré à part*

L'étude bibliographique de l'implication du striatum dans la physiopathologie des TSA chez l'Homme et dans différents modèles animaux a fait l'objet de la publication d'une revue en janvier 2022, située en annexe 1.

À la fin du XXe siècle, les progrès des techniques d'imagerie ont permis d'étudier les modifications anatomiques de différentes structures cérébrales chez les patients atteints de TSA, et apportent les premières preuves de l'implication du striatum dans leur physiopathologie (Aylward et al., 1991; Creasey et al., 1986; Reiss et al., 1993). Dans les années 2000 et 2010, différentes études d'imagerie par résonnance magnétique ont mis en évidence une hypertrophie du putamen, du noyau caudé et du noyau accumbens (Hollander et al., 2005; Langen et al., 2014; Rojas et al., 2006). Ces changements anatomiques du striatum sont d'ailleurs retrouvés dans plusieurs modèles animaux, comme la souris Ngln3 KI, la souris Shank3$^{-/-}$ ou encore la souris Cntnap2$^{-/-}$ (pour revue : (Ellegood & Crawley, 2015)).

Ces changements anatomiques chez l'Homme et dans différents modèles animaux s'accompagnent de modifications cellulaires. Tout d'abord, chez l'Homme, une diminution de la densité de neurones de 15% dans le noyau accumbens et de 13% dans le putamen a été décrite, malgré l'hypertrophie de ces noyaux striataux (Wegiel et al., 2014). Dans les différents modèles animaux, bien qu'aucune modification de la densité globale des neurones striataux n'ait été décrite, plusieurs populations neuronales semblent affectées. Ainsi, chez la souris Shank3B$^{-/-}$, les MSN présentent une plus grande complexité de leur arborisation dendritique, une plus grande taille (longueur et surface) ainsi qu'une diminution de la densité de leurs épines dendritiques (Peça et al., 2011). Les IN PV sont aussi affectés dans différents modèles

animaux de TSA. En effet, l'expression de la parvalbumine, marqueur spécifique de ces neurones, est diminuée dans le striatum des souris Shank1$^{-/-}$, Shank3B$^{-/-}$, Cntnap2$^{-/-}$ et dans le modèle murin d'exposition in utero à l'acide valproïque (VPA) (Filice et al., 2016; Lauber et al., 2016, 2018).

Au sein du striatum, les transmissions excitatrices, inhibitrices et modulatrices forment un équilibre, dont la perturbation est l'une des hypothèses majeures de la physiopathologie des TSA (Rubenstein & Merzenich, 2003). Des altérations de ces différentes transmissions ont été décrites dans différents modèles. Ainsi, chez la souris Shank3B$^{-/-}$, la fréquence et l'amplitude des mEPSC est diminuée, suggérant que les dysfonctions dans la transmission excitatrice proviennent à la fois du compartiment pré- et post-synaptique (Peça et al., 2011). Chez la souris Ngln1$^{-/-}$, le ratio de la réponse NMDA/AMPA est diminué dans le DLS, et est restauré par l'application de D-Cyclosérine, un coactivateur des récepteurs NMDA, suggérant des altérations au niveau moléculaires de la transmission glutamatergique (Blundell et al., 2010). La transmission GABAergique au niveau du striatum semble elle aussi affectée dans différents modèles de TSA, mais a toutefois été sensiblement moins étudiée. Ainsi, la description la plus complète de troubles GABAergiques dans un modèle de TSA concerne la souris Fmr1-/-, chez qui la fréquence des mIPSC et sIPSC est augmentée, suggérant des altérations du côté pré-synaptique (Centonze et al., 2008).

CHAPITRE 3 : Le vieillissement

I. Le vieillissement : définition & chiffres clés

En 2017, en préambule de son plan mondial d'actions sur le vieillissement et la santé, l'OMS définit le vieillissement comme étant le produit de modifications de la structure et des fonctions de l'organisme au fil du temps. Ces modifications sont déterminées par la combinaison des aptitudes fonctionnelles physiques et mentales et des environnements dans lesquels les personnes évoluent (matériel, social, économique, politique, etc.). Ces aptitudes fonctionnelles comprennent la capacité de satisfaire ses besoins de base, la capacité d'apprendre et de prendre des décisions, la capacité de se déplacer, la capacité d'entamer et de poursuivre des relations avec autrui et la capacité d'apporter sa contribution au milieu familial, communautaire ou social. Bien que l'OMS ne définisse pas clairement l'âge à partir duquel une personne est dite âgée, la limite d'âge à 60 ans est communément utilisée pour étudier le vieillissement de la population mondiale. Ainsi, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus était de 1 milliard en 2020 et est estimé à 2,1 milliards à l'horizon 2050. En France, les autorités de santé estiment quant à elles que les personnes de plus de 60 ans pourraient représenter 1/3 de la population d'ici 2040. L'Institut National de la Statistique et des Études Économiques (INSEE) estime que l'espérance de vie en France est de 85,4 ans pour les femmes et 79,3 ans pour les hommes.

II. Vieillissement cérébral

II.1. Déclin cognitif et modifications anatomiques

Chez l'Homme, comme pour l'ensemble du reste de l'organisme, les aptitudes cérébrales déclinent avec le vieillissement, tant au niveau de la mémoire, de l'attention ou encore des fonctions exécutives (pour revue : (Alexander et al., 2012; Zec, 1995)). À ces déclins fonctionnels sont associées des modifications anatomiques, dont la principale est une diminution du volume cérébral avec l'âge. Ainsi, le volume du cerveau chez la personne âgée (73 ans en moyenne) est diminué de près de 37% par rapport à un individu jeune (29 ans en moyenne). De plus, cette atrophie cérébrale globale correspond à une diminution des volumes de substance blanche et grise, accompagnée d'une augmentation du volume de liquide céphalo-rachidien (LCR) (Kirov et al., 2021). Le cortex subit une diminution de son épaisseur globale avec l'âge, avec cependant une plus forte atrophie mesurée dans le lobe frontal (Raz et al., 1997; Salat et al., 2004). De manière intéressante, l'atrophie corticale mesurée avec le vieillissement est directement liée à des altérations des fonctions assurées par ces zones : par exemple, la diminution de l'épaisseur du cortex auditif avec le vieillissement est corrélée avec une perte d'audition (Eckert et al., 2012) et celle du cortex frontal est corrélée avec une augmentation des niveaux de stress (Stomby et al., 2016).

Au niveau des structures sous-corticales, la plus étudiées dans le contexte de vieillissement est l'hippocampe et l'atrophie de ce dernier avec l'âge chez l'Homme fait désormais consensus (MacDonald & Pike, 2021). De manière intéressante, il a été montré que la diminution du volume de l'hippocampe se produit dès l'âge adulte et s'accélère après 50

ans (Fjell et al., 2013). De plus, cette accélération de l'atrophie de l'hippocampe après un certain âge semble indépendante des autres facteurs de risque comme l'hypersignal de substance blanche (marqueur de maladies démyélinisantes), l'hypertension artérielle, ou encore le génotype de l'apolipoprotéine E (APOE) (Du et al., 2006). Diverses études montrent également une atteinte anatomique du striatum chez l'Homme. Ainsi, une étude d'imagerie sur 226 patients de 19 à 85 ans a montré que le volume du noyau caudé et du putamen est significativement inférieur chez les individus âgés, respectivement de 20% et 5% (Goodro et al., 2012). De plus, cette atrophie des noyaux dorsolatéraux du striatum est corrélée à des dysfonctionnements moteurs observés chez les individus âgés (Dumurgier et al., 2012).

Chez les rongeurs, le vieillissement s'accompagne également d'un déclin des aptitudes cognitives. Ainsi, chez la souris C57BL/6 âgée de 19 mois, les performances au test de la Piscine de Morris montrent une diminution de l'apprentissage spatial s'accompagnant d'une neurogénèse diminuée, en comparaison à des souris de 3 mois (van Praag et al., 2005). À 22 mois, ces souris subissent également une diminution de leurs performances au test de discrimination spatial à deux items (Creer et al., 2010). Chez le rat Fischer 344 de 24 mois, et le rat Sprague-Dawley de 24 à 33 mois, les résultats au test de conditionnement par la peur mettent en évidence une altération de la mémoire à court terme ou à long terme, dépendamment du paradigme expérimental (Moyer & Brown, 2006; Oler & Markus, 1998; Stoehr & Wenk, 1995). De manière intéressante, comme chez l'Homme, le déclin cognitif chez les rongeurs s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur du cortex (Calì et al., 2018; Taylor et al., 2020), ainsi que d'une hypertrophie des ventricules associée à une diminution du volume de matière grise dans le striatum (Giacobbo et al., 2022).

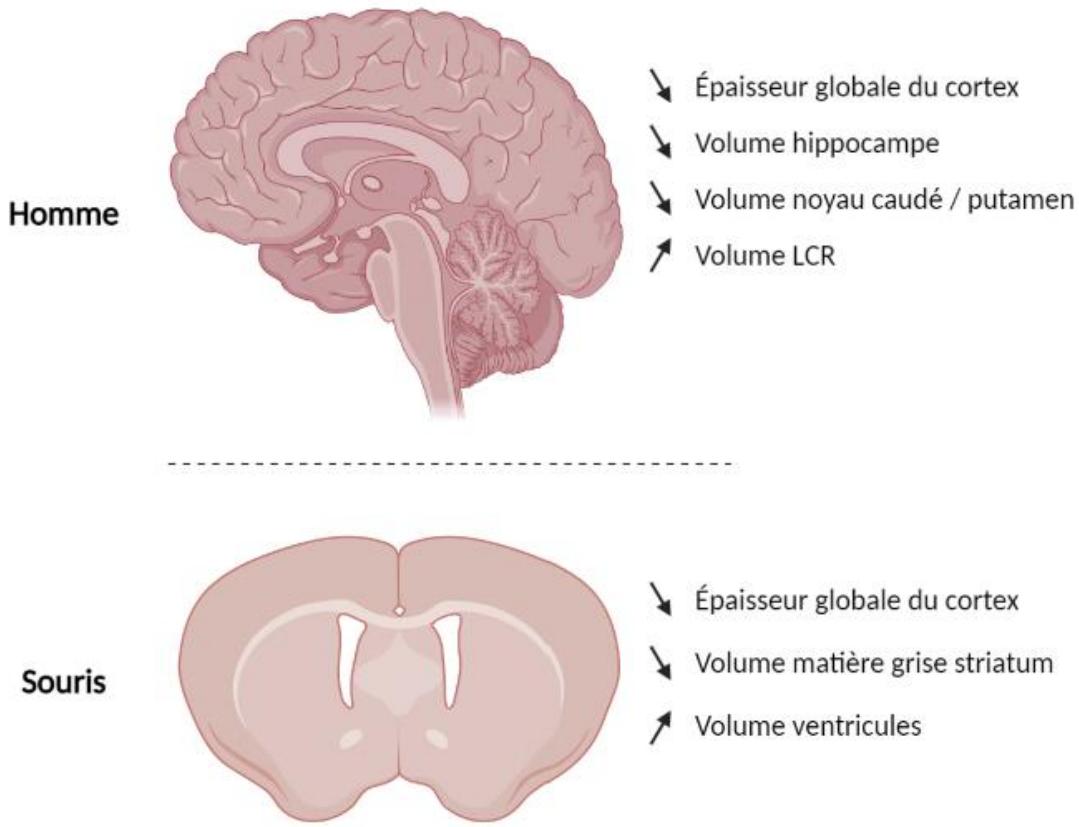


Figure 11 : Modifications anatomiques liées au vieillissement
Le schéma résume les principales modifications anatomiques cérébrales liées au vieillissement chez l'Homme et chez le rongeur. Ces modifications sont résumées par des flèches vers le haut ou vers le bas selon que le paramètre mesuré augmente ou diminue, en comparaison avec des individus jeunes. D'après (Alexander et al., 2012; Calì et al., 2018; Dumurgier et al., 2012; Fjell et al., 2013; Giacobbo et al., 2022; Kirov et al., 2021; Salat et al., 2004; Taylor et al., 2020)

II.2. <u>Modifications cellulaires</u>

Le déclin cognitif et les modifications anatomiques décrites chez l'Homme et le rongeur s'accompagnent de modifications cellulaires, qui sont davantage étudiées chez ce dernier. Chez l'Homme, il est clairement établi que le vieillissement se traduit au niveau des neurones par une rétractation de l'arborisation dendritique et donc une diminution de sa densité, accompagnée par une diminution du nombre d'épines dendritiques, comme par

exemple au niveau des neurones pyramidaux du cortex préfrontal et temporal (Nakamura et al., 1985; Scheibel et al., 1975) ou encore du cortex moteur (Jacobs et al., 2001).

Chez le rongeur, les neurones pyramidaux du cortex sont également impactés par le vieillissement. Ainsi, chez le rat par exemple, les neurones pyramidaux de la couche 3 du cortex somatosensoriel primaire présentent une arborisation dendritique plus courte et moins dense en position proximale et distale chez les individus âgés (27-32 mois) que chez les individus jeunes adultes (4-7 mois) (Hickmott & Dinse, 2013). De plus, la même étude montre que ces neurones ont une plus faible densité d'épines dendritiques en position proximale et distale chez les individus âgés par rapport aux jeunes adultes. Au niveau du striatum, des études de coloration de Golgi ont été réalisées entre la fin des années 1980 et le début des années 1990 pour déterminer de façon précise l'évolution de l'arborisation des neurones avec l'âge. Ainsi, chez la souris C57BL/6N, l'arborisation dendritique des MSN du DLS est totalement développée vers l'âge de 1 mois et ne montre pas de variation significative de sa longueur totale ou de sa complexité jusqu'à l'âge de 30 mois. Les auteurs ont cependant montré que les dendrites d'ordre 5 sont significativement plus longues à 3 et 10 mois (respectivement 61,7 ± 3,5 µm et 45,4 ± 7,2 µm) par rapport aux mesures à 1 mois (13,7 ± 2,2 µm) (McNeill et al., 1990). Les interneurones semblent également être impactés au niveau de leur morphologie avec le vieillissement. Ainsi, chez la souris C57BL/6N, les IN PV montrent une augmentation significative de la longueur totale de leur arborisation dendritique entre 3 et 20 mois (respectivement 300µm et 1400µm, soit +366%), avant de diminuer d'environ 15% de leur longueur entre 20 et 30 semaines. Les IN ACh quant à eux ont une longueur totale de leur arborisation dendritique qui augmente entre 3 et 10 semaines (respectivement 700µm et

1200µm, soit +71%), puis reste relativement stable entre 10 et 20 semaines (-8.3%) avant de diminuer entre 20 et 30 semaines (-18.2%) (Rafols et al., 1989).

II.3. Modifications moléculaires et neurotransmission

Les modifications moléculaires liées au vieillissement sont nombreuses et se produisent à tous les niveaux de la cellule, depuis l'ADN contenu dans le noyau jusqu'aux protéines exprimées à la membrane et même aux molécules sécrétées, en passant par les différents organites (pour revue : (López-Otín et al., 2013)). Parmi les atteintes moléculaires liées à l'âge, le déséquilibre de la neurotransmission GABAergique occupe une place prépondérante (pour revue : (McQuail et al., 2015; Rozycka & Liguz-Lecznar, 2017)). Chez l'Homme, une concentration importante de GABA au niveau du cortex frontal corrèle avec des aptitudes cognitives supérieures, et la concentration de GABA dans cette structure diminue avec le vieillissement (Porges et al., 2017). Chez le rongeur, l'expression des récepteurs GABA-A est stable avec l'âge et ne peut donc pas contribuer aux perturbations de la transmission GABAergique observée dans différentes structures (Palpagama et al., 2019). En effet, chez le rat par exemple, l'enregistrement électrophysiologique des neurones GABAergiques du corps géniculé médial du thalamus montrent une dépolarisation significative du potentiel de repos, associée à une fréquence de décharge plus élevée chez les individus âgés (28-32 mois) comparé aux individus jeunes (3-8 mois) (Richardson et al., 2013). Chez la souris C57BL/6, la mesure des sIPSC au niveau des neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex montre une plus faible fréquence chez les animaux âgés (18-29 mois) comparés aux animaux jeunes (2-6 mois), mais sans différence dans l'amplitude des sIPSC (Popescu et al., 2021). Dans

l'hippocampe, l'enregistrement d'une sous-population d'interneurones GABAergiques (exprimant le peptide intestinal vasoactif, *Vasoactive Intestinal Polypeptide,* VIP) montre que la cinétique de leurs potentiels d'action est augmentée en parallèle d'une diminution de leur fréquence chez les animaux âgés (13-23 mois) par rapport aux animaux jeunes (3-5 mois) (Francavilla et al., 2020).

III. Troubles du spectre autistique et vieillissement

Bien qu'apparaissant avec le développement, les symptômes caractéristiques des TSA sont maintenus avec l'âge des patients. Ainsi, les déficits des interactions sociales et de communication sont retrouvées chez les patients adultes et âgés atteints de TSA (Happé & Charlton, 2011). De plus, les TSA ne représentent pas des pathologies dites létales, dans le sens où les TSA ne sont pas la cause *stricto sensu* du décès des patients. Cependant, le lien entre TSA et mortalité prématurée est aujourd'hui établie. Ainsi, l'espérance de vie des patients atteints de TSA est réduite de près de 17 ans par rapport à la population générale (Hirvikoski et al., 2016). Ce risque accru de mortalité prématurée chez les patients peut, au moins partiellement, s'expliquer par une aggravation des comorbidités. En effet, il a été montré que les maladies neurologiques comme l'épilepsie sont 7,49 fois plus impliquées dans le décès des patients atteints de TSA que dans les décès des individus contrôle. De la même façon, les troubles psychiatriques et les suicides sont respectivement 2,8 fois et 7,55 fois plus impliquées dans le décès des patients que ceux des individus contrôle (Hirvikoski et al., 2016; Jokiranta-Olkoniemi et al., 2021). En plus des comorbidités communément observées, il a été

montré que les patients atteints de TSA ont plus de 25% de risque supplémentaire de développer la maladie de Parkinson avec le vieillissement (Starkstein et al., 2015).

Chez la souris, bien que diverses études portant sur la physiopathologie des TSA incluent des animaux pouvant atteindre 20 à 30 semaines, comme les études d'EEG chez la souris Cntnap2$^{-/-}$ (Peñagarikano et al., 2011) ou encore des études comportementales chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (Kouser et al., 2013), la plupart explore l'aspect neurodéveloppemental des TSA. Ainsi, la majorité des études porte sur des souris juvéniles, notamment pour les vocalisations ultra-sonores ou des souris jeunes adultes, âgés pour la plupart entre 6 et 12 semaines. La littérature actuelle ne permet toutefois pas de mettre en évidence une évolution des symptômes et ses corrélats cellulaires ou moléculaires chez la souris modèle de TSA.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les TSA sont un ensemble de troubles psychiatriques neurodéveloppementaux dont les premières manifestations cliniques apparaissent dès l'enfance. Depuis leur première description par Léo Kanner en 1943, de nombreuses hypothèses quant à leur physiopathologie ont été formulées. En 2003, John Rubenstein et Michael Merzenich proposent que les dysfonctions observées au sein d'une structure cérébrale donnée seraient dues à un déséquilibre entre les informations excitatrices et inhibitrices reçues, qui deviendra rapidement l'une des hypothèse majeures de la physiopathologie des TSA. De plus, entre la fin des années 1990 et le milieu des années 2000, les études d'imagerie chez des patients ont établi les premiers liens entre TSA et atteintes striatales. Ces dernières ont été extensivement étudiées sur la base de l'hypothèse du déséquilibre excitation / inhibition, principalement pour son versant excitateur. Ces études ont permis d'identifier des atteintes de la transmission glutamatergique dans le striatum, notamment dans sa partie dorsolatérale. Le principe homéostatique reposant sur la compensation des déséquilibres biologiques, nous proposons que la transmission GABAergique du DLS est également affectée dans un contexte autistique.

Malgré une réduction de leur espérance de vie de 17 ans en moyenne, les patients atteints de TSA atteignent communément l'âge adulte. Bien que leur gravité varie en fonction du suivi thérapeutique des patient, les symptômes des TSA sont alors retrouvés à l'âge adulte. À ce jour, la majorité des études cliniques se focalise pourtant sur l'aspect développemental de cette pathologie ou inclut des patients adultes sans toutefois étudier l'évolution de la condition autistique au cours du vieillissement. De plus, bien que de récentes études se soient intéressées à la physiopathologie des TSA chez des animaux adultes, celles portant sur des modèles animaux n'apportent que peu ou pas d'information sur l'évolution des symptômes et des différents mécanismes pathologiques avec l'âge. De la même façon que le vieillissement

en bonne santé est associé à des modifications de plusieurs mécanismes cognitifs, moteurs, fonctionnels, cellulaires et moléculaires, nous proposons que le vieillissement pathologique dans un contexte de TSA repose sur des mécanismes différents entre l'âge adolescent / jeune adulte et l'âge adulte avancé.

Ces travaux de thèse s'inscrivent ainsi dans un projet qui vise d'une part à caractériser les effets du vieillissement sur l'évolution des stéréotypies motrices qui sont le principal symptôme de TSA relié au DLS, de la transmission GABAergique au sein de cette structure, ainsi que de la morphologie des MSN, principale population neuronale du DLS, dans deux modèles murins génétiques de TSA : la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et la souris Cntnap2$^{-/-}$. D'autre part, ces travaux de thèse visent à identifier des mécanismes pathologiques communs et spécifiques aux deux modèles utilisés, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes pathologiques qui sous-tendent les symptômes des TSA, et permettre ainsi d'identifier des cibles thérapeutiques communes à différentes formes de TSA. Enfin, ces travaux de thèse visent à identifier les altérations d'une sous-population d'interneurones du DLS exprimant la parvalbumine, d'en évaluer la contribution aux altérations comportementales et fonctionnelles observées et à déterminer si une modulation de leur activité permet de restaurer le phénotype des souris Cntnap2 KO.

PROJET n°1

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

Ce premier projet a fait l'objet d'un article soumis dans la revue *Autism Research*, en révision au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Les TSA sont un ensemble de troubles développementaux dont les premières manifestations apparaissent durant l'enfance et qui se maintiennent voire s'aggravent avec l'âge chez certains patients. La plupart des études sur des modèles animaux se focalisent cependant sur l'aspect développemental de cette pathologie. Dans ce projet, nous avons évalué l'évolution des stéréotypies motrices au cours du vieillissement ainsi que les mécanismes fonctionnels et cellulaires striataux qui les sous-tendent chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$, à 10 semaines (10w), 20 semaines (20w) et 40 semaines (40w).

Nos résultats montrent une aggravation des stéréotypies motrices à 40w, possiblement en conséquence d'altérations fonctionnelles et morphologiques des MSN du DLS qui apparaissent à 20w. Nous proposons ainsi que l'âge de 20w pourrait correspondre à une période critique dans l'évolution de la physiopathologie. De plus, nous proposons également que les dysfonctions observées au niveau des MSN ne seraient pas la conséquence directe des désordres développementaux, mais plutôt la conséquence d'autres altérations au sein du DLS qui interviendraient de manière plus précoce.

Title

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

Short running title

Motor and striatal disorders in old autistic mice

Authors

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

Author affiliations

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

2. Université de Poitiers, PREBIOS, Poitiers, France

3. Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France

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

*** Corresponding author:**

Laurie Galvan

Mail: laurie.galvan@univ-poitiers.fr

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

For Peer Review

Acknowledgments

We thank all the Prebios Animal Facility staff for their help in animal care and the maintenance of the mouse lineage. We also thank Shana Sauzeau and Élisa Audouard for their implication in this project and their help in morphological analysis. We thank our financial supports: the Fondamental Foundation and the CPER-FEDER program of the Région Nouvelle Aquitaine.

Abstract

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

Lay Summary

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

Keywords

ASD, Shank3ΔC/ΔC, Aging, Striatum, MSN

For Peer Review

Main text

Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) represent chronic neurodevelopmental disorders characterized by the DSM-V by persistent deficits in communication and social interactions, and restricted repetitive behaviors, interests, or activities (American Psychiatric Association, 2013). The etiology of ASD seems to be multifactorial with genetic, epigenetic, and environmental components (Courchesne et al., 2020) Even though ASD have clearly a neurodevelopmental onset, these are lifelong conditions and are carried during adulthood and elderhood (Happé & Charlton, 2011). Life expectancy of ASD patients is reduced by nearly 17 years compared to the general population, partially due to their worsening comorbidities regardless of gender and level of functioning (Hirvikoski et al., 2016). Furthermore, aging ASD patients develop more neurological diseases and psychiatric disorders than neurotypical individuals (Hirvikoski et al., 2016; Jokiranta-Olkoniemi et al., 2021). In mice, most studies focus on neurodevelopmental states or juvenile periods (6 and 12 weeks), and only a few explored the ASD pathophysiology in mature adults (20 to 30 weeks) (Kouser et al., 2013; Peñagarikano et al., 2011) and none in aging animals leaving a gap in knowledge.

The basal ganglia subserve motor and cognitive function that are heavily affected in ASD making it an interesting target in this pathology. The striatum is involved in motor, associative and cognitive processes through the basal ganglia network (for review: (Subramanian et al., 2017)). Two imaging studies have revealed similar findings indicating that the putamen and caudate nucleus volumes are increased in ASD patients compared to age-matched control subjects (Hollander et al., 2005; Wiegel et al., 2014), with one of them reporting that the right caudate volume correlates with the magnitude of repetitive and stereotyped behaviors (Hollander et al., 2005). These neuroanatomical alterations are also recapitulated in some animal models of ASD with a larger striatum described in Neuroligin3 Knock-In mice (15 weeks) and in Cntnap2 Knock-Out (8–9 weeks) and Shank3 Knock-Out mice (22–23 weeks) (for review: (Ellegood & Crawley, 2015)). However, ASD striatal data in young and aged animal models are sparse at best.

Shank3 is a gene coding for a synaptic scaffolding protein and several mutations have been linked to ASD cases, making it a high confidence susceptibility ASD gene (SFARI database, https://www.sfari.org/resource/sfari-gene/). The Shank3ΔC/ΔC mouse model

For Peer Review

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

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

Methods

Animals

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

For Peer Review

reverse 5' GTC TGC CAC CTT CTG CCT AC 3'. All littermates were hosted with an appropriate dark/light cycle, 12 hours of each and had access to food and water *ad libitum*. Mice from the three genotypes were segregated in three groups: young adult (10 weeks), mature adult (20 weeks) and aged adult (40 weeks).

Behavioral analysis

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

Brain slice electrophysiology

Mice were deeply anesthetized with diluted pentobarbital (120mg/kg, Vetoquinol, Lure, France) and perfused transcardially with a high sucrose slicing solution containing (in mM): 208 sucrose, 10 glucose, 1.25 NaH2PO4*H20 monobasic, 26 NaHCO3, 2.5 KCl, 1.3 MgCl2 and 8 MgSO4 (pH 7.2-7.35, osmolality 290-310 mOsm/L). Mice were then decapitated, and brains were taken out of the skull and immediately placed in oxygenated (95%/5% O2/CO2) high sucrose slicing solution. Coronal slices (300µm) were cut using a vibratome (Leica VT1200S, Leica camera AG, Wetzlar, Germany) and transferred into an incubating chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 130 NaCl, 10 glucose, 1.25 NaH2PO4*H2O monobasic, 26 NaHCO3, 3 KCl, 2 MgCl2 and 2 CaCl2, oxygenated with 95%/5% O2/CO2 (pH 7.2-7.35, osmolality 290-310 mOsm/L). Slices were let to recover in ASCF for 1h at room temperature before recordings.

MSN were identified using an upright microscope (Eclipse FN1, Nikon, Tokyo, Japan) at 40x magnification (40x Apochromat, Nikon, Tokyo, Japan) with infrared filter and monochromatic camera with Q-CapturePro® software (QImaging™, Surrey, Canada). Whole-cell patch clamp recordings were performed at room temperature and were obtained using a MultiClamp 700B Amplifier, the Digidata 1440A digitizer and the Clampex acquisition

For Peer Review

software (pCLAMP, Axon Instruments Inc. Molecular Devices, San José, CA). A maximum of 2 neurons per mouse per group were recorded.

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

Drugs

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

Neuronal morphology analysis

All patched slices were incubated in 4% paraformaldehyde (PFA) solution overnight for tissue fixation and transferred in a cryoprotective 20% sucrose solution, prior to use for fluorescence detection of recorded cells. All steps were performed at room temperature,

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

Statistical analysis

Data in boxplots are expressed as median & min-max and '+' stands for the mean. All other data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistics were performed with Prism® (v9.0.0, GraphPad™ Software Inc., La Jolla, CA) and graphs were made with Prism®. Appropriate statistical tests are mentioned under each figure and results were considered as significantly different for $p<0.05$. All figures were made with Corel Draw X7® (v17.2.0.688, Corel™ Corporation, Ottawa, Canada).

Results

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

To determine how motor stereotypies evolve with aging, we quantified grooming behavior in both WT and Shank3 KO mice at 10w, 20w and 40w. As we did not find differences between males and females in each group, data from both genders were pooled. The 10w KO mice displayed excessive grooming behavior ($F_{(2,59)} = 10.72$, p=0.0001, Tukey WT_{10w} vs KO_{10w} p=0.0495, Fig 1A) compared to WT littermate. This phenotype was maintained at 20w (WT_{20w} vs KO_{20w} p=0.0224) and worsened at 40w. Indeed, the 40w KO mice drastically displayed more grooming episodes with aging (KO_{10w} vs KO_{40w} p=0.0001, KO_{20w} vs KO_{40w} p<0.0001). Also, the cumulative grooming duration increased at this stage

($F_{(2,59)}$ = 5.386, p=0.0071, Tukey KO_{10w} vs KO_{40w} p=0.0035, KO_{20w} vs KO_{40w} p=0.0005). Rearing behavior, reflecting exploratory behavior, was also assessed during this test. As early as 10weeks, the KO mice displayed excessive rearing behavior ($F_{(2,59)}$ = 12.51, p<0.0001, Tukey WT_{10w} vs KO_{10w} p=0.0003) compared to WT mice, suggesting that they experienced stress-induced hyperactivity. The rearing behavior was then no longer excessive at 20w, while the grooming behavior was still excessive. Interestingly, the 40w KO mice undergo behavioral changes as they spent significantly more time grooming than rearing ($F_{(1,118)}$ = 45.04, p<0.0001, Sidak Grooming *vs* Rearing KO_{40w} p<0.0001).

The 20 weeks old Shank3 KO MSN displayed neurotransmission changes

As motor stereotypies and more generally motor behavior are linked with the dorsolateral striatum (DLS), we aimed at recording DLS MSN *ex vivo* to assess whether behavioral modifications with aging were linked to MSN dysfunctions. We first measured MSN intrinsic passive membrane properties (Table 2). Although neither membrane capacitance nor membrane resistance exhibited a difference with aging in both groups, the time constant was decreased in an age-related manner in both groups ($F_{(2,40)}$ = 8.230, p=0.0010). However, changes occurred at different stages: in WT mice, the time constant decreased with aging between 10w and 40w (-34.78%, p=0.0213), while in KO mice, it decreased between 20w and 40w (-31.82%, p=0.0069) suggesting a difference in the aging process. No modifications in resting membrane potential nor in action potential (AP) parameters (number of AP, amplitude, rheobase, kinetics, threshold, and hyperpolarization duration and amplitude) were observed among groups.

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

Interestingly, that difference was not observed by 40w, suggesting that 20w could be a critical time for striatal dysfunction implementation in this ASD model.

Shank3 KO MSN morphology is altered in aged animals

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

As MSN receive the main part of their inputs onto dendritic spines, we next examined the dendritic spine density on third, fourth and fifth level dendrites (Figure 4A), highlighting effects of age for each of them (Level 3 $F_{(2,193)}$ = 14.86, p<0.0001, Tukey WT_{10w} vs WT_{20w} p=0.0029, KO_{10w} vs KO_{40w} p<0.0001, KO_{20w} vs KO_{40w} p=0.0206. Level 4 $F_{(2,201)}$=18.63, p<0.0001, Tukey WT_{10w} vs WT_{20w} p<0.0001, WT_{20w} vs WT_{40w} p=0.0272, KO_{10w} vs KO_{40w} p<0.0001. Level 5 $F_{(2,150)}$=5.046, p=0.0076, Tukey WT_{10w} vs WT_{20w} p=0.0209, WT_{20w} vs WT_{40w} p=0.0003). Spine density was also significantly decreased between WT and KO mice at 40w for fourth and fifth dendritic levels (Level 4 $F_{(1,201)}$=8.135, p=0.0048, Tukey WT_{40w} vs KO_{40w} p<0.0001. Level 5 $F_{(1,150)}$=7.278, p=0.0078, Tukey WT_{40w} vs KO_{40w} p=0.0002). These data suggest again that aging processes could be different between WT and KO mice. To identify whether these changes in spine density were supported by changes in density of shape-specific spines, we sorted spines into three groups: thin, mushroom, and stubby spines as described in table 1. We highlighted that age-related decreases of spine density onto third level dendrites are mainly due to decreases of thin and mushroom spine density (Figure 4B-D) (Thin F(2,198)=15.54, p<0.0001, Tukey WT_{10w} vs WT_{20w} p<0.0001, KO_{10w} vs KO_{40w} p=0.0021, KO_{20w} vs KO_{40w} p<0.0001. Mushroom F(2,198)=78.38, p<0.0001, Tukey WT_{10w} vs WT_{20w} p<0.0001, KO_{10w} vs KO_{40w} p<0.0001, KO_{20w} vs KO_{40w} p=0.0007) suggesting that these modifications are independent of the spine maturity stages. For fourth and fifth level dendrites, we highlighted that changes in density of all three spine types seem to account for global spine density variations with aging (Level 4 Thin $F_{(2,247)}$=49.64, p<0.0001. Mushroom $F_{(2,247)}$=109.2, p<0.0001. Stubby $F_{(2,247)}$=24.7, p<0.0001. Level 5 Thin $F_{(2,156)}$=32.04, p<0.0001. Mushroom $F_{(2,156)}$=144.6, p<0.0001. Stubby $F_{(2,156)}$=14.5,

p<0.0001). However, the fall of spine density between WT and KO mice at 40w seems to be due to the fall of thin and stubby spines only, suggesting here that mature spines are preserved on fourth and fifth level dendrites (Level 4 Thin $F_{(1,247)}$=28.31, p<0.0001 Tukey WT_{40w} vs KO_{40w} p<0.0001. Stubby $F_{(1,247)}$=47.49, p<0.0001 Tukey WT_{40w} vs KO_{40w} p<0.0001. Level 5 Thin $F_{(1,156)}$=20.17, p<0.0001 Tukey WT_{40w} vs KO_{40w} p<0.0001. Stubby $F_{(1,156)}$=45.23, p<0.0001 Tukey WT_{40w} vs KO_{40w} p<0.0001).

Discussion

In this paper we analyzed the effects of aging on motor stereotypies and rearing behavior, along with functionality and morphology of striatal medium spiny neurons, in the $Shank3^{\Delta C/\Delta C}$ (KO) mouse model of ASD. We were interested in studying aging as ASD are a lifelong condition and a large part of clinical and animal studies focused on developmental stages. In this study we used KO animals and age-matched WT control littermates at 10w, 20w, and 40w, standing for young adult, adult, and old stages. We used groups gathering males and females as no sex-related differences have been statistically observed for behavioral analysis in our hands.

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

The excitation/inhibition imbalance hypothesis of ASD (Nelson & Valakh, 2015; Rubenstein & Merzenich, 2003) has been extensively examined mainly for its excitatory part in the Shank3 models of ASD (Delling & Boeckers, 2021), as Shank3 protein is expressed at

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

Our data clearly highlight that frequency and distribution of events are affected in KO mice at 20w only, resulting in a significant increase of the number of small amplitude currents (10-15pA) as well as a trend to increase for high amplitude currents (50pA & more), leading to a significant increase of IPSC frequency and cumulative probability. Interestingly, neither the IPSC distribution, the cumulative probability nor the frequency was affected at younger stage (10w) or latter stage (40w), leading to the reinforcement of our 20w-shift hypothesis. These findings are a major step forward in the comprehension of the GABAergic related alterations in ASD models, as little is known about it (Thabault et al., 2022). The first clear GABAergic involvement in ASD physiopathology is that transgenic mice lacking either alpha 5 or beta 3 GABA-A receptor subunit display ASD-like phenotypes (DeLorey, 2005; Zurek et al., 2016). To date, striatal GABAergic impairments are observed only in a few models of ASD, such as Chd8+/- mice (Platt et al., 2017), NL3-cKO mice (Rothwell et al., 2014) and Fmr1-/- mice (Centonze et al., 2008), but were never described in any Shank3 model of ASD. Moreover, all above-cited studies used 4weeks to 10weeks mice and did not describe age-related striatal GABAergic impairments. We also highlighted IPSC frequency dysfunctions and related parameters, suggesting that presynaptic but not post-synaptic alterations may occur. Given that GABAergic inputs onto the MSN arise from MSN collaterals and GABAergic interneurons and that we demonstrated that MSN firing properties were not altered with aging in this model, one could hypothesize that GABAergic interneurons are affected in this model and contribute to striatal dysfunctions in ASD.

For Peer Review

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

As morphological disturbances were highlighted on distal arborization, we next measured the dendritic spine density on third, fourth and fifth level dendritic segments. Differences observed here were mainly a result of aging. Indeed, we showed that the global spine density is significantly lower in KO mice than in WT mice at 40w only, on the most distal dendritic segments. Interestingly, in the Shank3B KO mouse model of ASD, the spine density was reported to be decreased as early as 5-6w (Peça et al., 2011). This suggests that the deletion of the C-terminal part of the protein leads to age-dependent alterations of the spine density, but not at young stages. We then sorted the spines into three different groups: thin, stubby, and mushroom spines, according to previous studies (Hering & Sheng, 2001; Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Sebastian et al., 2013). We found that in third level dendrites, the age-related changes in density can be attributed to changes in the density of thin and mushroom spines, which are respectively immature and mature spines (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020). However, although the stubby spine density is supposed to fall with aging (Bloss et al., 2011; Hering & Sheng, 2001), we observed this decrease on fourth and fifth dendritic segments only, where all three spine types are decreased with aging. Finally, the decrease of the spine density between WT and KO mice at 40w on most distal dendritic segments is carried by a fall in thin and stubby spine density, but not mushroom spine density, as also shown in aging studies (Bloss et al., 2011). Given that mushroom spine density is higher in KO mice than in WT mice at 10w and 20w, we suggest that maturation but not maintenance of the dendritic spines could be affected in ASD.

Here, we highlighted that motor stereotypies worsen with aging in KO mice, at the expense of other behaviors like rearing behavior. This worsening of ASD symptom at 40w seems to be due to earlier disturbances of the striatal GABAergic transmission and to MSN morphological impairments. Taken together, our findings strongly suggest that MSN alterations in ASD may not constitute the primary consequence of developmental impairments but are rather a consequence of other alterations, potentially within interneurons,

For Peer Review

as previously reported in other ASD models (for review: (Filice et al., 2020)) but that remain to be elucidated in this model. In addition, our findings clearly show that 20 weeks could be a critical time-point in the evolution of the ASD physiopathology, opening a way to a better understanding of the aging processes in ASD.

References

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

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

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

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

Courchesne, E., Gazestani, V. H., & Lewis, N. E. (2020). Prenatal Origins of ASD: The When, What, and How of ASD Development. *Trends in Neurosciences*, *43*(5), 326–342. https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.03.005

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

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

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

Duffney, L. J., Zhong, P., Wei, J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., Ma, K., Dietz, D. M., Kajiwara, Y., Buxbaum, J. D., & Yan, Z. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient

Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Reports*, *11*(9), 1400–1413. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.064

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

For Peer Review

Subramanian, K., Brandenburg, C., Orsati, F., Soghomonian, J. J., Hussman, J. P., & Blatt, G. J. (2017). Basal ganglia and autism – a translational perspective. *Autism Research*, *10*(11), 1751–1775. https://doi.org/10.1002/aur.1837

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

Wiegel, J., Flory, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Yong Ma, S., Imaki, H., Wiegel, J., Cohen, I. L., London, E., Wisniewski, T., & Brown, W. T. (2014). Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism ... Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alter. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*(141), 1–18.

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

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

For Peer Review

Tables

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

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

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

Table 2: Time constant is differentially altered in an age-dependent manner in WT and KO mice. Membrane capacitance and resistance, and time constant were measured with Cs-based internal solution. Resting membrane potential was measured with K-Gluconate based internal solution. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. # = age effect # p<0.05 ##p<0.01. n values are reported in the table.

Figure legends

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

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

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

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

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

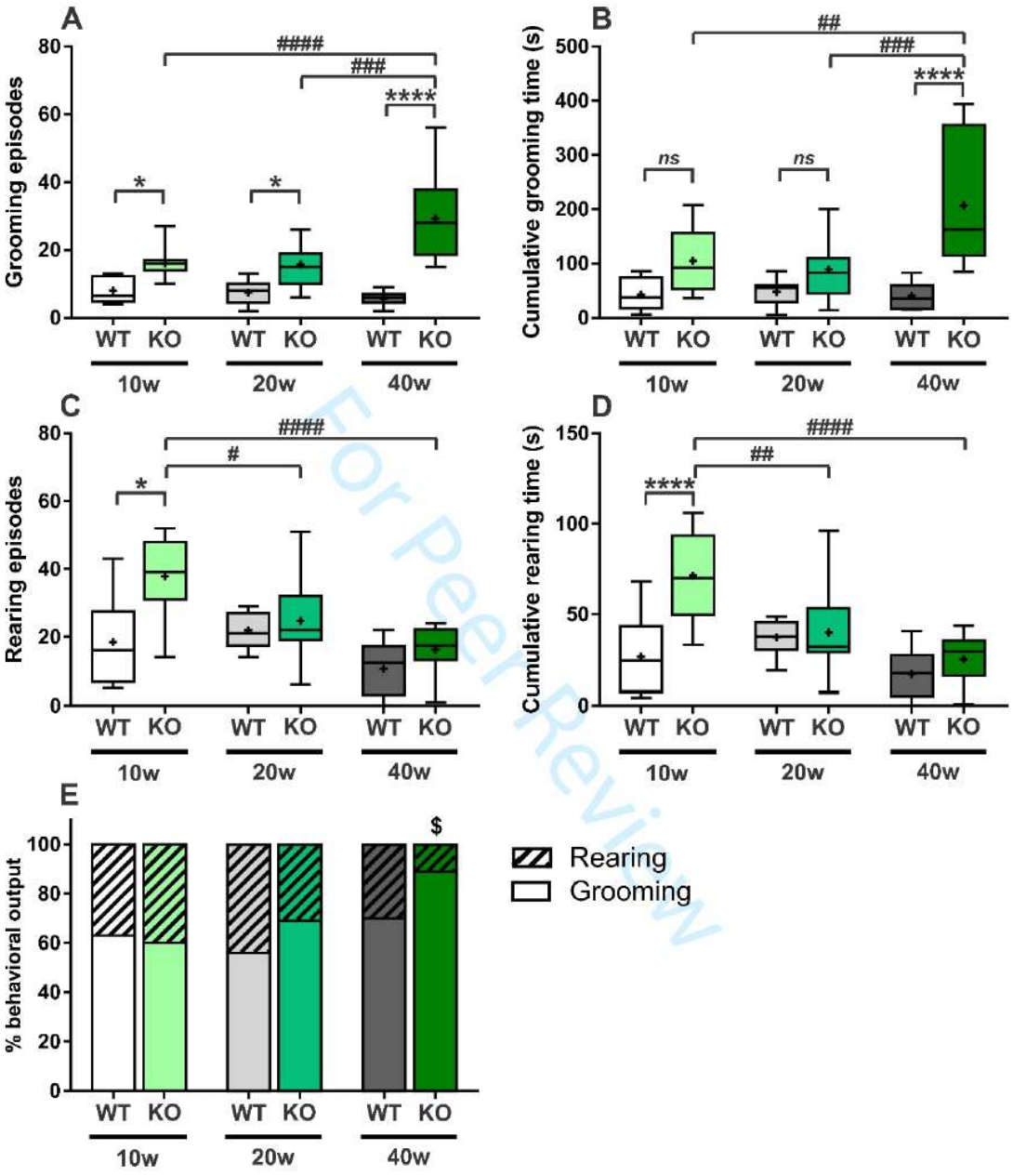
(A) Representative neuronal morphology obtained with IMARIS software. Scale bar 40µm (B) Sholl analysis of the MSN arborization density. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc. * = genotype effect * $p<0.05$. n=5 WT 10w, n=5 KO 10w, n=3 WT 20w, n=8 KO 20w, n=8 WT 40w, n=5 KO 40w neurons

Figure 4: Dendritic spine density is altered with aging

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

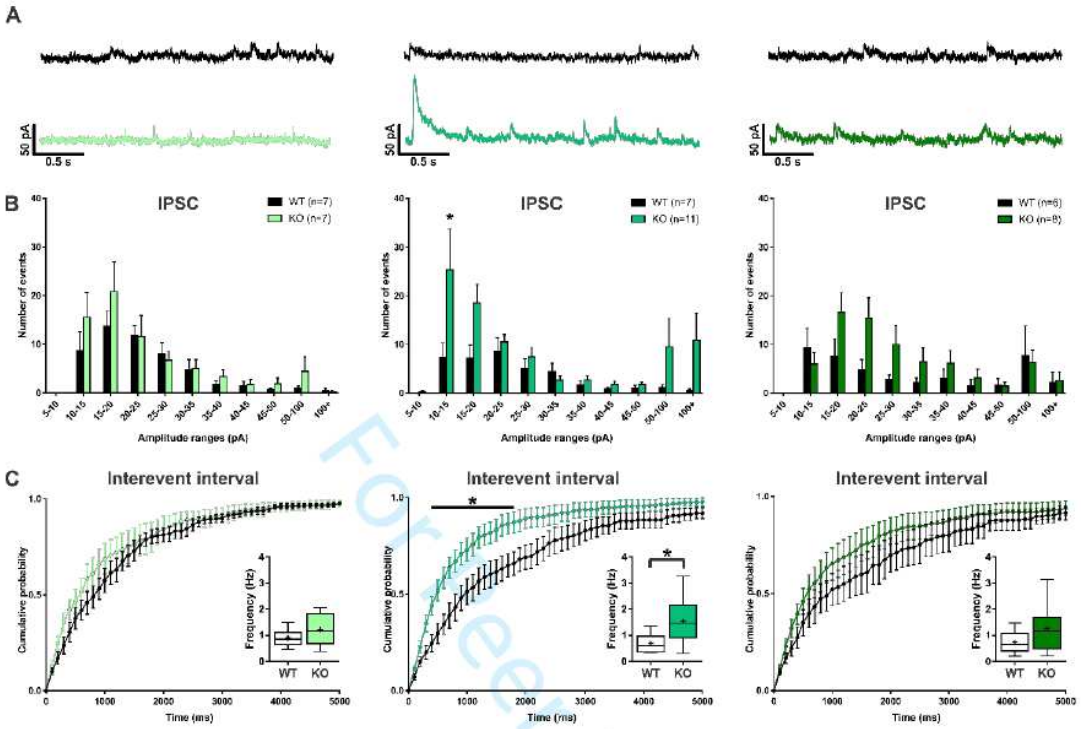
For Peer Review

Figure 1:



For Peer Review

Figure 2:



For Peer Review

Figure 3:

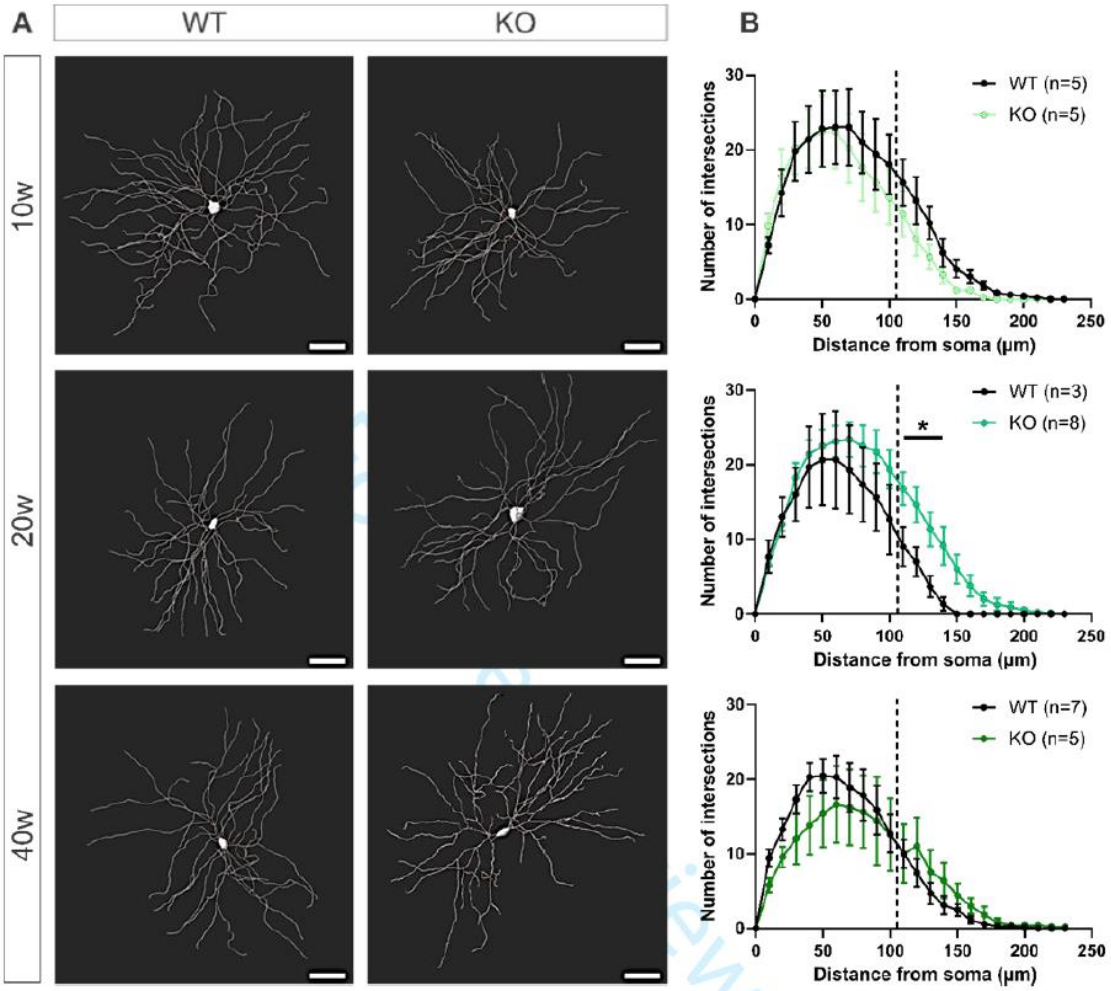
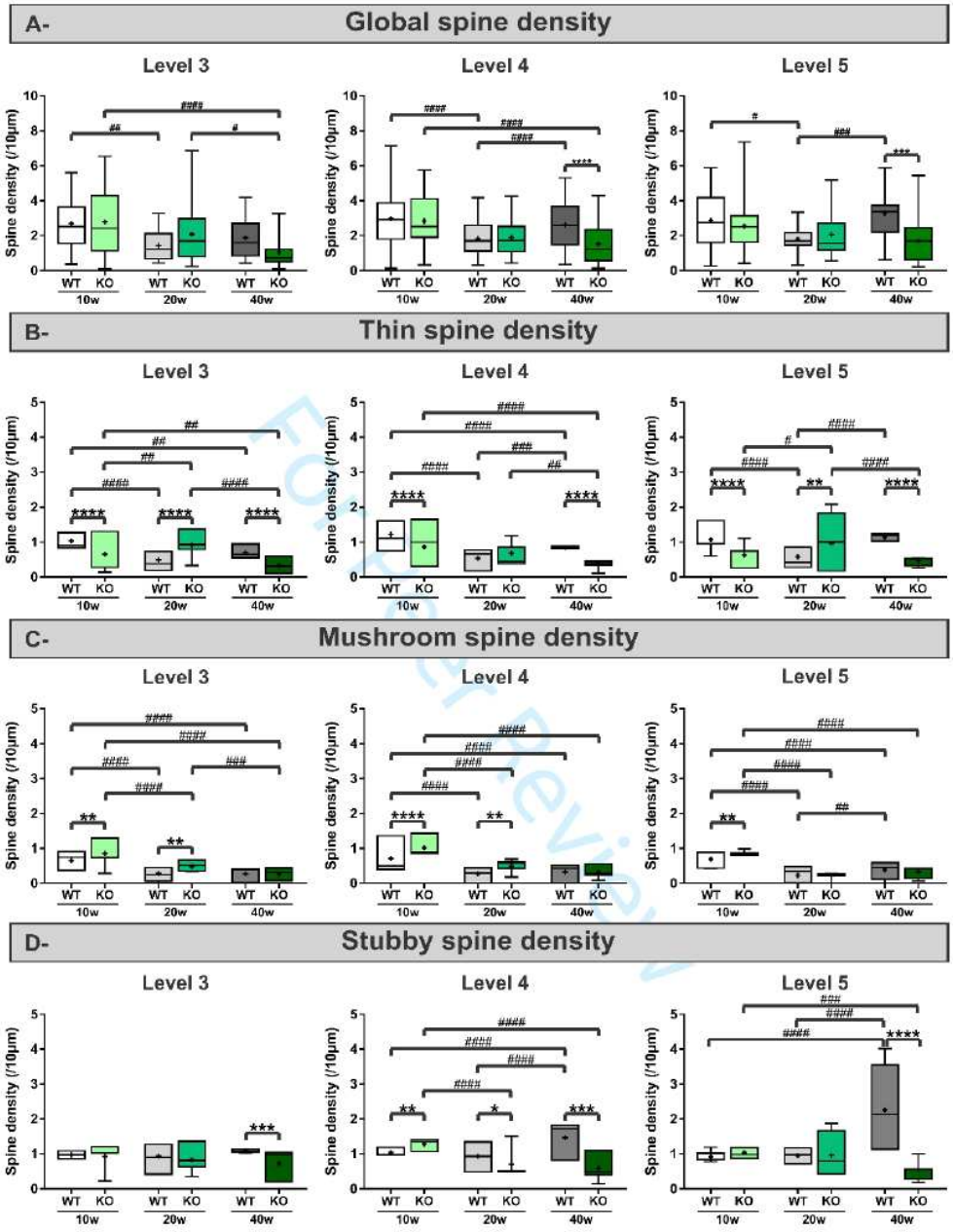

A
WT
KO
10w
20w
40w
B
Number of intersections
Distance from soma (µm)
WT (n=5)
KO (n=5)
WT (n=3)
KO (n=8)
*
WT (n=7)
KO (n=5)

Figure 4:



For Peer Review

PROJET n°2

Age-related behavioral and striatal dysfunctions in Cntnap2$^{-/-}$ mouse model of autism spectrum disorder

Méthodes

Animaux

L'ensemble des procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec la déclaration d'Helsinki et suivant les recommandations de la directive européenne 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Un comité d'éthique local a étudié et approuvé l'ensemble des expérimentations qui ont été réalisées sur des souris mâles et femelles, âgés de 10 à 40 semaines (dossiers n° 2018101215202092, n° 2019021814016342 et n°2020010716118606). Les souris ont été hébergées dans des cages homologuées, avec accès continu à l'eau et à la nourriture, avec un cycle jour/nuit de 12 heures.

Les souris B6.129(Cg)-*Cntnap2*^{tm1Pele}/J ont été fournies par les laboratoires Jackson (Jackson Laboratories, États-Unis) et ont un fond génétique C57/BL/6J. Des souris Cntnap2$^{+/-}$ ont été accouplées afin de générer des souris des trois génotypes : Cntnap2$^{+/+}$ (noté WT ci-après), Cntnap2$^{+/-}$ et Cntnap2$^{-/-}$ (noté KO ci-après). Les petits de même sexe ont été séparés de leur mère au jours post-natal 28 (P28) et hébergés par groupes de 3 à 5 individus. Les animaux ont été génotypés par PCR à l'aide des amorces suivantes : sens commun 5'-CTG CCA GCC CAG AAC TGG-3', antisens WT 5'- ACA CCA GGG GCA AGA ATT G-3' et antisens muté 5'-CGC TTC CTC GTG CTT TAC GGT AT-3'.

Les souris B6;129P2-*Pvalb*$^{tm1(cre)Arbr}$/J (PV-Cre) ont été fournies par les laboratoires Jackson (Jackson Laboratories, États-Unis) et ont un fond génétique C57BL/6J. Les souris PV-Cre$^{+/-}$ ont été accouplées pour obtenir des souris des trois génotypes PV-Cre$^{-/-}$, PV-Cre$^{+/-}$ et PV-Cre$^{+/+}$. Seules les souris PV-Cre$^{+/+}$ ont été utilisées pour ce projet. Les petits de même sexe ont

été séparés de leur mère à P28 et hébergés par groupes de 3 à 5 individus. Les souris ont été génotypées par PCR à l'aide des amorces suivantes : sens WT 5'- CAG AGC AGG CAT GGT GAC TA-3', sens muté 5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3', antisens WT 5'-AGT ACC AAG CAG GCA GGA GA-3' et antisens muté 5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3'.

Les souris de lignée PV-Cre x Cntnap2 ont été obtenues par croisement des souris PV-Cre$^{+/+}$ et Cntnap2$^{+/-}$ Des souris PV-Cre x Cntnap2$^{+/-}$ ont été accouplées afin de générer des animaux des trois génotypes : PV-Cntnap2$^{+/+}$ (noté WT), PV-Cntnap2$^{+/-}$ et PV-Cntnap2$^{-/-}$ (noté KO). Seules les souris WT et KO ont été utilisées dans certaines expérimentations, lorsque nécessaire. Les petits de même sexe ont été séparés de leur mère à P28 et hébergés par groupes de 3 à 5 individus. Les souris doubles transgénique PV-Cntnap2 étant toutes de génotype PV-Cre$^{+/+}$, elles ont été génotypées uniquement pour la mutation du gène Cntnap2 par PCR, à l'aide des mêmes amorces que les souris Cntnap2.

Analyse comportementale

Les stéréotypies motrices et le comportement de redressement ont été évalués à l'aide d'un test du cylindre. Dans une cage carrée, 4 cylindres de plexiglas transparent de 12cm de diamètre ont été disposés par rangées de deux, et séparés par des feuilles opaques afin de les isoler les uns des autres. Les souris ont été placées dans les cylindres à raison d'une souris par cylindre, et ont bénéficié d'une période d'habituation de 10min à ce nouvel environnement. Les souris ont ensuite été filmées par le dessus pendant 10min à l'aide du logiciel VideoTrack (Viewpoint™, Lyon, France). Le nombre d'épisodes de toilettage (grooming) et de redressement contre la paroi (rearing), ainsi que le temps cumulé de ces comportements ont

été évalués à l'aide du logiciel Solomon Coder (András Péter, Keele, Royaume-Uni) par des expérimentateurs aveugles au génotype et à l'âge des animaux.

Injections virales intrastriatales

Les souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 WT et KO ont été acclimatées à la salle de chirurgie pendant 15min avant de débute les procédures chirurgicales. Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'isoflurane (4% induction et 1,5% maintien) et ont reçu une injection analgésique sous-cutanée de kétoprofène (20mg/kg, NaCl 0.9% qsp 100µL). La zone d'incision a été anesthésiée localement à l'aide de lidocaïne et de la povidone iodée a été appliquée pour son action antiseptique. Les souris ont ensuite été placée sur un cadre stéréotaxique (Phymep, Paris, France), et ont reçu une application de vitamine A sur les yeux pour prévenir de la sécheresse oculaire. La peau a ensuite été incisée et le crane a été percé à l'aide d'une fraiseuse adaptée à l'emplacement des injections dont les coordonnées depuis le bregma sont : +1 antéro-postérieur, ±2 latéral et -3,3 dorso-ventral. À l'aide d'une pompe pousse-seringue et d'une seringue Hamilton de 10µL (30G/15mm/PS3, Ref 1701 SN 10µL, Phymep, Paris, France), 1µL de solution virale a été injectée dans chaque hémisphère à raison de 0,2µL/min. Les virus suivants ont été utilisés : AAV-DiO-ChR2-EYFP (Université de Caroline du Nord, États-Unis) pour les expérimentations d'optogénétique, AAV-DiO-EYFP (Université de Caroline du Nord, États-Unis) pour l'identification des IN PV lors des enregistrements *ex vivo*, AAV-hSyn-DiO-hM3D(G_q)-mCherry et AAV-hSyn-DiO-hM4D(G_i)-mCherry (Ref. 44361 et 44362, Addgene Europe, Teddington, Royaume-Uni). Chaque injection a été suivie d'une période de latence de 5min avant de retirer la seringue du tissu. À l'issue des deux injections virales, la

peau des souris a été suturée et de la colle chirurgicale a été appliquée pour consolider les points de suture. Chaque souris a ensuite reçu une injection intrapéritonéale de 200µL de solution saline pour prévenir d'une déshydratation. Les souris ont ensuite été placée dans une cage d'hébergement propre, placée sur un tapis chauffant jusqu'au réveil complet. Durant les trois jours suivant les injections virales, les souris ont été pesées quotidiennement. Un suivi post-opératoire incluant un contrôle visuel de la plaie et du pelage ainsi qu'une appréciation du comportement global de l'animal a également été mis en place durant ces trois jours.

Enregistrements électrophysiologiques *ex vivo*

Les souris ont été profondément anesthésiées à l'aide de pentobarbital sodique dilué (120mg/kg, Vétoquinol, Lure, France) et ont subi une perfusion transcardiaque à l'aide d'une solution de coupe froide, oxygénée (95% O_2, 5% CO_2) enrichie en sucrose, contenant (en mM) : 208 sucrose, 10 glucose, 1,25 NaH_2PO_4*H_20 monobasique, 26 $NaHCO_3$, 2,5 KCl, 1,3 $MgCl_2$ and 8 $MgSO_4$ (pH 7.2-7.35, osmolarité 290-310 mOsm/L). Les souris ont ensuite été décapitées et le cerveau a été extrait du crâne avant d'être placé immédiatement dans la solution e coupe oxygénée. Les coupes coronales de 300µm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un vibratome (Leica VT1200S, Leica camera AG, Wetzlar, Allemagne) et transférées dans une chambre d'incubation contenant un liquide cérébro-spinal artificiel oxygéné, à 37°C et contenant (en mM) : 130 NaCl, 10 glucose, 1,25 NaH_2PO_4*H_2O monobasique, 26 $NaHCO_3$, 3 KCl, 2 $MgCl_2$ and 2 $CaCl_2$, (pH 7.2-7.35, osmolarité 290-310 mOsm/L). Les coupes ont ensuite été laissées à reposer pendant 1h avant d'être utilisées pour les enregistrements.

Les MSN ont été identifiés à l'aide d'un microscope inversé (Eclipse FN1, Nikon, Tokyo, Japon) disposant d'un filtre infrarouge et d'une caméra monochromatique associée au logiciel Q-CapturePro® (QImaging™, Surrey, Canada). Les IN PV exprimant l'EYFP ont été identifiés à l'aide d'une lumière LED bleue de 490nm. Les enregistrements de patch-clamp en configuration cellule-entière ont été réalisés à température ambiante et ont été obtenus à l'aide d'un amplificateur MultiClamp 700B, du numériseur Digidata 1440A et du logiciel d'acquisition Clampex 10.7 (pCLAMP, Axon Instruments Inc. Molecular Devices, San José, Californie).

Les pipettes de borosilicate (Ref. STD Wall w/ filament 1.5mmOD, Phymep, Paris France) ont été étirées à l'aide d'une étireuse horizontale (Flaming/Brown™, Sutter Instrument, Novato, Californie) pour atteindre 4 à 6MΩ de résistance. Les enregistrements en mode potentiel imposé ont été réalisés à l'aide de pipettes contenant une solution interne composée de (en mM) : 8 HEPES, 9 EGTA, 125 Cesium-methanesulfonate, 4 NaCl, 3 KCl, 1 $MgCl_2$, 10 phosphocréatine-disodium, 0,1 Leupeptine, 5 Mg ATP et 1 GTP Tris (pH 7.2, osmolarité 270-280 mOsm/L). Les propriétés passives des neurones (capacitance, résistance de membrane, constante de temps Tau) ont été mesurées avant tout enregistrement. Les courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSC) ont été mesurés à une valeur de potentiel imposée de +10mV pendant 4 minutes, en présence de Cyanquixaline 10µM (CNQX) et d'acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque 50µM (APV) (Tocris Bioscience, Bristol, Royaume-Uni) afin de bloquer respectivement les récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA. En fin d'enregistrement, 10µM de bicuculline (Bic) ont été ajoutés afin de bloquer l'activité des récepteur GABA-A. La réponse évoquée des MSN consécutive à une stimulation

optogénétique des IN PV exprimant la ChR2 ont été enregistré à +10mV grâce à une stimulation LED 490nm de 0,5ms.

Les enregistrements en mode courant imposé ont été réalisés à l'aide de pipettes contenant une solution interne composée de (en mM) : 112,5 Potassium-D-Gluconate, 10 HEPES, 5 EGTA, 4 NaCl, 17,5 KCl, 0,5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 ATP-dipotassium et 1 GTP sodique (pH 7.19-7.24, osmolarité 270-280 mOsm/L). Le potentiel de repos des neurones a été mesuré avant tout enregistrement. Des paliers de courant de 10pA ont ensuite été appliqués aux neurones jusqu'à obtenir la génération d'un ou plusieurs potentiels d'action, durant 1000ms pour l'étude des paramètres des potentiels d'action et durant 5ms pour déterminer la rhéobase. Les neurones ont également été enregistrés pendant 5 à 6 minutes sans imposer de courant, afin d'en étudier l'activité spontanée. Les enregistrements ont été analysés avec les logiciels ClampFit (v10.7, pCLAMP, Axon Instruments Inc. Molecular Devices, San José, Californie) et MiniAnalysis (Synaptosoft Inc., Fort Lee, New Jersey).

L'ensemble des solutions internes utilisées contenaient également de la biocytine 0,2% (Ref. B4261, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) afin de marquer les neurones à l'issue des enregistrements.

Drogues

Les drogues utilisées lors des enregistrements électrophysiologiques (Tocris Bioscience, Bristol, Royaume-Uni) ont été dissoutes dans l'eau et les solutions stock ont été préparées comme suit : 50mM APV (Ref. 0106), 10mM CNQX (Ref. 1045) et 20mM Bic (Ref.

2503). L'APV a été utilisé à une concentration de travail de 50µM tandis que le CNQX et la Bic ont été utilisés à 10µM).

Analyse morphologique

L'ensemble des coupes coronales ayant servies à des enregistrements électrophysiologiques ont été incubées pendant 18 à 24h dans une solution de PFA 4% afin de fixer les tissus. Les coupes ont ensuite été transférées dans une solution de sucrose 20% pendant 48h minimum avant d'être utilisées pour la révélation de la biocytine. L'ensemble des étapes de la révélation ont été réalisées à température ambiante, sauf mention contraire.

Les coupes ont été rincées dans deux bains successifs de PBS 1X de 5min chacun. Les coupes ont ensuite été transférées 1h dans une solution de blocage contenant 1% d'albumine de sérum bovin et 0,2% de triton dissouts dans du PBS 1X. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 24h à l'obscurité et à +4°C dans un bain de solution de blocage contenant de la streptavidine couplée à un fluorochrome Alexa Fluor 594 (1:1000) (Ref. S11227, Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachussetts). Les coupes ont ensuite été rincées dans trois bains successifs de PBS 1X de 5mi chacun, avant d'être rincées une dernière fois dans une solution de PB 0,1M. Les coupes ont ensuite été montées sur des lames de verres et laissées à sécher à l'obscurité. Les lames ont finalement été recouverte d'une lamelle à l'aide de DePeX (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachussetts) et stockées à +4°C. Les coupes ont ensuite été observées et les images acquises à l'aide d'un microscope confocal OLYMPUS FV3000 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hambourg, Allemagne), au grossissement x40 pour

l'étude de la morphologie globale des MSN et au grossissement x60 pour l'étude des épines dendritiques.

Le soma, l'arborisation et les épines dendritiques ont été reconstruits de manière semi-automatique à l'aide du logiciel IMARIS (v9.8.2, Oxford Instruments, Abington, Oxon, Royaume-Uni). La morphologie des épines dendritiques a été déterminée à l'aide du tableau de classement ci-dessous :

		Critère 1 – Longueur de l'épine (µm)	
		≤ 0,75	**> 0,75**
Critère 2 – Ratio diamètre tête / nuque	**≤ 1**	Stubby	Thin
	> 1	Mushroom	Mushroom

Tableau 1 : Tableau de classement des épines dendritiques.
Les épines dendritiques sont classées selon deux critères numériques, à savoir leur longueur ainsi que le ratio des diamètres de leur tête et de leur nuque. D'après (Hering & Sheng, 2001; Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Sebastian et al., 2013).

Immunohistochimie

Les souris ayant été incluses dans les expérimentations de chimiogénétique DREADD ont été anesthésiées profondément à l'aide de pentobarbital sodique (120mg/kg, Vétoquinol, Lure, France) puis ont subi une perfusion transcardiaque de 150mL de NaCl 0,9% suivie de PFA 4%. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et incubés pendant 48h minimum dans une solution de sucrose 20% avant d'être congelés à l'aide d'un dispositif de congélation rapide Snapfrost (Alphelys, Plaisir, France). Les cerveaux ont ensuite été coupés au cryostat (CryoStar NX70, Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachussetts) en quatre séries de coupes de 40µm. Les coupes ont ensuite été transférées dans deux bains successifs de PBS 1X de 5min chacun,

avant d'être incubées pendant 1h à température ambiante dans une solution de blocage contenant de l'albumine de sérum bovin 3% et du triton 0,3% dans du PBS 1X. Les coupes ont ensuite été incubées dans la solution de blocage en présence d'anticorps primaire Chicken anti-mCherry 1:1000 (Ref. ab205402, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) pendant 15 à 18h à +4°C. À l'issue de l'incubation, les coupes ont été rincées dans deux bains successifs de PBS 1X de 5min chacun, puis incubées dans la solution de blocage en présence de l'anticorps secondaire Goat anti-Chicken 568 1:500 (Ref. A11041, Life Technologies, Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachussetts) pendant 1h à température ambiante. Les coupes ont ensuite été rincées et montées sur lames puis laissées à sécher pendant 10 à 12h à l'obscurité. Les lames ont été couvertes de lamelles à l'aide de DePeX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Les lames ont ensuite été observées au microscope à fluorescence afin de localiser les IN PV exprimant la mCherry et donc le récepteur hM3D(G_q) ou hM4D(G_i).

Analyses statistiques

Les données présentées en diagrammes en boîtes de Tukey (« *Box Plots* ») sont exprimées sous la forme valeur minimale - valeur maximale, et le signe '+' représente la moyenne. Toutes les autres données sont exprimées sous la forme moyenne ± erreur type. Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism (v9.0.0, GraphPad™ Software Inc., La Jolla, Californie). Les tests statistiques utilisés sont mentionnés en légende de chaque figure et les différences ont été considérées comme significatives dès $p<0,05$. L'ensemble des figures a été réalisé à l'aide du logiciel Corel Draw X7 (v17.2.0.688, Corel™ Corporation, Ottawa, Canada).

Résultats

Les stéréotypies motrices et le comportement de redressement sont augmentés avec l'âge chez la souris Cntnap2 KO

Pour déterminer l'évolution des stéréotypies motrices avec l'âge, nous avons mesuré le comportement de toilettage excessif (Grooming) chez les souris Cntnap2 WT et KO à 10 semaines (10w), 20 semaines (20w) et 40 semaines (40w). Aucune différence significative entre mâles et femelles n'a été mise en évidence (Annexe 3) et les individus des deux sexes ont été regroupés dans les groupes expérimentaux. Dès 10w, les souris Cntnap2 KO présentent un nombre d'épisodes de grooming plus important que les souris WT, sans toutefois de différence concernant le temps total passé à se toiletter (Figures 12-A et 12-B). Ces stéréotypies motrices s'aggravent avec l'âge, avec toujours un nombre plus important d'épisodes de grooming, accompagné à 20w et 40w d'une augmentation du temps total passé à se toiletter chez les souris KO comparé aux souris WT (Figures 12-A et 12-B). Cette aggravation des stéréotypies motrices avec l'âge chez la souris Cntnap2 KO s'accompagne d'une augmentation du comportement de redressement (rearing) entre 10w et 40w chez les souris Cntnap2 KO et entre 20w et 40w chez les souris WT (Figures 12-C et 12-D). De façon globale, les souris Cntnap2 WT passent davantage de temps à se redresser contre les parois du cylindre qu'à se toiletter à 10w et 40, tandis que les souris Cntnap2 KO passent davantage de temps à se toiletter qu'à se redresser à 20w (Figure 12-E), suggérant ainsi que la sortie comportementale globale est altérée de manière différente par le vieillissement chez les souris Cntnap2 WT et KO.

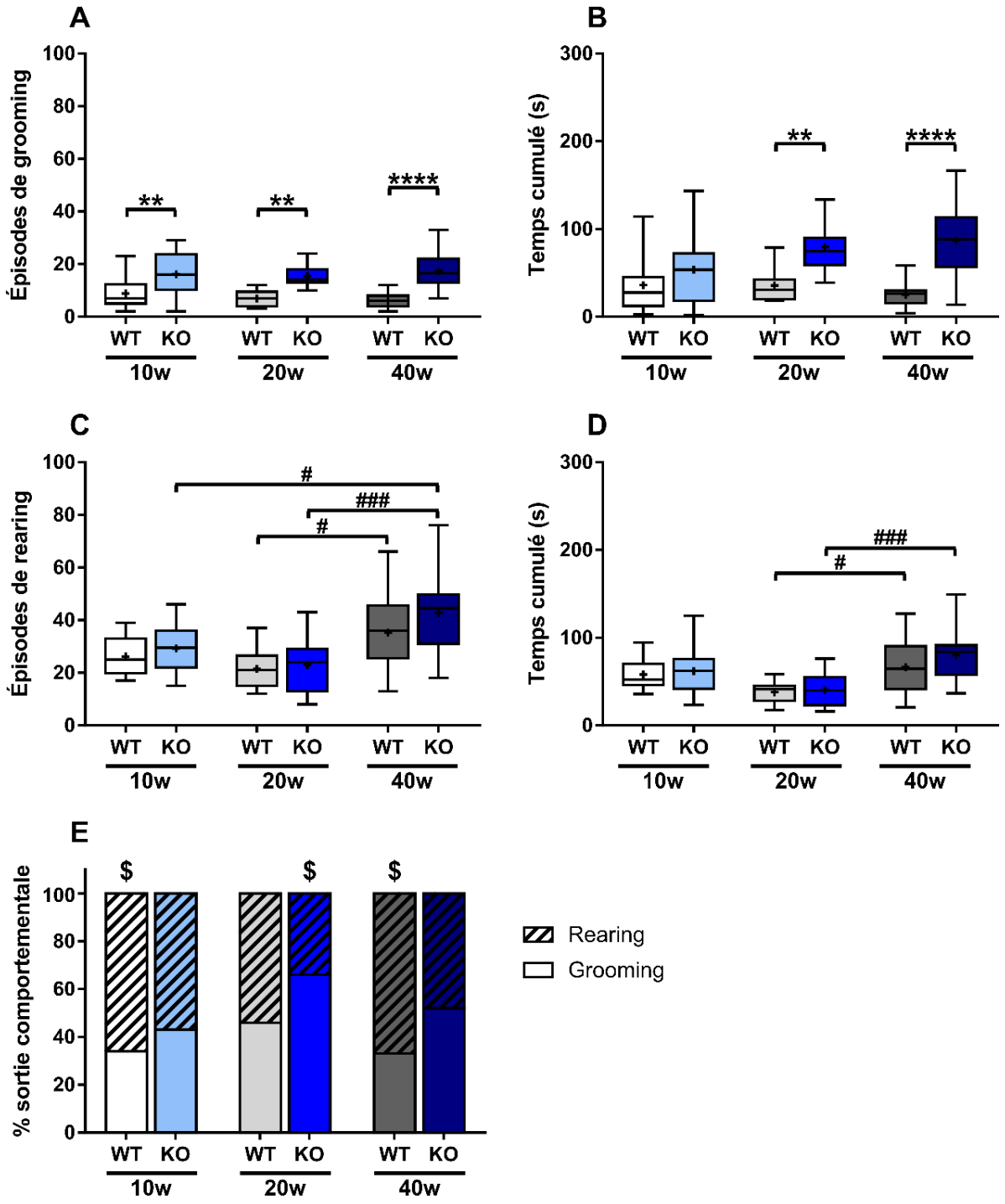


Figure 12 : Aggravation des stéréotypies motrices avec l'âge chez les souris Cntnap2 KO
*(A) Nombre d'épisodes de grooming. (B) Temps cumulé des épisodes de grooming. (C) Nombre d'épisodes de rearing. (D) Temps cumulé des épisodes de rearing. (E) Sortie comportementale globale. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc, * = effet du génotype, # = effet du vieillissement. * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001. Sidak Post-hoc pour la comparaison des sorties comportementales globales. $ = différence comportementale. Nombre d'animaux : N=18 WT 10w, N=16 KO 10w, N=13 WT 20w, N=15 KO 20w, N=13 WT 40w, N=12 KO 40w.*

Changement du profil GABAergique striatal avec l'âge

Le DLS est directement impliqué dans le comportement moteur et donc dans les stéréotypies motrices. Afin de déterminer si des altérations de la transmission GABAergique à ce niveau pourraient expliquer l'aggravation des stéréotypies, nous avons enregistré les MSN du DLS. Le nombre de neurones enregistré étant faible pour un groupe expérimental à ce stade du projet (WT 40w, n=2), les analyses statistiques qui suivent ont été réalisées entre les souris Cntnap2 WT et KO des groupes 10w et 20w séparément.

La mesure des propriétés passives des MSN a permis de mettre en évidence une diminution de la capacitance liée à l'âge chez les souris Cntnap2 WT entre 10w et 20w (Tableau 2). Chez les souris Cntnap2 KO, la valeur de capacitance est similaire dès 10w aux valeurs retrouvées chez les individus plus âgés, suggérant un vieillissement prématuré des MSN. Par la suite, l'enregistrement des courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (IPSC) au niveau des MSN a permis de mettre en évidence une tendance ($p=0.06$) à l'augmentation du nombre d'IPSC de faible amplitude (15-20pA) au niveau des MSN des souris Cntnap2 KO par rapport aux souris Cntnap2 WT (Figure 13-B). De plus, la fréquence des IPSC semble être diminuée de près de 50% chez les souris WT 40w par rapport aux souris WT 10w, tandis qu'elle ne semble pas varier avec l'âge chez les souris Cntnap2 KO. Ceci suggère que les processus de vieillissement n'affectent pas la transmission GABAergique striatale de la même manière chez les souris WT et KO.

Les changements fonctionnels décrits et la tendance à une augmentation du nombre d'IPSC de faible amplitude accompagnée un maintien de la fréquence des IPSC avec le

vieillissement chez les souris KO, peuvent avoir plusieurs causes, comme des modifications morphologiques des MSN ou encore des altérations au niveau pré-synaptique.

		Capacitance (pF)	Resistance (MΩ)	Tau (ms)
10w	WT *(n=10)*	115,00 ± 11,39	136,20 ± 19,18	2,26 ± 0,17
	KO *(n=13)*	93,73 ± 4,03	##130,30 ± 11,84	2,17 ± 0,17
20w	WT *(n=11)*	78,67 ± 5,54	153,30 ± 11,84	1,86 ± 0,18
	KO *(n=14)*	85,29 ± 4,89	146,90 ± 11,75	2,01 ± 0,18
40w	WT *(n=2)*	71,60 ± 6,50	148,10 ± 10,10	1,70 ± 0,10
	KO *(n=6)*	89,42 ± 11,01	107,10 ± 8,37	1,87 ± 0,12

Tableau 2 : Propriétés de membrane des MSN du DLS
Two-way ANOVA pour les données de 10 et 20w, Tukey post-hoc. Nombre de neurones(nombre de souris) : n=13(7) WT 10w, n=13(9) KO 10w, n=11(8) WT 20w, n=14(14) KO 20w, n=2(2) WT 40w, n=6(3) KO 40w.

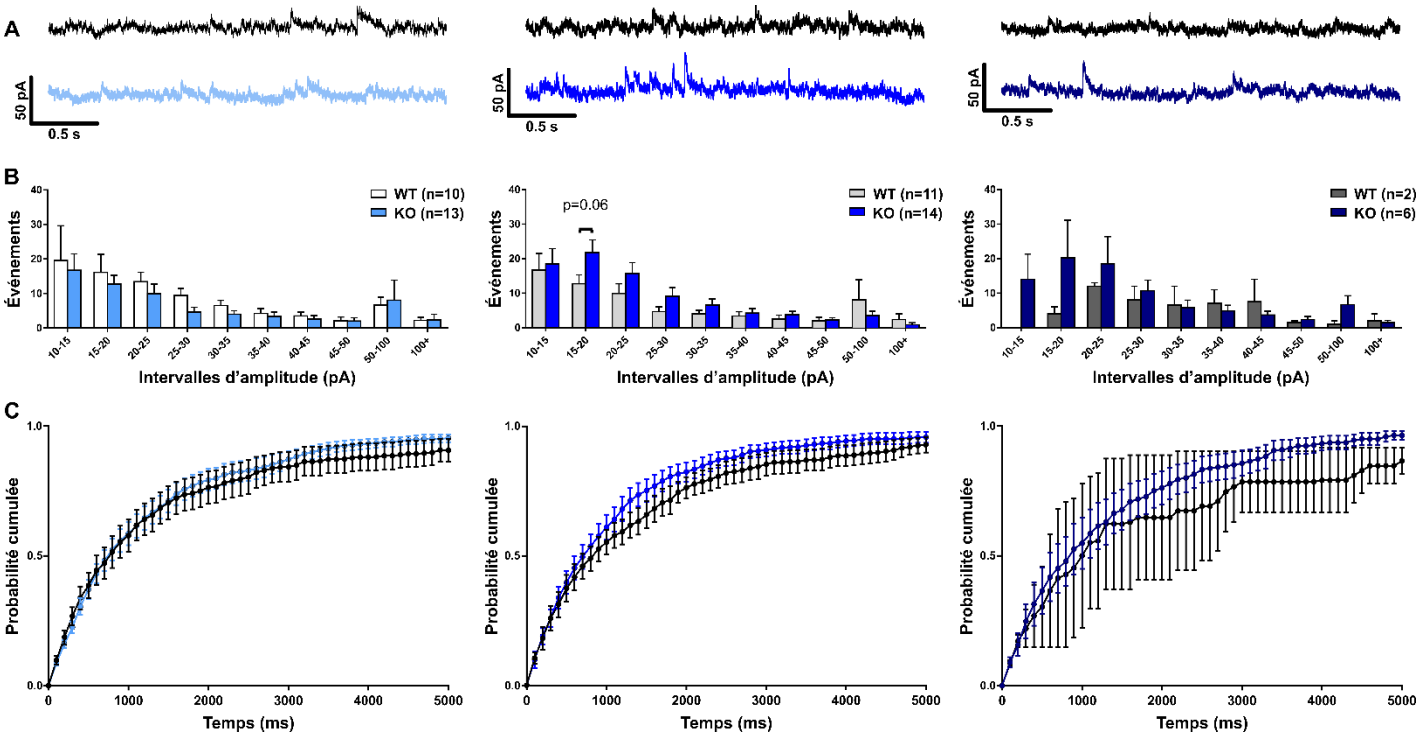


Figure 13 : Changement du profil GABAergique striatal avec l'âge
(A) Tracés représentatifs des IPSC enregistrés sur des MSN de souris Cntnap2 WT et KO à 10w (gauche), 20w (centre) et 40w (droite). (B) Distribution du nombre d'IPSC en fonction de leur amplitude (intervalles = 5pA). (C) Probabilité cumulée d'IPSC. Two-way ANOVA pour les données de 10 et 20w, Tukey post-hoc. Nombre de neurones(nombre de souris) : n=13(7) WT 10w, n=13(9) KO 10w, n=11(8) WT 20w, n=14(14) KO 20w, n=2(2) WT 40w, n=6(3) KO 40w.

La morphologie des MSN du DLS est altérée différemment avec l'âge chez les souris Cntnap2 WT et KO

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les changements du profil GABAergique striatal pourraient être liés à des modifications morphologiques des MSN, nous avons ensuite procédé à la reconstruction et à l'analyse des neurones enregistrés.

Tout d'abord, nous avons mesuré le volume du soma des MSN et avons ainsi pu mettre en évidence une diminution du volume du soma entre 10w et 20w chez les souris Cntnap2 WT (Figure 14-C) Cette diminution du volume du soma peut expliquer en partie la diminution de la capacitance de ces neurones avec l'âge. Chez les souris Cntnap2 KO, le volume du soma est également diminué avec l'âge (Figure 14-C) sans toutefois de modification de la capacitance. Ceci suggère que d'autres facteurs définissant la capacitance comme la composition lipidique et protéique par exemple de la membrane pourraient être altérés de manière précoce.

Nous avons ensuite mesuré la densité de l'arborisation des MSN afin de déterminer si les modifications dans la transmission GABAergique striatale pourraient être liées à des changements dans l'arborisation des MSN. Ainsi, l'analyse de Sholl a révélé une densité de l'arborisation dendritique des MSN plus importante au niveau distal chez les souris Cntnap2 KO en comparaison avec les souris WT à 20w uniquement (Figure 14-B). De manière intéressante, les modifications du profil de transmission GABAergique des MSN semblent avoir lieu entre les mêmes groupes expérimentaux. Ceci suggère que la densification de l'arborisation distale des MSN des souris Cntnap2 KO à 20w pourrait être directement liée à la tendance à l'augmentation du nombre d'IPSC de faible amplitude.

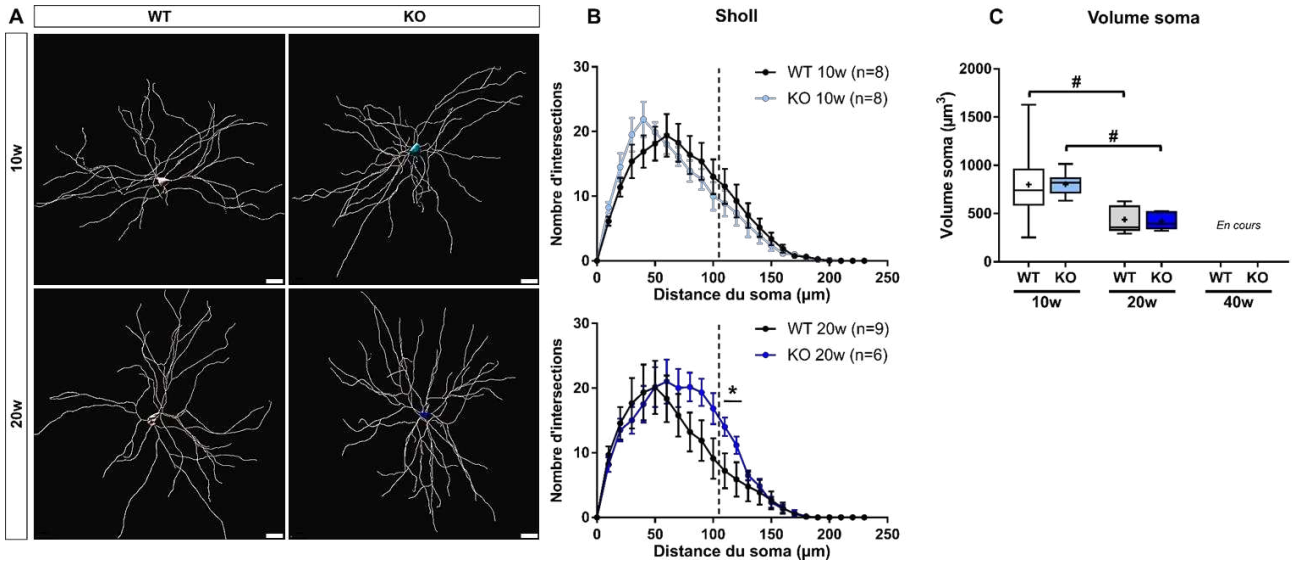


Figure 14 : Atteintes morphologiques des MSN des souris Cntnap2 KO avec l'âge
*(A) Reconstructions représentatives des somas et de l'arborisation dendritique des MSN. Échelle = 20µm. (B) Analyse de Sholl des MSN à 10w (haut) et 10w (bas). (C) Volume somatique des MSN. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc, * = effet du génotype, # effet de l'âge. * p<0,05. Nombre de neurones : n=8 WT 10w, n=8 KO 10w, n=9 WT 20w, n=6 KO 20w.*

Les MSN ont pour particularité de porter de nombreuses épines dendritiques, lieu privilégié de la transmission neuronale. Nous avons donc analysé la densité et la morphologie des épines dendritiques des MSN du DLS afin de déterminer si des variations dans ces paramètres accompagnent les modifications morphologiques globales décrites précédemment. Ces dernières concernant la partie distale de l'arborisation dendritique, seuls les segments distaux de niveaux 3, 4 et 5 ont été analysés, les segments de niveau 1 étant les segments émergeant du soma, les segments de niveaux sont ceux issus de la ramification des segments de niveau 1, etc. Sur les segments de niveaux 3, la densité d'épine dendritique est plus importante chez les souris KO 20w par rapport aux souris WT 20w et aux souris KO 10w, mettant en avant une différence liée à l'âge ne concernant que les souris Cntnap2 KO (Figure 15-A). Les segments de niveau 4 ne montrent quant à eux aucune différence de densité d'épines dendritiques tandis que sur les segments de niveau 5, la densité d'épines

dendritiques est diminuée chez les souris KO par rapport aux souris WT à 10w et 20w (Figure 15-A)

Afin de déterminer si les différences de densité d'épines dendritiques observées sont portées par des différences de morphologie de ces épines, nous avons classé toutes les épines dendritiques selon des critères numériques de longueur, de diamètre de leur tête et de leur cou, comme décrit précédemment (Tableau 1). Ainsi, la densité plus importante d'épines dendritiques mesurée chez les souris KO 20w sur les segments dendritiques d'ordre est médiée par une densité plus importante d'épines matures « Mushroom » et « Stubby » (Figure 15C et 15-D). Sur les segments d'ordre 4, alors qu'aucune différence de densité globale n'a été mise en évidence, la densité des épines « Mushroom » est augmentée chez les souris KO 20w en comparaison avec les souris KO 10w et WT 20w. De manière intéressante, la diminution des épines « Stubby » et « Thin » entre ces groupes semble équilibrer la densité globale (Figure 15). Enfin, sur les dendrites d'ordre 5, la diminution de la densité d'épines dendritiques chez les souris KO par rapport aux souris WT à 10w et 20w est vraisemblablement due à une diminution des épines « Thin » et « Stubby » entre ces groupes précisément (Figures 15-B et 15-D).

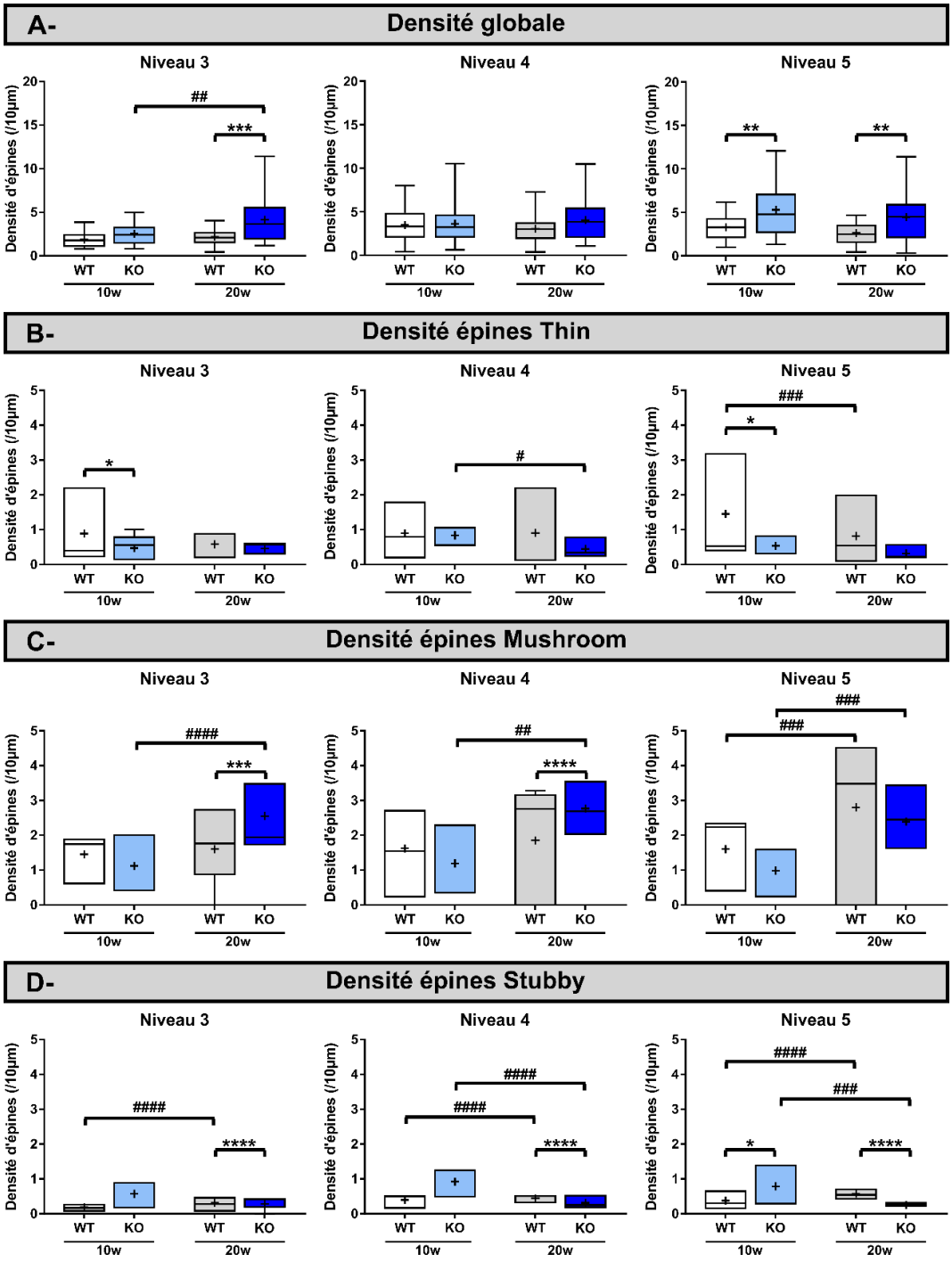


Figure 15 : La densité et la morphologie des épines dendritiques sont altérées avec l'âge
*(A) Densité globale d'épines dendritiques. (B) Densité des épines Thin. (C) Densité des épines Mushroom. (D) Densité des épines Stubby. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc, * = effet du génotype, # = effet de l'âge. * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001. Nombre de segments de niveau 3 : n= 22 WT 10w, n=18 KO 10w, n=27 WT 20w, n=23 KO 20w. Niveau 4 : n=37 WT 10w, n=22 KO 10w, n=32 WT 20w, n=33 KO 20w. Niveau 5 : n=33 WT 10w, n=28 KO 10w, n=28 WT 20w, n=31 KO 20w.*

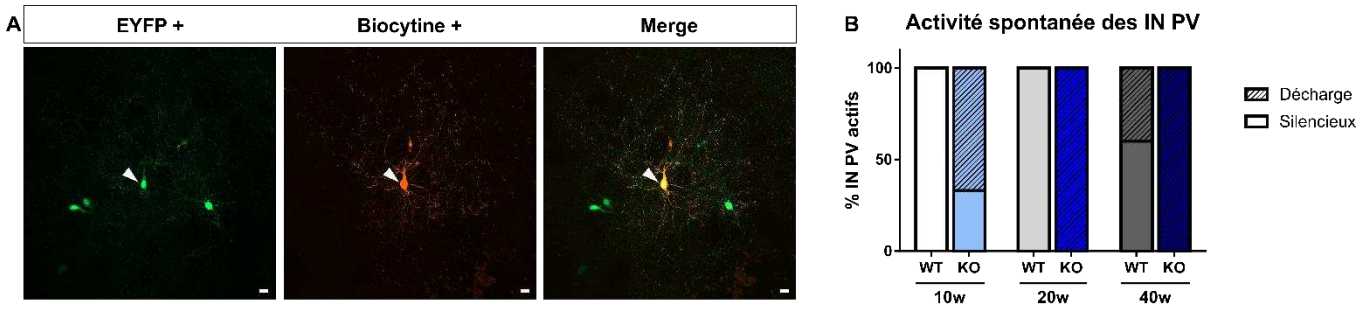
Les IN PV du DLS sont plus excitables et actifs spontanément chez la souris Cntnap2 KO

Les modifications comportementales liées à l'âge semblent être liées à des changements dans le profil de la transmission GABAergique striatale. Cependant, les paramètres électrophysiologiques et morphologiques des MSN ne sont que peu ou pas altérés au stade jeune adulte (10w). Ceci soulève l'hypothèse d'un dysfonctionnement en amont des MSN qui pourrait, au moins partiellement, conduire aux changements décrits ci-dessus. À l'aide de souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ayant reçu une injection virale permettant d'exprimer spécifiquement une protéine fluorescente (EYFP) dans les IN PV (Figure 16-A), nous avons mesuré les paramètres d'excitabilité des IN PV, qui constituent les principales afférences inhibitrices sur les MSN.

Les enregistrements des IN PV du DLS montrent tout d'abord une dépolarisation significative du potentiel de repos chez les souris Cntnap2 KO à 20w, comparé aux souris WT du même âge (Figure 16-C) De manière intéressante, le potentiel de repos des IN PV des souris Cntnap2 KO est également significativement diminué entre 10w et 20w, avant d'augmenter entre 20w et 40w (Figure 16-C). Ces variations du potentiel de membrane des IN PV liées à l'âge chez les souris KO est accompagnée d'une augmentation du temps de repolarisation entre les mêmes groupes. De plus, les IN PV des souris Cntnap2 KO de 40w ont un seuil de décharge inférieur aux IN PV des souris Cntnap2 WT de 40w (Figure 16-C) Ensemble, ces résultats suggèrent que les IN PV des souris Cntnap2 KO sont plus excitables que ceux des souris Cntnap2 WT.

Afin de mesurer l'activité spontanée des IN PV, ces derniers ont été enregistrés en continu pendant 5 à 7 minutes sans imposer de courant. *In vivo*, les IN PV du striatum ont une

activité spontanée très précisément synchronisée et sont en charge de la génération et du maintien des oscillations gamma. *Ex vivo* en revanche, les IN PV sont désynchronisés et sont alors silencieux. La mesure de l'activité spontanée des IN PV chez les souris Cntnap2 WT à 10w et 20w montre que 100% des IN PV enregistrés sont effectivement silencieux *ex vivo* (Figure 16-B). Toutefois, 40% des IN PV enregistrés chez les souris WT déchargent à 40w. De manière intéressante, 67% des IN PV enregistrés chez les souris Cntnap2 KO à 10w ont déjà une activité spontanée (Figure 16-B). À 20w et 40w, ce sont 100% des IN PV enregistrés chez les souris Cntnap2 KO qui déchargent de manière spontanée (Figure 16-B). Ces mesures viennent ainsi renforcer l'hypothèse de l'hyperactivité des IN PV. De plus, le profil d'activité des IN PV Cntnap2 KO à 10w tend à se rapprocher de celui des IN PV Cntnap2 WT 40w, consolidant l'hypothèse d'une atteinte prématurée des populations neuronales striatales dans ce modèle de TSA.



C

		Potentiel repos (mV)		Seuil (mV)		Rhéobase (pA)	Amplitude (mV)	Dépolarisation (ms)	Repolarisation (ms)		Durée AHP (ms)	Amplitude AHP (mV)
10w	WT *(n=4)*	-73,08 ± 1,08		-43,24 ± 1,68		332,50 ± 59,07	75,05 ± 5,09	0,36 ± 0,10	0,56 ± 0,07		11,6 ± 2,6	13,6 ± 1,0
	KO *(n=6)*	-74,40 ± 1,77		-41,83 ± 1,85		278,30 ± 36,46	70,22 ± 3,32	0,85 ± 0,25	0,81 ± 0,14		22,1 ± 4,9	15,2 ± 1,2
20w	WT *(n=3)*	-72,47 ± 1,24	#	-38,04 ± 1,86	###	310,00 ± 81,85	70,76 ± 3,58	0,61 ± 0,10	1,05 ± 0,10	###	50,2 ± 5,4	12,6 ± 0,6
	KO *(n=3)*	-52,90 ± 3,11***		-39,07 ± 0,52		66,67 ± 12,02	57,57 ± 3,94	3,44 ± 1,99	1,64 ± 0,26		41,4 ± 11,9	10,4 ± 1,0
40w	WT *(n=5)*	-62,90 ± 0,63		-35,44 ± 1,39	###	208,00 ± 34,26	75,32 ± 2,35	1,12 ± 0,30	0,99 ± 0,07	###	46,1 ± 4,8	12,5 ± 1,6
	KO *(n=3)*	-72,80 ± 5,00		-49,42 ± 5,47**		233,30 ± 158,60	75,84 ± 1,96	0,84 ± 0,37	0,74 ± 0,08		20,5 ± 7,7	12,7 ± 3,6

Figure 16 : Les IN PV du DLS sont hyperexcitables et ont une activité spontanée anormale chez la souris Cntnap2 KO à 10w
*(A) Images représentatives des IN PV exprimant l'EYFP (gauche), d'un IN PV marqué à la biocytine (centre) et du même IN PV coexprimant les deux marquages (droite). Échelle = 20µm. (B) Pourcentage d'IN PV actif parmi les IN PV enregistrés dans chaque groupe. (C) Paramètres d'excitabilité des IN PV. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc, * = effet du génotype, # = effet de l'âge. * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001. Nombre de neurones$_{(nombre\ de\ souris)}$: n=4$_{(3)}$ WT 10w, n=6$_{(5)}$ KO 10w, n=3$_{(2)}$ WT 20w, n=3$_{(2)}$ KO 20w, n=5$_{(4)}$ WT 40w, n=3$_{(2)}$ KO 40w.*

<u>La réponse évoquée des MSN à un stimulation des PV semble altérée dès 10w chez la souris Cntnap2 KO</u>

Cette hyperexcitabilité et cette activité spontanée des IN PV nous permet d'émettre l'hypothèse qu'ils seraient à l'origine des changements fonctionnels mesurés au niveau des MSN. Afin de tester cette hypothèse, la voie de transmission IN PV – MSN a été étudiée par l'enregistrement sur ces derniers de la réponse évoquée consécutive à l'activation optogénétique des IN PV, grâce à des souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ayant reçu une injection virale permettant d'exprimer la channelrhodopsine dans les IN PV de manière spécifique (Figure 17-A). Les premiers résultats semblent montrer que l'amplitude de la réponse évoquée est diminuée de plus de 50% chez les souris Cntnap2 KO à 10w (Figure 17-C).

Ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité des IN PV est modifiée chez la souris Cntnap2 KO dès 10w, et que le patron d'activité de ces IN PV rend la communication IN PV – MSN inefficace à ce stade. La voie de communication semble se stabiliser plus tard dans le vieillissement, à 20w, en parallèle de la dépolarisation du potentiel de repos des IN PV, qui sont alors plus excitables.

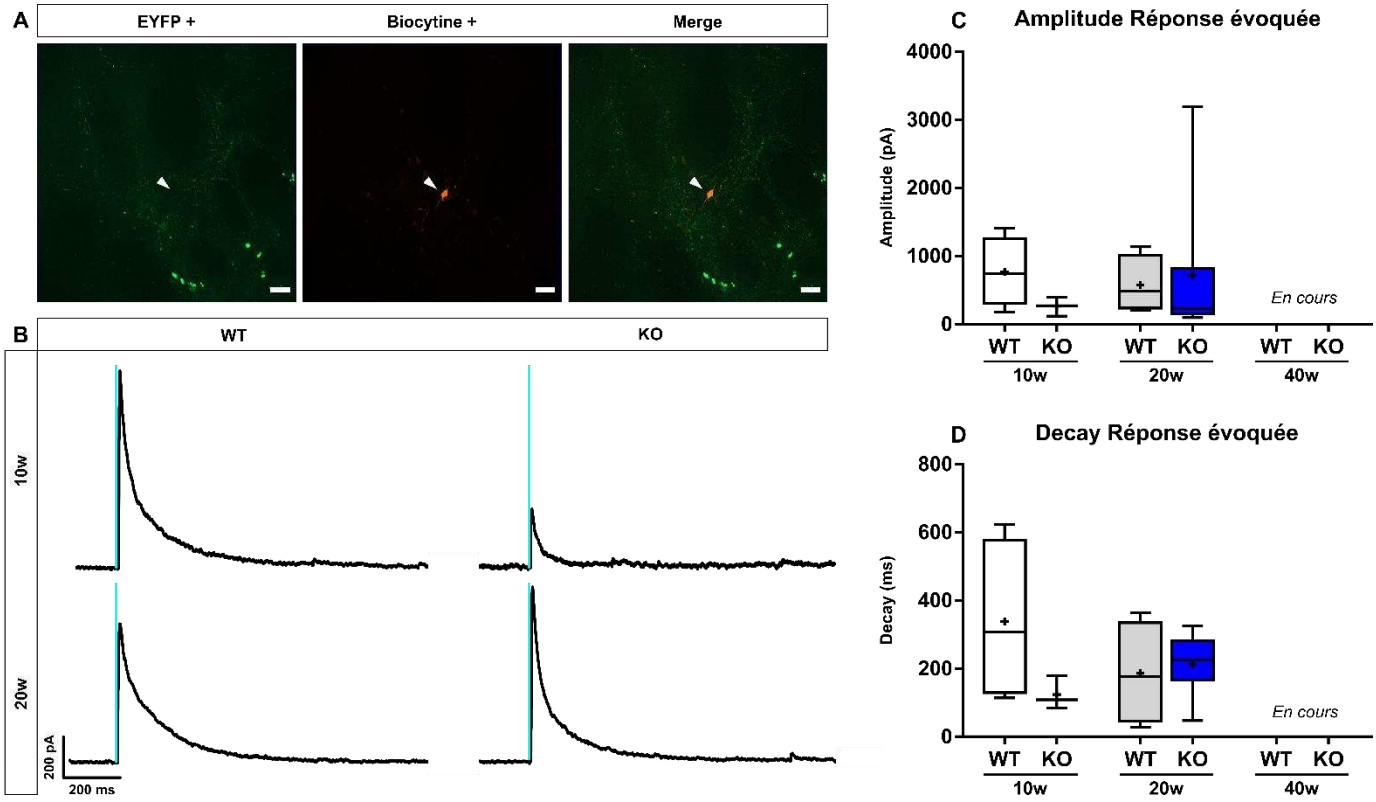


Figure 17 : L'amplitude de la réponse évoquée semble diminuée dès 10w chez la souris Cntnap2 KO (A) Images représentatives de l'environnement EYFP+ (gauche), d'un neurone marqué à la biocytine (centre) et du même neurone dans l'environnement EYFP+, n'exprimant pas l'EYFP (droite). Échelle = 20µm. (B) Tracés représentatifs des réponses évoquées enregistrées. Ligne bleue = stimulation LED 490nm. (C) Amplitude (haut) et decay (bas) des courants évoqués. Nombre de neurones$_{(souris)}$: n=4$_{(2)}$ WT 10w, n=3$_{(3)}$ KO 10w, n=4$_{(2)}$ WT 20w, n=7$_{(6)}$ KO 20w.

L'inhibition chronique des IN PV du DLS permet de rectifier les stéréotypies motrices chez les souris Cntnap2 KO

Les résultats exposés précédemment suggèrent que les IN PV des souris Cntnap2 KO ont une activité anormale dès 10w, et qui s'aggrave avec l'âge. De manière intéressante, les stéréotypies motrices sont aussi observées dès 10w chez les souris Cntnap2 KO, et s'aggravent également avec l'âge. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'hyperactivité des IN PV pourrait alors sous-tendre l'apparition et / ou l'aggravation des stéréotypies motrices chez les souris Cntnap2 KO, nous avons mesuré l'impact d'une inhibition chronique des IN PV dès 10w sur ces symptômes à l'aide de souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ayant reçu une injection virale permettant d'exprimer un récepteur à sept domaines transmembranaires hM4 couplé à une protéine G_i dans les IN PV de manière spécifique (Figure 18-A). La mesure des stéréotypies motrice à l'issue de la période de traitement (solution saline *vs* CNO) montre que les souris Cntnap2 KO ayant reçu une injection quotidienne de solution saline développent des stéréotypies motrices sans variation par rapport à leur niveau basal. En revanche, les souris Cntnap2 KO ayant reçu une injection quotidienne de CNO, c'est à dire ayant subi une inhibition chronique des IN PV striataux, montrent significativement moins de stéréotypies motrices en comparaison avec leur niveau basal (Figure 18-B). De plus, chez les individus traités au CNO, aucune différence significative n'est retrouvée entre les souris Cntnap2 WT et KO, indiquant que l'inhibition chronique des IN PV striataux restaure le phénotype TSA en ce qui concerne les stéréotypies motrices (Figure 18-B). L'ensemble de ces données viennent sensiblement renforcer l'hypothèse d'une dysfonction précoce des IN PV, impliquée dans l'apparition des stéréotypies motrices. La quantification du comportement de rearing chez ces individus montre une diminution significative du nombre d'épisodes de rearing après

traitement au CNO en comparaison avec le niveau basal, chez les souris Cntnap2 WT et KO. Ceci suggère que l'inhibition chronique des IN PV conduit à une diminution globale des paramètres moteurs, y compris les stéréotypies.

Si une inhibition chronique des IN PV conduit à la restauration du phénotype TSA concernant les stéréotypies motrices, la question qui en découle directement est de savoir si une activation chronique de ces IN PV chez la souris Cntnap2 WT conduit à l'apparition de stéréotypies. Pour répondre à cette problématique, des souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ont reçu une injection virale permettant de faire exprimer le récepteur hM3 couplé à une protéine G_q, afin d'activer spécifiquement les IN PV. Les résultats du test de grooming montre que les stéréotypies motrices ne sont pas induites chez les souris Cntnap2 WT qui ont subi une activation chronique des IN PV striataux. De manière intéressante, les souris Cntnap2 KO ayant subi une activation chronique des IN PV striataux ne montrent ni amélioration, ni aggravation de leur phénotype (Figure 18-C), suggérant que l'activité des IN PV est déjà pathologiquement maximale chez ces souris et liée à l'apparition des stéréotypies motrices.

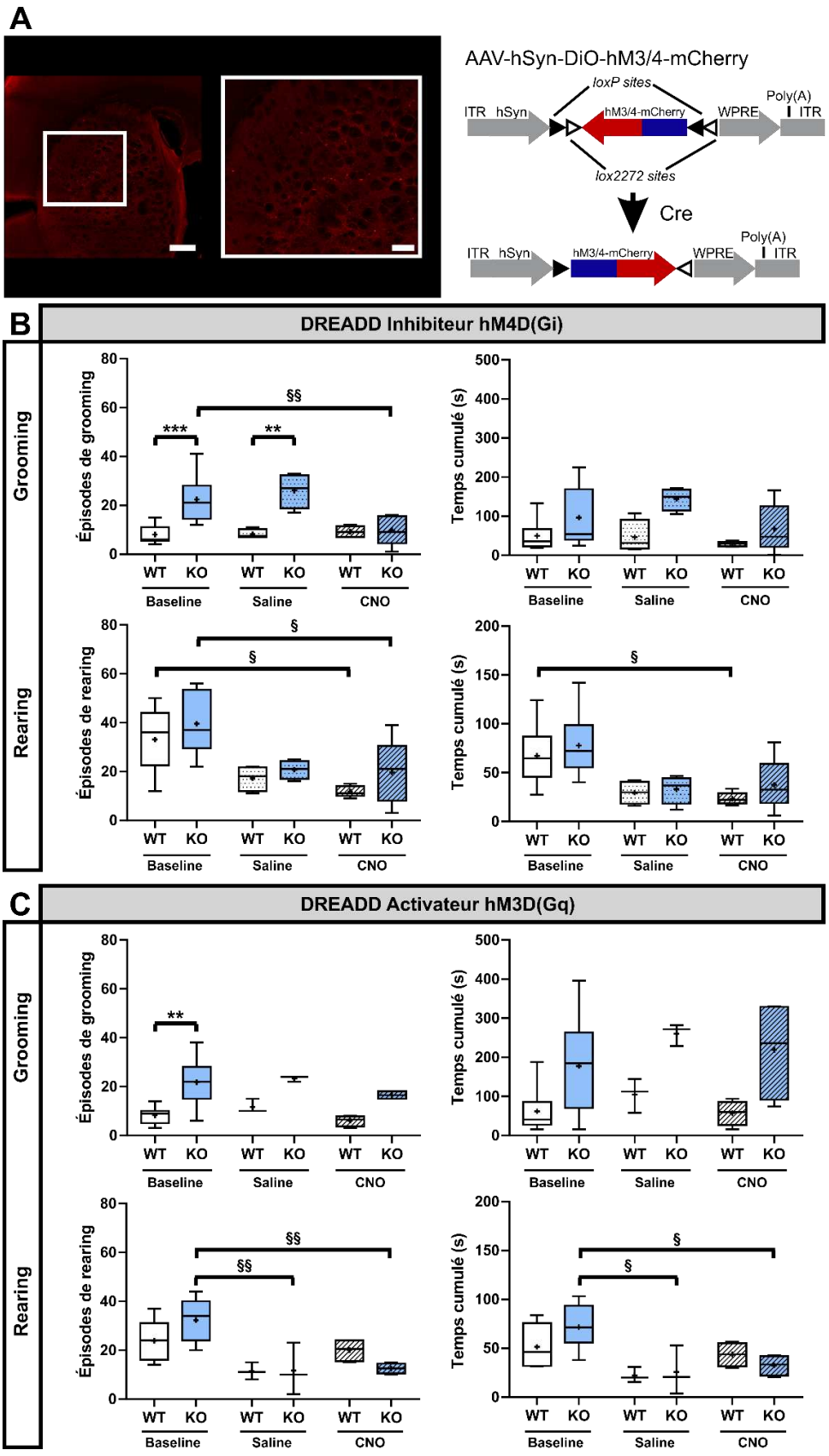


Figure 18 : L'inhibition des IN PV permet de restaurer le phénotype des souris Cntnap2 KO à 10w

*(A) Images représentatives de l'expression de mCherry dans le striatum (échelle =500µm), agrandissement = DLS (échelle =200µm) et schéma d'expression des récepteurs DREADD dans les souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2. (B) Nombres d'épisodes de grooming et rearing avec temps cumulés correspondants après inhibition des IN PV. (C) Nombre d'épisodes de grooming et de rearing et temps cumulés correspondants après activation des IN PV. Two-way ANOVA, Tukey post-hoc, * = effet du génotype, § = effet du traitement. * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001. Nombre d'animaux DREADD inhibiteur : N= 9 WT baseline, N=9 KO baseline, N=4 WT saline, N=4 KO saline, N=5 WT CNO, N=5 KO CNO. DREADD activateur : N= 7 WT baseline, N=7 KO baseline, N=3 WT saline, N=3 KO saline, N=4 WT CNO, N=4 KO CNO.*

Discussion

Dans ce projet, nous avons analysé les effets du vieillissement sur les stéréotypies motrices et le comportement de redressement, ainsi que l'évolution de la transmission GABAergique striatale et la morphologie des MSN dans le modèle Cntnap2 KO de TSA. L'étude du vieillissement dans un contexte autistique revêt une importance majeure, les TSA étant un ensemble de troubles persistant tout au long de la vie des patients. De plus, une majorité d'études cliniques se focalisent sur l'aspect développemental de cette pathologie. Dans ce projet, nous avons utilisé des souris Cntnap2 WT et KO âgées de 10, 20 et 40 semaines (10w, 20w et 40w) représentant les stades jeune adulte, adulte mature et adulte âgé. Les groupes expérimentaux utilisés regroupent des individus mâles et femelles, aucune différence comportementale significative liée au sexe n'ayant été mise en lumière dans nos mains.

Nous avons démontré ici que les stéréotypies motrices sont observées dès le stade jeune adulte (10w) chez les souris Cntnap2 KO en comparaison avec les souris WT, comme cela a été mis en évidence dans de précédentes études (Peñagarikano et al., 2011; Scott et al., 2019). De plus, nos données montrent que les stéréotypies motrices s'aggravent dès 20w et se maintiennent ensuite à 40w, ce dont les données issues de la littérature ne font pas état. Nous avons également quantifié le comportement de redressement des animaux dans le cylindre, et nous avons montré que ce comportement n'est pas différent entre les souris WT et KO aux trois âges étudiés, mais qu'il augmente de manière significative avec l'âge dans nos deux groupes expérimentaux. Ce résultat nous permet donc de rejeter l'hypothèse selon laquelle l'aggravation observée des stéréotypies motrices pourrait être due à une diminution des capacité motrices chez les souris WT. Ces travaux de thèse apportent donc la première

description de l'aggravation des stéréotypies motrices au cours du vieillissement chez la souris Cntnap2 KO, qui peut refléter, en partie au moins, l'aggravation des symptômes et des comorbidités observée chez certains patients à l'âge adulte, incluant les stéréotypies motrices (Croen et al., 2015 ; Jokiranta-Olkoniemi et al., 2021 ; Noone et al., 2006 ; Schoufour et al., 2013).

L'une des hypothèses établies quant à la physiopathologie des TSA repose sur un déséquilibre entre informations excitatrices et inhibitrices (Nelson & Valakh, 2015; Rubenstein & Merzenich, 2003). Dans ce projet, nous avons concentré notre étude sur le striatum dorsolatéral, les stéréotypies motrices ayant été liées à des dysfonctions de ce dernier (Hollander et al., 2005). Dans un premier temps, nous avons examiné la condition de la transmission GABAergique dans cette structure au niveau de la voie de sortie du striatum que sont les MSN en mesurant (i) leurs propriétés passives et (ii) leurs afférences inhibitrices globales par l'enregistrement des courants sIPSC. Nous avons montré que la capacitance des MSN du DLS diminue avec l'âge chez les souris Cntnap2 WT, tandis que la capacitance des MSN des souris Cntnap2 KO n'en est pas affectée. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que la capacitance des MSN des souris Cntnap2 KO a une valeur, dès 10w, proche des valeurs mesurées à 20w et 40w. Ce résultat suggère que les MSN des souris Cntnap2 KO subissent différemment, et potentiellement de manière précoce, les effets du vieillissement en comparaison avec les souris Cntnap2 WT. L'enregistrement des sIPSC montre une tendance à l'augmentation du nombre de courant de faible amplitude (15-20pA) chez les souris Cntnap2 KO à 20w. D'après les premiers résultats obtenus à 40w, la fréquence des sIPSC semble être deux fois plus importante chez les souris KO que chez les souris WT, renforçant l'hypothèse d'altérations apparaissant avec l'âge dans cette structure. En effet, dans d'autre structures, la

transmission GABAergique est altérée dès 10w chez la souris Cntnap2 KO. Ainsi, la fréquence et l'amplitude des sIPSC est diminuée au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (Paterno et al., 2021), et les cellules de Purkinje des lobules crus I et II du cervelet, principale sortie inhibitrice de la structure, ont une excitabilité augmentée et un patron de décharge altéré (Fernández et al., 2021). De plus, il a été montré que l'apparition des dysfonctions dans la transmission GABAergique corticale est dépendante de l'âge. En effet, chez la souris Cntnap2 KO âgée de 3 semaines, aucune altération des sIPSC mesurés sur les neurones pyramidaux du cortex visuel n'a été mise en évidence, tandis que les sIPSC mesurés sur les même neurones à 8 semaines montrent une diminution de leur fréquence par rapport aux souris Cntnap2 WT (Bridi et al., 2017). Ces travaux de thèse semblent donc montrer que les altérations de la transmission GABAergique au niveau des MSN du DLS apparaitraient de manière plus tardive que dans d'autres types cellulaires d'autres structures. Les dysfonctions observées au niveau des MSN semblent avoir deux causes possibles : des altérations de leur morphologie comme cela a déjà été montré dans différents modèles de TSA ou différents contextes pathologiques (Holley et al., 2019; Peça et al., 2011) ou des altérations à l'origine des afférences GABAergiques des MSN.

Afin de tester la première hypothèse, nous avons analysé le volume du soma des MSN enregistrés et avons ainsi mis en évidence une diminution du volume du soma liée à l'âge, aussi bien chez les souris Cntnap2 WT et KO. Cette diminution du volume somatique chez les souris WT avec l'âge est cohérente avec la diminution de leur capacitance, la taille du neurone étant l'un des facteurs permettant de définir la capacitance. Chez les souris Cntnap2 KO, la capacitance étant à 10w à des valeurs semblables à celles mesurées à 20w et 40w, la diminution de la taille du soma entre 10 et 20w ne semble pas impacter la valeur de

capacitance. Ceci suggère que des mécanismes compensatoires pourraient avoir lieu, notamment des changements dans la composition lipidique et protéique de la membrane, deux des autres facteurs définissant la capacitance d'une cellule. De plus, l'analyse de Sholl réalisée sur les MSN enregistrés montre que l'arborisation dendritique distale des MSN des souris Cntnap2 KO à 20w est plus dense que celles des souris WT du même âge. Cette augmentation de la densité de l'arborisation dendritique semble aller en parallèle de la tendance à l'augmentation de la fréquence des sIPSC observée lors des enregistrements *ex vivo*. De manière intéressante, l'analyse de Sholl des cellules de Purkinje des lobules crus I et II du cervelet a montré au contraire une diminution de la densité de l'arborisation dendritique distale chez des souris Cntnap2 KO à 10w, associée à une diminution globale de la taille des neurones (Fernández et al., 2021). Cependant, la littérature ne donne ici pas d'informations sur d'éventuelles altérations liées à l'âge. Par la suite, nous avons mesuré la densité des épines dendritiques des segments d'ordre 3, 4 et 5, représentant les segments dendritiques les plus distaux afin d'évaluer si l'augmentation de la complexité de l'arborisation distale des MSN et les changements fonctionnels serait liés à des modifications dans la densité de ces épines. Sur les dendrites de niveau 3, la densité globale des épines dendritique est augmentée chez les souris Cntnap2 KO à 20w par rapport aux souris WT et est également augmentée avec l'âge chez les souris KO. Cet effet de l'âge n'est en revanche pas retrouvé sur les dendrites de niveau 4 et 5. En effet, sur ces derniers, la densité globale des épines dendritiques est moins importante chez les souris KO dès 10w et cette différence est également observée à 20w. Ces résultats montrent que les segments les plus distaux sont affectés dès 10w tandis que les segments d'ordre 3 sont affectés plus tardivement. De manière intéressante, la densité des épines dendritiques des cellules de Purkinje des lobules crus I et II est diminuée dès 10w chez la souris Cntnap2 KO (Fernandes et al., 2019) et dès 6-8w au niveau des MSN dans le modèle

Shank3B$^{-/-}$ de TSA (Peça et al., 2011). Nos résultats suggèrent enfin que les atteintes au niveau des épines dendritiques progressent dans le sens distal – proximal avec le vieillissement chez la souris Cntnap2 KO. Afin de déterminer si les changements de densité d'épines dendritiques observés sont liés à des différences dans la maturité des épines, nous avons par la suite analysé leur morphologie. Les épines ont ainsi été classées en trois groupes sur la base de données morphologiques (Hering & Sheng, 2001; Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Sebastian et al., 2013) : « Thin » correspondant à des épines immatures, « Mushroom » correspondant à des épines matures siège de multiples contacts synaptiques et « Stubby » correspondant à des épines matures disposant de moins de contacts synaptiques. Nos résultats mettent ainsi en évidence que la plus grande densité d'épine dendritiques sur les segments de niveau 3 des MSN des souris Cntnap2 KO 20w est portée par une plus grande proportion d'épines matures Mushroom et Stubby à cet âge. Ceci suggère que les MSN des souris Cntnap2 KO reçoivent plus d'afférences que les MSN des souris WT à 20w. Sur les segments de niveau 5, la plus faible densité d'épines dendritiques mesurée sur les MSN des souris Cntnap2 KO 10w est vraisemblablement due à une plus faible densité d'épines immatures Thin et matures Mushroom, tandis qu'à 20w elle semble due à une plus faible densité d'épines matures Stubby. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les MSN des souris Cntnap2 KO subissent un défaut dans la maturation des épines dendritiques les plus distales.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les dysfonctions observées au niveau de la transmission GABAergique sur les MSN seraient dues à des dysfonction de leurs afférences, nous avons enregistré les IN PV, qui représentent la principale source de GABA sur les MSN (Kreitzer, 2009). De plus, des altérations fonctionnelles, cellulaire et moléculaires de cette sous-population d'IN ont été largement décrites dans différents modèles de TSA (Filice et al.,

2020) sans toutefois faire état de dysfonctions liées à l'âge. À ce stade, nos résultats semblent montrer que les IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO sont plus dépolarisés que ceux des souris WT à 20w et que ceux des souris KO à 10w. Cette dépolarisation des IN PV a également été décrite dans le cortex somatosensoriel des souris Cntnap2 KO à 6-8w (Vogt et al., 2018), sans toutefois décrire une variation du potentiel de membrane liée à l'âge. Ceci suggère que ces changements de potentiel de repos des IN PV interviennent à différentes périodes critiques selon la structure. En parallèle, le temps de repolarisation des potentiels d'actions des IN PV est plus important chez les souris Cntnap2 KO à 20w par rapport aux souris KO de 10 et 40w. Ceci suggère qu'en plus de l'excitabilité des IN PV, la cinétique des potentiels d'action est modifiée. Cette altérations portant sur la phase de repolarisation, l'une des hypothèses émises est que les canaux potassiques pourraient être altérés dans leur nombre, composition ou fonction et ainsi allonger le temps de repolarisation. En effet, une altération des interneurones PV du cortex par mutation de la parvalbumine conduit à des modifications des cinétiques de différents canaux potassiques auxquels la parvalbumine est classiquement associée (Chow et al., 1999; L. Zhang et al., 2020). De plus, cela soulève la question de l'expression de la parvalbumine dans les IN PV du striatum, qui a déjà été décrite comme étant diminuée chez la souris Cntnap2 KO âgée de 3-4w (Lauber et al., 2018). Enfin, les IN PV sont réputés ne pas avoir d'activité spontanée *ex vivo*, en raison de leur désynchronisation (Berke, 2011; Russo et al., 2013). Ici, nos résultats montrent que dès l'âge de 10w, 67% des IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO ont une activité spontanée, contre 0% des IN PV du DLS des souris WT. Avec l'âge, la part d'IN PV spontanément actifs passe à 100% chez les souris KO, et atteint 40% chez les souris WT à 40w. Ces résultats suggèrent que les IN PV sont hyperactifs dès le stade jeune adulte chez les souris Cntnap2 KO. Alors que l'activité évoquée des IN PV corticaux a été montrée comme étant réduite chez la souris Cntnap2 KO de 6-8w (Vogt et al., 2018), la

littérature ne fait pas état de modifications de l'activité spontanée des IN PV striataux. Ces travaux de thèse en apportent donc la première description.

Les IN PV semblant être hyperactifs et avec une activité spontanée désynchronisée, nous avons ensuite mesuré la réponse au niveau des MSN d'une activation optogénétique des IN PV à l'aide de souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ayant reçu une injection virale intrastriatale permettant de faire exprimer la channelrhodopsine dans les IN PV de manière spécifique. À ce stade, les premiers résultats obtenus semblent montrer que l'amplitude des réponses évoquées mesurées au niveau des MSN des souris Cntnap2 KO à 10w est inférieure à celle mesurée au niveau des MSN des souris Cntnap2 WT du même âge, avant d'augmenter entre 10 et 20w pour atteindre des valeurs semblables à celles des souris WT 20w. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'apparente hyperexcitabilité des IN PV qui se met en place à 20w, et le patron de décharge anormal des IN PV dès 10w. En effet, bien que les IN PV semblent anormalement actifs chez la souris Cntnap2 KO au stade jeune adulte, libérant en théorie davantage de GABA sur une période donnée, la répercussion au niveau des courants évoqués ne se traduit pas par une augmentation de l'amplitude mais par une diminution de celle-ci. Cette dernière pourrait alors être due à des mécanismes adaptatifs au niveau des MSN des souris Cntnap2 KO, ou à une plus faible quantité de GABA libérée à chaque potentiel d'action. Ces mécanismes restent à ce stade à élucider, notamment en mesurant la plasticité à court-terme de la synapse GABAergique IN PV – MSN.

Les résultats présentés ci-dessus semblent montrer que les IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO seraient dysfonctionnels dès l'âge de 10w, ces dysfonctions se traduisant tout d'abord par un patron de décharge anormal, et qui s'aggrave avec l'âge. De manière intéressante, les stéréotypies motrices s'aggravent aussi avec l'âge chez la souris Cntnap2 KO.

Ainsi, l'hypothèse soulevée est que les dysfonctions des IN PV du striatum sont, au moins en partie, responsable des stéréotypies motrices observées dans ce modèle de TSA. Afin de tester cette hypothèse, nous avons inhibé de façon chronique les IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO dès 10w à l'aide d'une approche chimiogénétique DREADD, en utilisant des souris doubles transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ayant reçu une injection virale permettant de faire exprimer le récepteur muté hM4D(Gi), ayant pour ligand le Clozapine-N-Oxide (CNO). Les résultats présentés ici montrent qu'une inhibition chronique des IN PV du DLS permet de réduire de manière significative les stéréotypies motrices chez les souris Cntnap2 KO en comparaison avec leur niveau initial. De plus, cette inactivation des IN PV du DLS permet de supprimer la différence de comportement observée entre les souris Cntnap2 WT et KO lors de la mesure initiale. Ces travaux apportent ainsi la première description de réversion du phénotype de stéréotypies motrices à la suite de l'inhibition des IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO. En parallèle, l'activation chronique des IN PV du DLS n'induit pas de stéréotypies motrices chez les souris Cntnap2 WT, et ne change pas le phénotype des souris Cntnap2 KO. Ceci suggère que les IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO ont une activité qui est maximale à leur niveau basal.

En conclusion, les données présentées dans ce projet montrent que le comportement stéréotypé s'aggrave avec l'âge chez les souris Cntnap2 KO, et s'accompagne d'atteintes striatales fonctionnelles et morphologiques qui interviennent à différentes périodes critiques selon la population de neurone considérée. Ainsi, les atteintes fonctionnelles des IN PV du DLS des souris Cntnap2 KO semblent se mettre en place dès 10w, et pourraient être l'une des causes des atteintes observées au niveau des MSN, qui apparaissent plus tard, à partir de 20w.

Cette chronologie supposée semble être confirmée par la réversion du phénotype autistique que sont les stéréotypies motrices grâce à l'inhibition chronique des IN PV.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Projet n°1 - Shank3		10w	20w	40w
Comportement		**Grooming KO > WT**		**KO : ↗ avec l'âge**
		Rearing KO > WT	**KO : ↘ avec l'âge**	
MSN	Propriétés passives et sIPSC	**WT : ↘ Tau entre 10w et 40w KO : ↘ Tau entre 20w et 40w**		
		-	**KO : ↗ nombre sIPSC de faible amplitude Fréquence sIPSC KO > WT**	**-**
	Arborisation	-	**KO : ↗ Densité arborisation distale vs WT**	-
	Épines dendritiques		**WT : Niveaux 3/4/5 ↘ densité épines avec l'âge**	**Densité niveaux 4/5 KO < WT WT : Niveaux 4/5 ↗ densité épines entre 20w et 40w KO : Niveaux 3/4/5 : ↘ densité avec l'âge**
PV		*N/D*		

Projet n°2 - Cntnap2		10w	20w	40w
Comportement		**Grooming KO > WT** Rearing KO = WT	**Grooming KO : ↗ avec l'âge** **Rearing WT et KO : ↗ avec l'âge**	
MSN	Propriétés passives et sIPSC	-	**WT : ↘ Capacitance avec âge**	*Lot d'animaux début septembre*
			KO : Tendance ↗ nombre sIPSC de faible amplitude	
	Soma et arborisation	**WT et KO : ↘ Volume soma avec l'âge**		
		-	**KO : ↗ Densité arborisation distale vs WT**	
	Épines dendritiques	**Niveau 5 : Densité épines KO > WT**	**Niveau 3 : Densité épines KO > WT Niveau 5 : Densité épines KO > WT**	
		KO niveau 3 : ↗ Densité épines avec l'âge		
PV	Excitabilité et activité spontanée	-	**Potentiel de repos KO < WT**	-
		KO : ↘ potentiel de repos entre 10w et 20w et ↗ entre 20w et 40w WT : ↘ potentiel de repos entre 10w et 40w		
		KO : ↗ temps de repolarisation entre 10w et 20w et↘ entre 20w et 40w		
		-		**Seuil de décharge KO > WT**
		WT : 0% IN PV actif spontanément KO : 67% IN PV actifs spontanément	WT : 0% IN PV actif spontanément KO : 100% IN PV actifs spontanément	WT : 40% IN PV actif spontanément KO : 100% IN PV actifs spontanément
	Communication IN PV - MSN (optogénétique)	Tendance Amplitude courant évoqué KO<WT	-	
	Inhibition IN PV (Dreadd)	**KO : ↘ stéréotypies motrices Grooming KO = WT**	*N/D*	
	Activation IN PV (Dreadd)	Pas d'amélioration / aggravation des stéréotypies après CNO	*N/D*	

Tableau 3 : Tables récapitulatives des résultats
Le tableau du haut résume les résultats obtenus dans le projet n°1 et celui du bas les résultats du projet n°2. Les données marquées en gras dans les tableaux représentent les différences significatives observées entre les groupes mentionnés. La mention «-» indique qu'aucune différence n'a été observée entre les différents groupes pour le paramètre concerné. La mention N/D indique que les données ne sont pas disponibles à ce moment.

Mécanismes communs et spécifiques aux deux modèles

Les TSA sont un ensemble de troubles psychiatriques neurodéveloppementaux dont les premiers symptômes apparaissent à l'enfance et se maintiennent à l'âge adulte. Chez l'Homme, les TSA peuvent prendre un grand nombre de formes différentes, tout en partageant une même définition clinique, comprenant symptômes cognitifs, associatifs et moteurs, dont les stéréotypies motrices (American Psychiatric Association, 2013). Alors que l'étude des déficits sociaux, de communication ou autres symptômes cognitifs est soumise à une interprétation subjective (Nestler & Hyman, 2010), l'étude des stéréotypies motrices ne l'est pas. Cette caractéristique en fait un symptôme robuste, propice à son étude dans différents modèles animaux (Nestler & Hyman, 2010). Ainsi, ces dernière décennies, la présence de stéréotypies motrices a été décrite dans un très grand nombre de modèles animaux (pour revue : (Varghese et al., 2017)), y compris la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (Matas et al., 2021) et la souris Cntnap2 KO (Peñagarikano et al., 2011).

Cependant, la plupart des études réalisées sur ces modèles animaux se focalisent sur l'aspect développemental et utilisent des animaux juvéniles ou jeunes adultes, mais n'apportent pas ou peu d'informations sur les effets du vieillissement sur le phénotype de ces souris. Ainsi, à ce jour, les seules informations disponibles sur des animaux âgés dans ces modèles sont la présence de stéréotypies motrices à 40w chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ (Kouser et al., 2013) ou encore la survenue de crises d'épilepsie chez la souris Cntnap2 KO à 30w (Peñagarikano et al., 2011). Ces travaux de thèse portent donc d'une part sur la caractérisation des effets du vieillissement sur les stéréotypies motrices dans les modèles murins Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$

et Cntnap2 KO de TSA, ainsi que d'autre part sur l'étude des modifications fonctionnelles et cellulaires dans le striatum dorsolatéral de ces souris.

Dans un premier temps, nos résultats apportent la première description de la présence de stéréotypies motrices chez la souris Cntnap2 KO âgée de 20w et de 40w (Tableau 2). De plus, ces travaux décrivent pour la première fois une aggravation des stéréotypies motrices dès 20w, liée au vieillissement, ainsi que leur chronologie chez les souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2 KO. Il est important de noter que chez l'Homme, les symptômes des TSA, incluant les stéréotypies, s'aggravent également avec l'âge chez certains patients (Croen et al., 2015; Jokiranta-Olkoniemi et al., 2021; Noone et al., 2006), notamment ceux ne bénéficiant pas de prise en charge adaptée, les thérapies cognitivo-comportementales permettant de diminuer la sévérité des symptômes (Speyer et al., 2021; Zeng et al., 2021). Toutefois, l'utilisation d'environnement enrichi chez dans différents modèles murins de TSA n'a pas permis de diminuer la sévérité des stéréotypies motrices (pour revue : (Ball et al., 2019)). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'aggravation des stéréotypies motrices avec le vieillissement est une caractéristique commune aux souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2 KO, reposant sur des bases biologiques similaires.

L'analyse des résultats des enregistrements *ex vivo* des MSN du DLS vient renforcer cette hypothèse. En effet, nos résultats apportent pour la première fois la description de dysfonctions de la transmission GABAergique striatale liées à l'âge chez les souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2 KO (Tableau 2). Toutefois, la nature de ces dysfonctions semble légèrement différente : chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ nos résultats montrent une diminution de la constante de temps Tau entre 20w et 40w, ainsi qu'une plus grande fréquence des sIPSC à 20w en comparaison avec les souris Shank3 WT, alors que chez la souris Cntnap2 KO, la capacitance

des MSN est diminuée entre 10w et 20w, accompagnée d'une tendance à l'augmentation du nombre des sIPSC de faible amplitude. Ces différences dans la nature des perturbation de la transmission GABAergique entre les deux modèles semblent constituer des spécificités de chacun d'entre eux, qui peuvent provenir de la nature même des gènes mutés. Ainsi, la mutation du gène Cntnap2 entraine l'absence de la protéine CASPR2, qui est une protéine transmembranaire de la famille des neurexines Elle est retrouvée sur la membrane pré-synaptique où elle joue un rôle dans la mise en place et le maintien des synapses (pour revue : (Rodenas-Cuadrado et al., 2014; Saint-Martin et al., 2018), et dans la régulation du trafic et de l'activité des récepteurs glutamatergiques AMPA (Fernandes et al., 2019) ainsi qu'au niveau des nœuds de Ranvier des axones myélinisés où elle permet l'organisation membranaire des canaux potassique Kir au niveau central (Scott et al., 2019) et périphérique (Poliak et al., 1999). Au contraire, la protéine SHANK3 est retrouvée au niveau post-synaptique, dans le compartiment sous-membranaire où elle se lie à d'autres protéines comme PSD95 (« Post Synaptic Density 95 ») et SAPAP (« Synapse Associated Protein 90/Post Density 95 Associated Protein ») pour jouer le rôle de protéine d'échafaudage et ainsi réguler l'assemblage macromoléculaire nécessaire au maintien des synapses glutamatergiques (Peça et al., 2011; Takeuchi et al., 1997). Ces différences de nature, de localisation et de fonctions peuvent donc expliquer, au moins en partie la nature différente des dysfonctions de la transmission GABAergique striatale observées. De la même façon, ces différences de construction des modèles permet d'expliquer les atteintes différentes de la densité et de la morphologie des épines dendritiques chez les souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2 KO. En effet, les analyses de la densité d'épines dendritique semble montrer que les souris Cntnap2 KO disposent d'une plus grande densité d'épines au niveau des dendrites les plus distales dès 10w en comparaison

avec les souris WT, alors que la densité d'épines dendritiques sur les segments les plus distaux est diminuée à 40w chez les souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$.

De plus, les dysfonctions mesurées au niveau des MSN dans ces deux modèles ont également pour caractéristique commune d'intervenir dans une fenêtre de temps postérieure à l'apparition des stéréotypies motrices. Cette chronologie est d'ailleurs confirmée par l'étude de la morphologie des MSN qui montre que dans les deux modèles, l'arborisation dendritique des MSN des souris KO est plus dense au niveau distal que celle des souris WT à 20w s'accompagnant chez la souris Cntnap2 KO d'une diminution du volume du soma des MSN (Tableau 2). De manière intéressante, des résultats similaires ont été mis en évidence dans d'autres modèles murins de TSA comme la souris Shank3B$^{-/-}$ à 5w (Peça et al., 2011). Ajouté au fait que les stéréotypies motrices s'aggravent à 20w, et que les dysfonctions de la transmission GABAergique au niveau des MSN apparait à cette période, l'âge de 20w semble représenter une période critique dans l'évolution de la physiopathologie des TSA dans ces modèles. Toutefois, l'absence d'étude des effets du vieillissement sur d'autre modèles ne nous permet pas d'exclure qu'il s'agisse d'une caractéristique partagée de manière plus étendue.

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus dans les deux modèles murins nous ont permis d'identifier des points de convergence et divergence des mécanismes pathologiques mis en place au sein du DLS lors du vieillissement dans un contexte autistique. De plus, nos résultats apportent la première description temporelle des atteintes GABAergiques striatales dans les modèles Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2 KO, venant compléter la seule disponible à ce jour qui concerne le modèle murin Fmr$^{-/-}$ (Centonze et al., 2008).

Altérations des IN PV striataux chez la souris Cntnap2 KO

Ces travaux de thèse montrent l'apparition d'altérations fonctionnelles et cellulaires au niveau des MSN en lien avec le vieillissement, qui semblent sous-tendre l'aggravation des stéréotypies avec l'âge dans les deux modèles. Cependant, la chronologie de la mise en place de ces altérations des MSN ne permet pas d'expliquer la présence de stéréotypies motrices dès l'âge de 10w (Tableau 2). L'une des hypothèses permettant d'expliquer ces phénomènes est que les MSN seraient atteints au stade 20w en conséquence d'autres dysfonctions striatales. Nous proposons ici que les IN PV seraient atteints plus précocement, et que leurs dysfonctions viendraient perturber l'équilibre homéostatique du DLS, menant à l'apparition de stéréotypies motrices.

L'origine embryonnaire et l'âge de maturation des MSN et des IN PV striataux est différente. Ainsi, chez la souris, les premiers proviennent de l'éminence ganglionnaire latérale (EGL), migrent dans le striatum entre le jour embryonnaire 9 et 11 (E9-E11) et sont matures à environ E14 (Fjodorova et al., 2015), tandis que les IN PV proviennent de l'éminence ganglionnaire médiale (EGM), migrent dans le striatum entre E15 et E16, mais ne deviennent mature que pendant la période post-natale (Marín et al., 2000; Sadikot & Sasseville, 1997). De plus, les IN PV du cortex proviennent eux aussi de l'EMG (Fjodorova et al., 2015) et sont également altérés chez la souris Cntnap2 KO dès P14 (Peñagarikano et al., 2011). Des altérations biochimiques de des IN PV striataux ont également été décrits dès le stade juvénile dans de nombreux modèles (pour revue : (Filice et al., 2020)). De manière intéressante, les souris mutées pour le gène codant pour la parvalbumine (souris $PV^{-/-}$) présentent un comportement stéréotypé et des symptômes caractéristiques des TSA dès l'âge de 3-5w

(Wöhr et al., 2015). Nous proposons alors que des troubles du neurodéveloppement dans ces modèles puissent concerner en premier lieu les IN PV issus de l'EGM, qui au cours du vieillissement provoquent des altérations au niveau de leur cible striatale, les MSN.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons enregistré dès 10w les IN PV et la réponse des MSN à la suite de leur stimulation, à l'aide de souris doubles-transgéniques PV-Cre x Cntnap2 ayant reçu une injection virale intrastriatale permettant de faire exprimer l'EYFP ou la ChR2 dans les IN PV spécifiquement. Les IN PV semblent ainsi avoir un patron de décharge anormal dès 10w, se traduisant par ce qui semble être une diminution de la réponse des MSN à leur stimulation (Tableau 2). Ces dysfonctions des IN PV peuvent ainsi mener aux altérations fonctionnelles mesurées au niveau des MSN. De plus, les IN PV semblent devenir hyperexcitables avec l'âge, en conséquence de leur activité anormale. Ces résultats semblent donc aller en faveur de l'hypothèse d'une atteinte précoce des IN PV par rapport aux MSN.

Enfin, afin de tester l'hypothèse selon laquelle les dysfonctions des IN PV seraient à l'origine de l'apparition des stéréotypies motrices, nous avons mesuré ces dernières à la suite d'une modulation de l'activité des IN PV. Nos résultats précédents semblant indiquer qu'ils sont hyperactifs chez la souris Cntnap2 KO dès 10w, nous avons inhibé par une approche chimiogénétique l'activité des IN PV chez les souris PV-Cre x Cntnap2 KO. Nos résultats montrent que ces souris ne présentent plus de stéréotypies motrices à l'issue du traitement de 21 jours au CNO. Ces résultats indiquent donc que l'inhibition des IN PV est suffisante pour supprimer les stéréotypies motrices chez les souris Cntnap2 KO à 10w, et viennent ainsi renforcer l'hypothèse du lien de causalité entre dysfonction des IN PV et stéréotypies motrices. De manière intéressante, l'activation chronique des IN PV ne semble pas aggraver

ni restaurer le phénotypes des souris Cntnap2 KO, renforçant ainsi l'hypothèse d'une activité pathologiquement maximale des IN PV à 10w.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter la première description de l'aggravation d'un symptôme caractéristique des TSA que sont les stéréotypies motrices ainsi que l'apparition d'altérations de la transmission GABAergique striatale au cours du vieillissement chez la souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$ et Cntnap2 KO. Les résultats présentés dans ces travaux de thèse mettent en évidence un certain nombre d'altérations fonctionnelles et cellulaires qui apparaissent avec le vieillissement, suggérant que les symptômes, leur nombre et leur gravité ne sont pas établis de façon immuables à la naissance mais peuvent apparaitre ou s'aggraver tout au long de la vie du patient.

Les résultats obtenus dans l'étude du modèle Cntnap2 KO nous permettent également de décrire une chronologie des dysfonctions liées au striatum dorsal dans ce modèle. Nous proposons ainsi que les IN PV sont dysfonctionnels de manière précoce, menant à la présence de stéréotypies motrices. Ces dysfonctions s'aggravant avec l'âge, les populations neuronales cibles de ces IN PV comme les MSN subissent alors des dysfonctions plus tardivement dans le vieillissement, la combinaison de ces facteurs état alors supposément à l'origine de l'aggravation observée des stéréotypies motrices au cours du vieillissement.

De plus, ces travaux de thèse ont permis d'identifier des points de convergence et des spécificités propres à chaque modèle utilisé, ouvrant ainsi la voie à une cartographie des mécanismes pathologiques communs et spécifiques aux différents modèles. L'étude comparée de plusieurs modèles revêt une importance toute particulière pour améliorer la compréhension des mécanismes pathologiques qui sous-tendent les symptômes des TSA, et ainsi permettre d'identifier des cibles thérapeutiques communes à différentes formes de TSA.

Enfin, l'ensemble de ces travaux s'inscrivent dans un projet plus vaste, visant à permettre de définir une fenêtre thérapeutique entre les atteintes liées aux troubles du

neurodéveloppement et les atteintes secondaires liées à l'âge. D'une part, définir une telle période critique dans l'évolution de la pathologie revêt un intérêt de santé publique, afin de définir l'évolution des symptômes avec l'âge en vue d'en adapter les traitements. D'autre part, il est important de multiplier les connaissances sur l'évolution de la pathologie pour donner un nouvel élan à la recherche de cibles thérapeutiques afin de pouvoir un jour proposer une prise en charge adaptée à chaque patient, prenant en compte les spécificités liées à son âge.

Afin d'affiner la compréhension des mécanismes pathologiques qui affectent les IN PV et apporter de nouvelles connaissances sur leur état pathologique au stade jeune adulte, ces travaux de thèse vont se poursuivre par l'étude du transcriptome complet des IN PV par séquençage de l'ARN chez la souris Cntnap2 KO à 10w. Cette étude nous permettra d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents aux dysfunctions déjà mises en évidence. De plus, alors que nous avons montré que l'inhibition des IN PV permet de restaurer le phénotype de stéréotypies motrices des souris Cntnap2 KO à 10w, il est intéressant d'étudier les effets de cette modification de l'activité des IN PV à 20w et 40w, afin de déterminer l'implication de ces IN PV dans la physiopathologie des TSA au cours du vieillissement. Enfin, alors que les thérapies cognitivo-comportementales ont permis de mettre en évidence une amélioration de certains symptômes chez les patients, il est important de déterminer si des stimulations cognitives, comme un environnement enrichi, permettraient d'éviter l'aggravation des symptômes observée dans les modèles murins impliqués dans notre étude.

ANNEXES

Annexe 1 : Cerebellar and striatal implications in autism spectrum disorders: from clinical observations to animal models

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Review

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

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

[1] Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Poitiers, 86073 Poitiers, France; mathieu.thabault@univ-poitiers.fr (M.T.); valentine.turpin@univ-poitiers.fr (V.T.); alexandre.maisterrena@univ-poitiers.fr (A.M.); mohamed.jaber@univ-poitiers.fr (M.J.); matthieu.egloff@univ-poitiers.fr (M.E.)

[2] Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86021 Poitiers, France

* Correspondence: laurie.galvan@univ-poitiers.fr

† These authors contributed equally to this work.

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

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

check for updates

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

Academic Editors: Masaru Tanaka and Lydia Giménez-Llort

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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

Table 1. *Cont.*

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

Table 1. *Cont.*

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

2. Cerebellar Involvement in ASD

2.1. Structure and Function of the Cerebellum

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

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

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

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

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

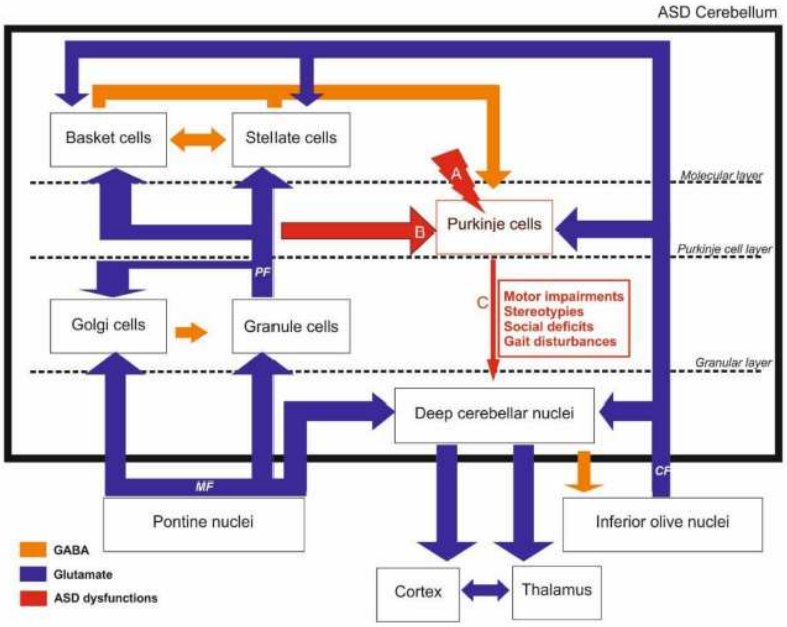


Figure 1. The cerebellum is involved in both motor and social impairments reported in ASD. Dysfunctional Purkinje cells (PC) seem to be at the center of these impairments as they represent the sole output of the cerebellum and receive inputs from both inhibitory and excitatory cells. PC dysfunctions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

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

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

2.2. Anatomical Evidence of Cerebellar Involvement in ASD

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

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

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

N/A: not applicable.

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

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

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

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

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

2.3. Cellular Correlates

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

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

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

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

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

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

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

2.4. Neurotransmission Systems Implicated

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

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

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

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

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

2.5. Evidence from Our Previous Work

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

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

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

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

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

3. Striatal Involvement in ASD

3.1. Anatomical Evidence of Striatal Involvement in ASD

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

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

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

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

3.2. Cellular Consequences Correlates

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

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

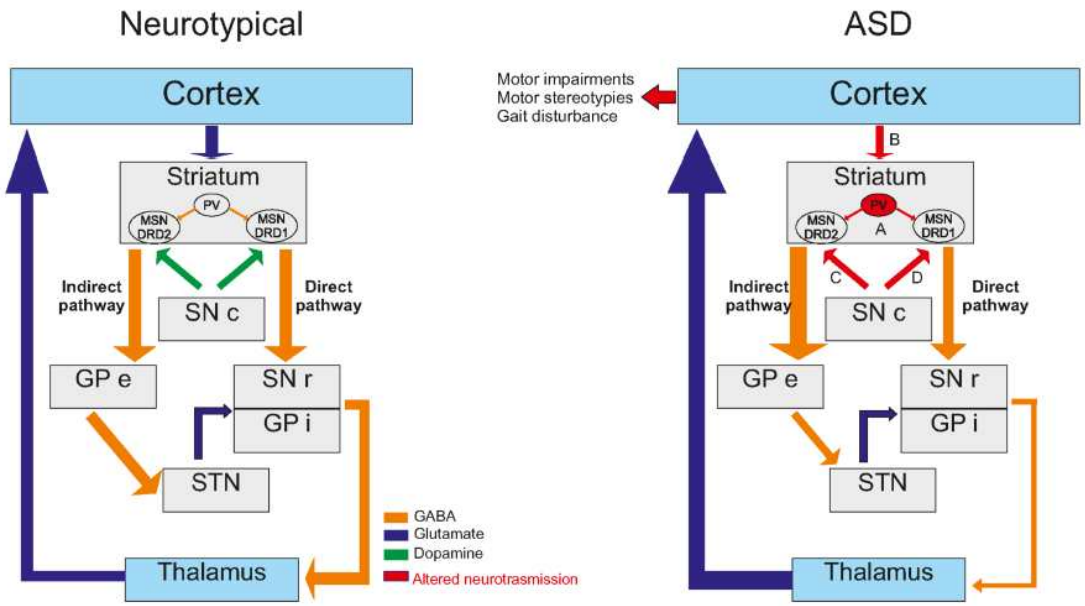


Figure 2. Basal ganglia modifications in ASD. Basal ganglia network is shown to be deeply affected in ASD models. The main alterations are found at 4 points of interest (A,B,C,D). Striatal local inhibition mediated by PV interneurons. (A) is altered in some ASD models like Shank1$^{-/-}$ and Shank3B$^{-/-}$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

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

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

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

3.3. Neurotransmission Systems Implicated

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

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

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

N/A: not applicable.

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

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

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

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

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

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

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

4. Epigenetic Alterations in the Brain of ASD Animal Models

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

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

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

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

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

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

5. Conclusions and Future Direction

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

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

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

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

Annexe 2 : Effets du sexe sur les stéréotypies motrices chez les souris Shank3$^{\Delta C/\Delta C}$

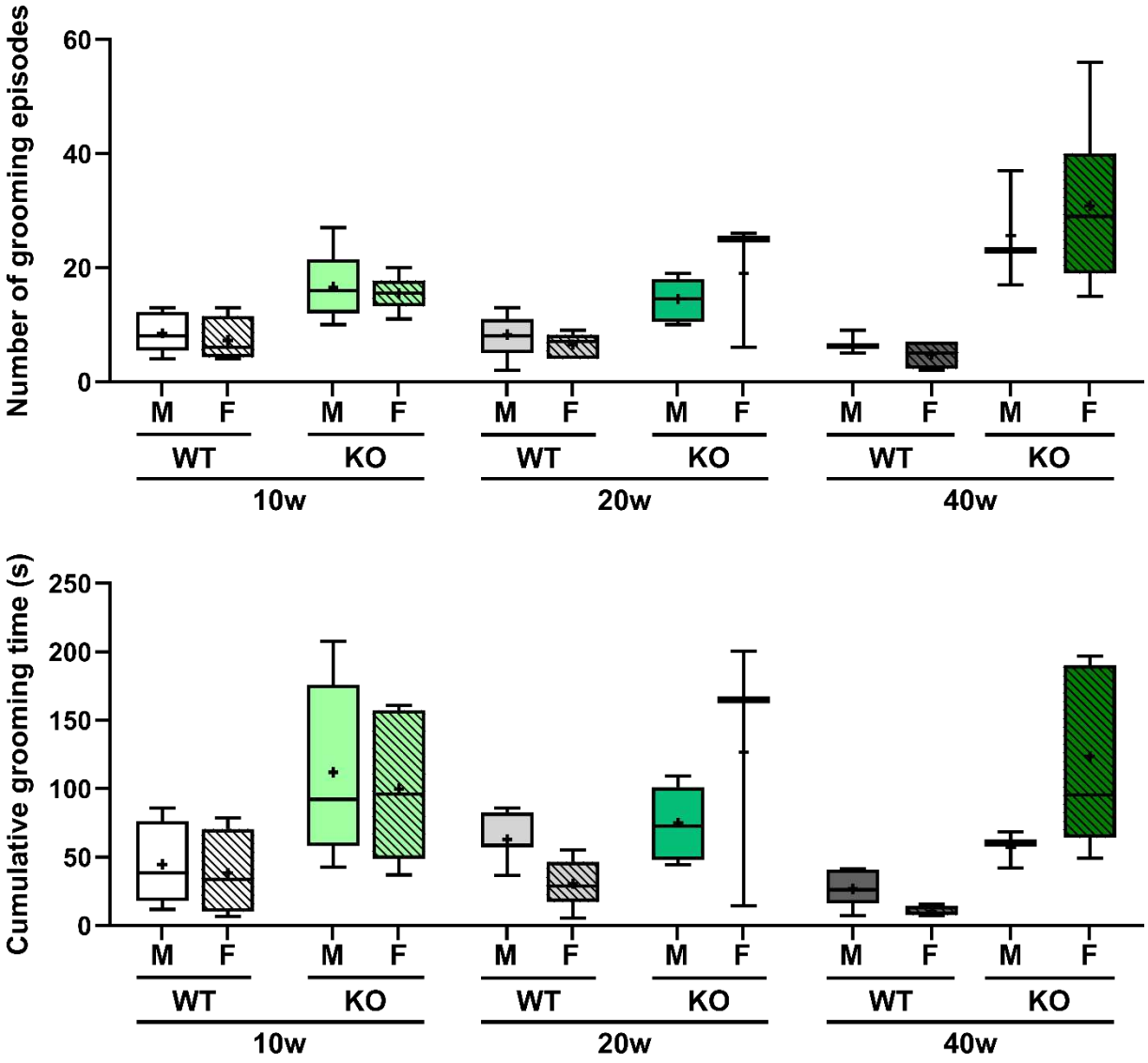


Figure 19 : Le comportement de grooming n'est pas affecté par le sexe des souris Shank3 WT ou KO Two-way ANOVA par âge, Tukey post-hoc. Nombre d'animaux : N=6 M WT 10w, N= 4 F WT 10w, N=5 M KO 10w, N=6 F KO 10w, N=7 M WT 20w, N=6 F WT 20w, N=8 M KO 20w, N=3 F KO 20w, N=6 M WT 40w, N=4 F WT 40w, N=3 M KO 40w, N=7 F KO 40w.

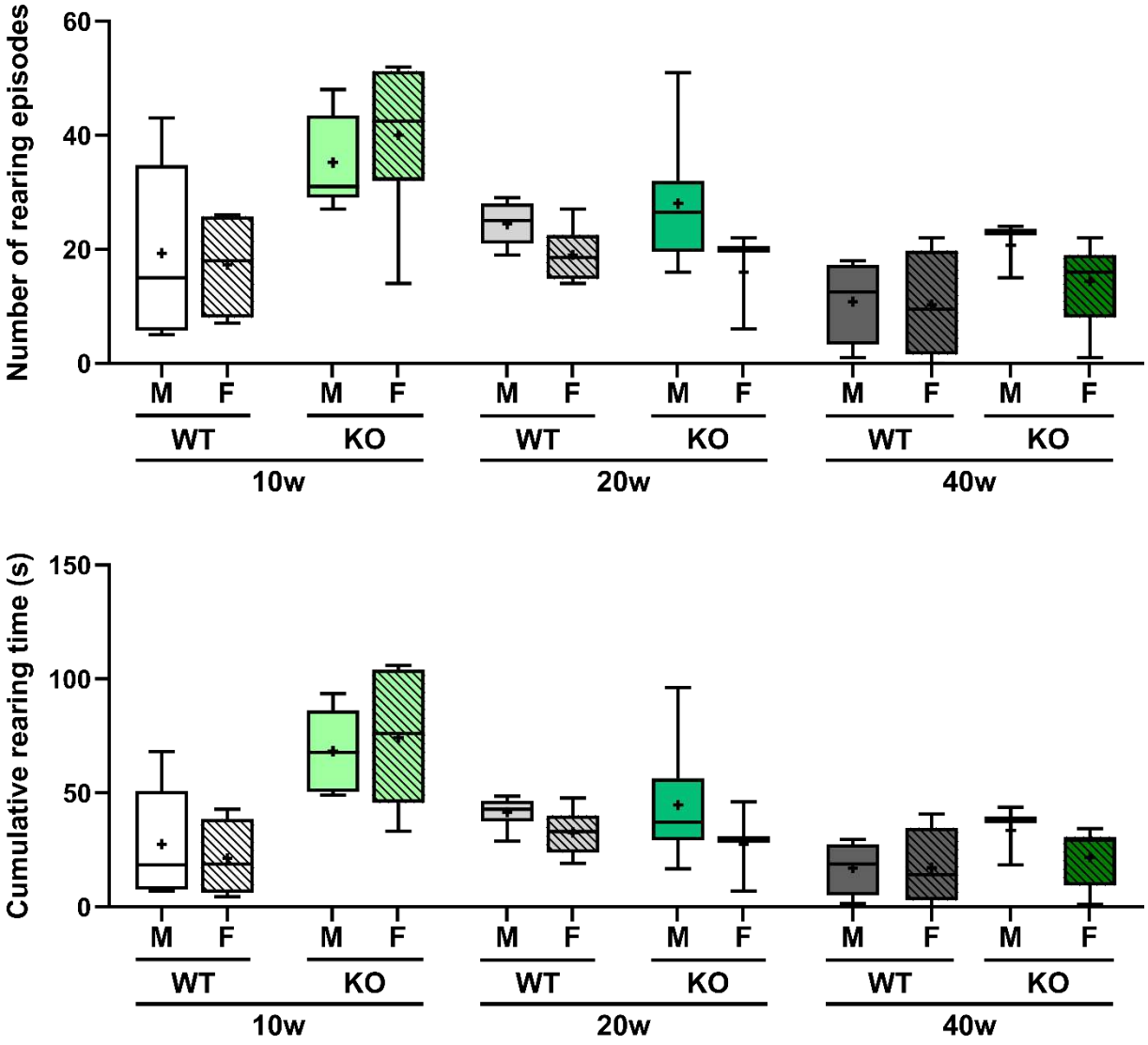


Figure 20 : Le comportement de rearing n'est pas affecté par le sexe des souris Shank3 WT ou KO Two-way ANOVA par âge, Tukey post-hoc. Nombre d'animaux : N=6 M WT 10w, N= 4 F WT 10w, N=5 M KO 10w, N=6 F KO 10w, N=7 M WT 20w, N=6 F WT 20w, N=8 M KO 20w, N=3 F KO 20w, N=6 M WT 40w, N=4 F WT 40w, N=3 M KO 40w, N=7 F KO 40w.

Annexe 3 : Effets du sexe sur les stéréotypies motrices des souris Cntnap2 KO

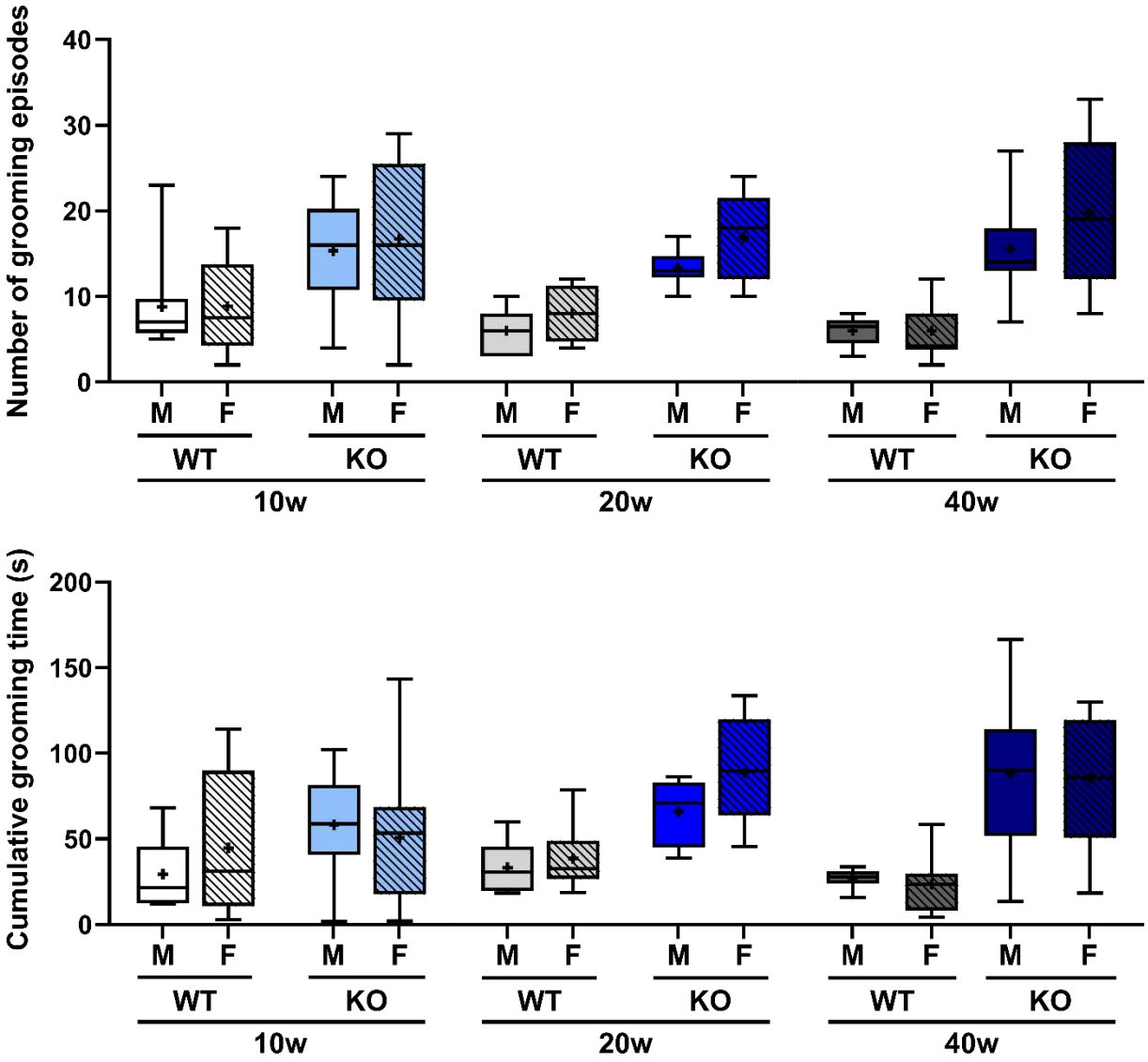


Figure 21 : Le comportement de grooming n'est pas affecté par le sexe des souris Cntnap2 WT ou KO Two-way ANOVA par âge, Tukey post-hoc. Nombre d'animaux : N=10 M WT 10w, N=8 F WT 10w, N=6 M KO 10w, N=10 F KO 10w, N=7 M WT 20w, N=6 F WT 20w, N=6 M KO 20w, N=9 F KO 20w, N=6 M WT 40w, N=7 F WT 40w, N=7 M KO 40w, N=5 F KO 40w.

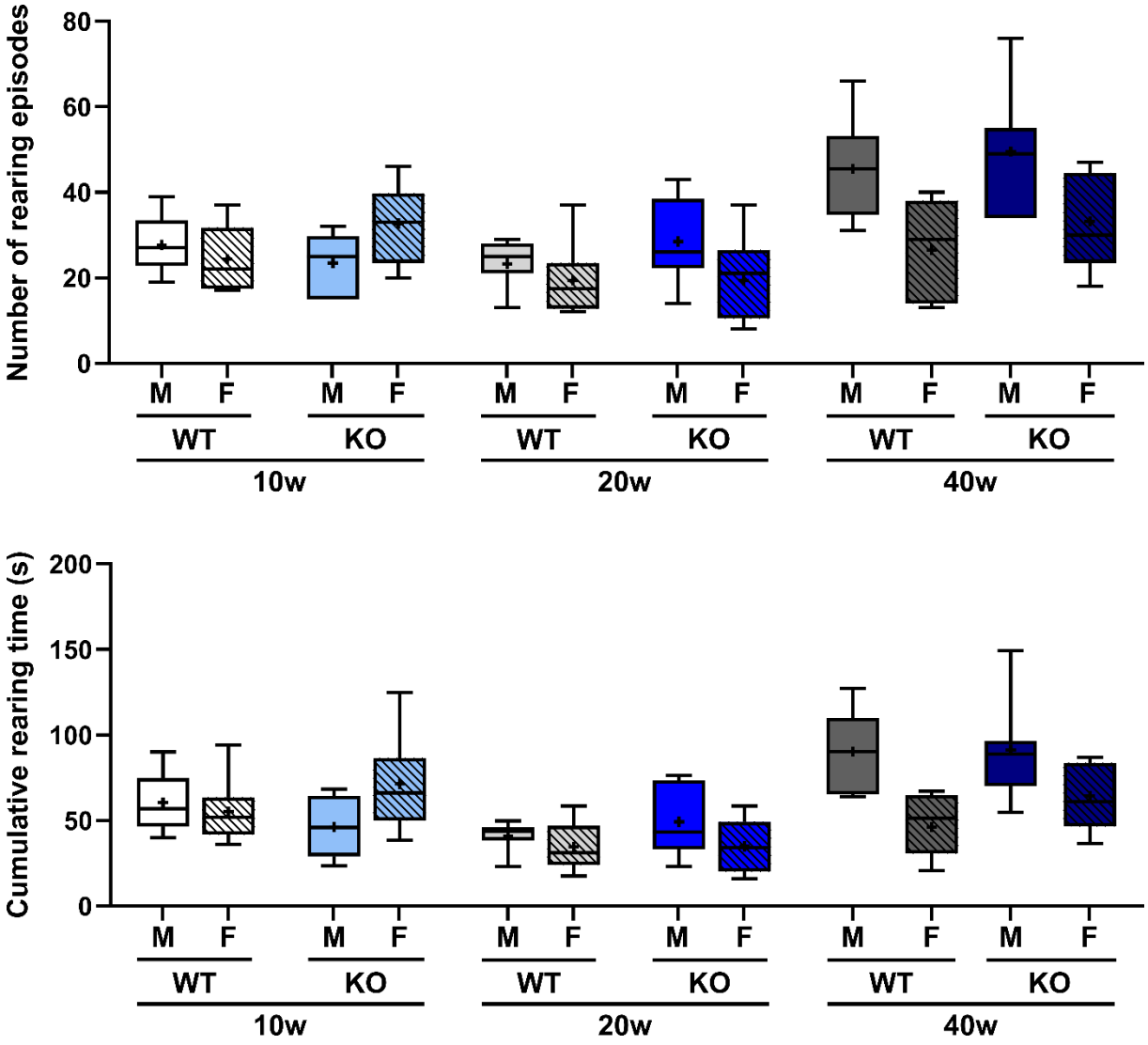


Figure 22 : Le comportement de Rearing n'est pas affecté par le sexe des souris Cntnap2 WT ou KO Two-way ANOVA par âge, Tukey post-hoc. Nombre d'animaux : N=10 M WT 10w, N=8 F WT 10w, N=6 M KO 10w, N=10 F KO 10w, N=7 M WT 20w, N=6 F WT 20w, N=6 M KO 20w, N=9 F KO 20w, N=6 M WT 40w, N=7 F WT 40w, N=7 M KO 40w, N=5 F KO 40w.

RÉFÉRENCES

A

Abudukeyoumu, N., Hernandez-Flores, T., Garcia-Munoz, M., & Arbuthnott, G. W. (2019). Cholinergic modulation of striatal microcircuits. European Journal of Neuroscience, 49(5), 604–622. https://doi.org/10.1111/ejn.13949

al Sagheer, T., Haida, O., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Fernagut, P. O., & Jaber, M. (2018). Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. International Journal of Neuropsychopharmacology, 21(9), 871–882. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy043

Alexander, G. E., Ryan, L., Bowers, D., Foster, T. C., Bizon, J. L., Geldmacher, D. S., & Glisky, E. L. (2012). Characterizing cognitive aging in humans with links to animal models. Frontiers in Aging Neuroscience, 4(SEP). https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00021

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

Arif, S. H. (2009). A Ca2+-binding protein with numerous roles and uses: Parvalbumin in molecular biology and physiology. In BioEssays (Vol. 31, Issue 4, pp. 410–421). https://doi.org/10.1002/bies.200800170

Aylward, E. H., Schwartz, J., Machlin, S., & Pearl, G. (1991). Bicaudate Ratio as a Measure of Caudate Volume on MR Images AJNR 1991; 12:1217-1222. American Journal of Neuroradiology, 12, 18–22.

B

Báez-Mendoza, R., & Schultz, W. (2013). The role of the striatum in social behavior. In Frontiers in Neuroscience (Issue 7 DEC). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00233

Ball, N. J., Mercado, E., & Orduña, I. (2019). Enriched environments as a potential treatment for developmental disorders: A critical assessment. In Frontiers in Psychology (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00466

Baranauskas, G., Tkatch, T., Nagata, K., Yeh, J. Z., & Surmeier, D. J. (2003). Kv3.4 subunits enhance the repolarizing efficiency of Kv3.1 channels in fast-spiking neurons. *Nature Neuroscience*, *6*(3), 258–266. https://doi.org/10.1038/nn1019

Bargas, J., Ayala, G. X., Vilchis, C., Pineda, J. C., & Galarraga, E. (1998). Ca 2+-Activated outward currents in neostriatal neurons.

Berke, J. D. (2011). Functional properties of striatal fast-spiking interneurons. Frontiers in Sistems Neuroscience, 5. https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00045

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

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

Blundell, J., Blaiss, C. A., Etherton, M. R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., Bolliger, M. F., Südhof, T. C., & Powell, C. M. (2010). Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. Journal of Neuroscience, 30(6), 2115–2129. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4517-09.2010

Bridi, M. S., Park, S. M., & Huang, S. (2017). Developmental disruption of GABAAR-meditated inhibition in Cntnap2 KO mice. ENeuro, 4(5), 1–14. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0162-17.2017

Brimblecombe, K. R., & Cragg, S. J. (2017). The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. In ACS Chemical Neuroscience (Vol. 8, Issue 2, pp. 235–242). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00333

C

Calì, C., Wawrzyniak, M., Becker, C., Maco, B., Cantoni, M., Jorstad, A., Nigro, B., Grillo, F., de Paola, V., Fua, P., & Knott, G. W. (2018). The effects of aging on neuropil structure in mouse somatosensory cortex—A 3D electron microscopy analysis of layer 1. PLoS ONE, 13(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198131

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

Chartove, J. A. K., McCarthy, M. M., Pittman-Polletta, B. R., & Kopell, N. J. (2020). A biophysical model of striatal microcircuits suggests delta/theta-rhythmically interleaved gamma and beta oscillations mediate periodicity in motor control. PLoS Computational Biology, 16(2). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007300

Chow, A., Erisir, A., Farb, C., Nadal, M. S., Ozaita, A., Lau, D., Welker, E., & Rudy, B. (1999). K Channel Expression Distinguishes Subpopulations of Parvalbumin-and Somatostatin-Containing Neocortical Interneurons.

Cox, J., & Witten, I. B. (2019). Striatal circuits for reward learning and decision-making. In Nature Reviews Neuroscience (Vol. 20, Issue 8, pp. 482–494). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0189-2

Creasey, H., Rumsey, J. M., Schwartz, M., Duara, R., Rapoport, J. L., & Rapoport, S. I. (1986). Brain Morphometry in Autistic Men as Measured by Volumetric Computed Tomography. Archives of Neurology, 43(7), 669–672. https://doi.org/10.1001/archneur.1986.00520070027012

Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., van Praag, H., & Bussey, T. J. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(5), 2367–2372. https://doi.org/10.1073/pnas.0911725107

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

D

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

Du, A. T., Schuff, N., Chao, L. L., Kornak, J., Jagust, W. J., Kramer, J. H., Reed, B. R., Miller, B. L., Norman, D., Chui, H. C., & Weiner, M. W. (2006). Age effects on atrophy rates of entorhinal cortex and hippocampus. Neurobiology of Aging, 27(5), 733–740. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.021

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

Dumurgier, J., Crivello, F., Mazoyer, B., Ahmed, I., Tavernier, B., Grabli, D., François, C., Tzourio-Mazoyer, N., Tzourio, C., & Elbaz, A. (2012). MRI atrophy of the caudate nucleus and slower walking speed in the elderly. NeuroImage, 60(2), 871–878. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.01.102

E

Eckert, M. A., Cute, S. L., Vaden, K. I., Kuchinsky, S. E., & Dubno, J. R. (2012). Auditory cortex signs of age-related hearing loss. JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 13(5), 703–713. https://doi.org/10.1007/s10162-012-0332-5

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

English, D. F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., Deisseroth, K., Tepper, J. M., & Koos, T. (2012). GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. Nature Neuroscience, 15(1), 123–130. https://doi.org/10.1038/nn.2984

Ernst, M., Brauchart, D., Boresch, S., & Sieghart, W. (2003). Comparative modeling of GABAA receptors: Limits, insights, future developments. Neuroscience, 119(4), 933–943. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00288-4

Evenseth, L. S. M., Gabrielsen, M., & Sylte, I. (2020). The GABAB Receptor—Structure, Ligand Binding and Drug Development. In Molecules (Vol. 25, Issue 13). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules25133093

F

Fernandes, D., Santos, S. D., Coutinho, E., Whitt, J. L., Beltrão, N., Rondão, T., Leite, M. I., Buckley, C., Lee, H. K., & Carvalho, A. L. (2019). Disrupted AMPA Receptor Function upon Genetic-or Antibody-Mediated Loss of Autism-Associated CASPR2. Cerebral Cortex, 29(12), 4919–4931. https://doi.org/10.1093/cercor/bhz032

Fernández, M., Sánchez-León, C. A., Llorente, J., Sierra-Arregui, T., Knafo, S., Márquez-Ruiz, J., & Peñagarikano, O. (2021). Altered cerebellar response to somatosensory stimuli in the Cntnap2 mouse model of autism. ENeuro, 8(5), 1–9. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0333-21.2021

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

Filice, F., Vörckel, K. J., Sungur, A. Ö., Wöhr, M., & Schwaller, B. (2016). Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. Molecular Brain, 9(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s13041-016-0192-8

Fjell, A. M., Westlye, L. T., Grydeland, H., Amlien, I., Espeseth, T., Reinvang, I., Raz, N., Holland, D., Dale, A. M., & Walhovd, K. B. (2013). Critical ages in the life course of the adult brain: Nonlinear subcortical aging. Neurobiology of Aging, 34(10), 2239–2247. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.006

Fjodorova, M., Noakes, Z., & Li, M. (2015). How to make striatal projection neurons. In Neurogenesis (Vol. 2, Issue 1). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/23262133.2015.1100227

Francavilla, R., Guet-McCreight, A., Amalyan, S., Hui, C. W., Topolnik, D., Michaud, F., Marino, B., Tremblay, M. È., Skinner, F. K., & Topolnik, L. (2020). Alterations in Intrinsic and Synaptic Properties of Hippocampal CA1 VIP Interneurons During Aging. Frontiers in Cellular Neuroscience, 14. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.554405

Fuccillo, M. v. (2016). Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. Frontiers in Neuroscience, 10(FEB). https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00027

G

Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J. Jr., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 Dopamine Receptor-Regulated Gene Expression of Striatonigral and Striatopallidal Neurons. Science, 250, 1429–1432.

Giacobbo, B. L., Özalay, Ö., Mediavilla, T., Ericsson, M., Axelsson, J., Rieckmann, A., Sultan, F., & Marcellino, D. (2022). The Aged Striatum: Evidence of Molecular and Structural Changes Using a Longitudinal Multimodal Approach in Mice. Frontiers in Aging Neuroscience, 14. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.795132

Goetz, T., Arslan, A., Wisden, W., & Wulff, P. (2007). GABAA receptors: structure and function in the basal ganglia. Progress in Brain Research, 160, 21–41. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60003-4

Goodro, M., Sameti, M., Patenaude, B., & Fein, G. (2012). Age effect on subcortical structures in healthy adults. Psychiatry Research - Neuroimaging, 203(1), 38–45. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2011.09.014

Grabrucker, A. M. (2013). Environmental factors in autism. In Frontiers in Psychiatry (Vol. 3, Issue JAN). https://doi.org/10.3389/fpsyt.2012.00118

Graybiel, A. M. (2000). The basal ganglia. Current Biology, 10(14), 509–511.

Graybiel, A. M., & Grafton, S. T. (2015). The striatum: Where skills and habits meet. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7(8). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021691

H

Haber, S. N. (2015). Corticostriatal circuitry. Dialogues Clin Neurosci, 18, 7–21. www.dialogues-cns.org

Haida, O., al Sagheer, T., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Soria, F., Fernagut, P. O., & Jaber, M. (2019). Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. Translational Psychiatry. https://doi.org/10.1038/s41398-019-0457-y

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

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

Hickmott, P., & Dinse, H. (2013). Effects of aging on properties of the local circuit in rat primary somatosensory cortex (S1) in vitro. Cerebral Cortex, 23(10), 2500–2513. https://doi.org/10.1093/cercor/bhs248

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

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

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

I-J

Ingiosi, A. M., Schoch, H., Wintler, T., Singletary, K. G., Righelli, D., Roser, L. G., Medina, E., Risso, D., Frank, M. G., & Peixoto, L. (2019). Shank3 modulates sleep and expression of circadian transcription factors. https://doi.org/10.7554/eLife.42819.001

Ivanović, I. (2021). Psychiatric Comorbidities in Children With ASD: Autism Centre Experience. Frontiers in Psychiatry, 12. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.673169

Jacobs, B., Schall, M., Prather, M., Kapler, E., Driscoll, L., Baca, S., Jacobs, J., Ford, K., Wainwright, M., & Treml, M. (2001). Regional Dendritic and Spine Variation in Human Cerebral Cortex: a Quantitative Golgi Study. Cerebral Cortex, 11, 558–571.

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

K

Kanner, L. (1943). Autistic disturbance of affective contact. Nerv Child, 2, 217–250.

Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S. M., & Karahmadi, M. (2017). Environmental factors influencing the risk of autism. In Journal of Research in Medical Sciences (Vol. 22, Issue 1). Isfahan University of Medical Sciences(IUMS). https://doi.org/10.4103/1735-1995.200272

Ketcheson, L. R., Pitchford, E. A., & Wentz, C. F. (2021). The Relationship Between Developmental Coordination Disorder and Concurrent Deficits in Social Communication and Repetitive Behaviors Among Children with Autism Spectrum Disorder. Autism Research, 14(4), 804–816. https://doi.org/10.1002/aur.2469

Kirov, I. I., Sollberger, M., Davitz, M. S., Glodzik, L., Soher, B. J., Babb, J. S., Monsch, A. U., Gass, A., & Gonen, O. (2021). Global brain volume and N-acetyl-aspartate decline over seven decades of normal aging. Neurobiology of Aging, 98, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.10.024

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

Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. Annual Review of Neuroscience, 32(1), 127–147. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422

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

Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. Neuron, 60(4), 543–554. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005

L

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

Langen, M., Bos, D., Noordermeer, S. D. S., Nederveen, H., van Engeland, H., & Durston, S. (2014). Changes in the development of striatum are involved in repetitive behavior in autism. Biological Psychiatry, 76(5), 405–411. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.08.013

Lauber, E., Filice, F., & Schwaller, B. (2016). Prenatal valproate exposure differentially affects parvalbumin-expressing neurons and related circuits in the cortex and striatum of mice. Frontiers in Molecular Neuroscience, 9(DEC2016), 1–16. https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00150

Lauber, E., Filice, F., & Schwaller, B. (2018). Dysregulation of Parvalbumin Expression in the Cntnap2−/− Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. Frontiers in Molecular Neuroscience, 11. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00262

Leblond, C. S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., Giuliano, F., Stordeur, C., Depienne, C., Mouzat, K., Pinto, D., Howe, J., Lemière, N., Durand, C. M., Guibert, J., Ey, E., Toro, R., Peyre, H., Mathieu, A., … Bourgeron, T. (2014). Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. PLoS Genetics, 10(9). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004580

Li, W., & Pozzo-Miller, L. (2020). Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. Journal of Neuroscience Research, 98(11), 2130–2147. https://doi.org/10.1002/jnr.24560

Licari, M. K., Alvares, G. A., Varcin, K., Evans, K. L., Cleary, D., Reid, S. L., Glasson, E. J., Bebbington, K., Reynolds, J. E., Wray, J., & Whitehouse, A. J. O. (2020). Prevalence of Motor Difficulties in Autism Spectrum Disorder: Analysis of a Population-Based Cohort. Autism Research, 13(2), 298–306. https://doi.org/10.1002/aur.2230

Lobo, M. K. (2009). Molecular Profiling of Striatonigral and Striatopallidal Medium Spiny Neurons. Past, Present, and Future. International Review of Neurobiology, 89(C), 1–35. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)89001-6

Logie, C., Bagetta, V., & Bracci, E. (2013). Presynaptic Control of Corticostriatal Synapses by Endogenous GABA. The Journal of Neuroscience, 33(39), 15425–15431. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2304-13.2013

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. In Cell (Vol. 153, Issue 6, p. 1194). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039

Lukmanji, S., Manji, S. A., Kadhim, S., Sauro, K. M., Wirrell, E. C., Kwon, C. S., & Jetté, N. (2019). The co-occurrence of epilepsy and autism: A systematic review. In Epilepsy and Behavior (Vol. 98, pp. 238–248). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.07.037

M

MacDonald, M. E., & Pike, G. B. (2021). MRI of healthy brain aging: A review. NMR in Biomedicine, 34(9). https://doi.org/10.1002/nbm.4564

Malvaez, M., & Wassum, K. M. (2018). Regulation of habit formation in the dorsal striatum. In Current Opinion in Behavioral Sciences (Vol. 20, pp. 67–74). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.11.005

Marín, O., Anderson, S. A., & Rubenstein, J. L. R. (2000). Origin and Molecular Specification of Striatal Interneurons.

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

McNeill, T. H., Koek, L. L., Brown, S. A., Rafols, J. A., Koek, L. L., Brown, S. A., & Rafols, J. A. (1990). Quantitative Analysis of Age-Related Dendritic Changes in Medium Spiny I (MSI) Striatal Neurons of C57BL/6N Mice. Neurobiology of Aging, ll, 537–550.

McQuail, J. A., Frazier, C. J., & Bizon, J. L. (2015). Molecular aspects of age-related cognitive decline: The role of GABA signaling. In Trends in Molecular Medicine (Vol. 21, Issue 7, pp. 450–460). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.05.002

Meshalkina, D. A., N. Kizlyk, M., v. Kysil, E., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Abreu, M. S., Barcellos, L. J. G., Song, C., Warnick, J. E., Kyzar, E. J., & Kalueff, A. v. (2018). Zebrafish models of autism spectrum disorder. In Experimental Neurology (Vol. 299, pp. 207–216). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.02.004

Meyza, K. Z., & Blanchard, D. C. (2017). The BTBR mouse model of idiopathic autism – Current view on mechanisms. In Neuroscience and Biobehavioral Reviews (Vol. 76, pp. 99–110). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037

Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. In Molecular Autism (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4

Monteiro, P., Barak, B., Zhou, Y., McRae, R., Rodrigues, D., Wickersham, I. R., & Feng, G. (2018). Dichotomous parvalbumin interneuron populations in dorsolateral and dorsomedial striatum. Journal of Physiology, 596(16), 3695–3707. https://doi.org/10.1113/JP275936

Moyer, J. R., & Brown, T. H. (2006). Impaired trace and contextual fear conditioning in aged rats. Behavioral Neuroscience, 120(3), 612–624. https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.3.612

N

Nakamura, S., Akiguchi, I., Kameyama, M., & Mizuno, N. (1985). Age-related Changes of Pyramidal Cell Basal Dendrites in Layers III and V of Human Motor Cortex: A Quantitative Golgi Study. In Acta Neuropathol (Bed) (Vol. 65).

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

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

Nisenbaum, E. S., Wilson, C. J., Foehring, R. C., & Surmeier, D. J. (1996). Isolation and Characterization of a Persistent Potassium Current in Neostriatal Neurons. Journal of Neurophysiology, 76(2), 1180–1194. www.physiology.org/journal/jn

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

O

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

Oler, J. A., & Markus, E. J. (1998). Age-Related Deficits on the Radial Maze and in Fear Conditioning: Hippocampal Processing and Consolidation. In Hippocampus (Vol. 8).

P

Palpagama, T. H., Sagniez, M., Kim, S., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., & Kwakowsky, A. (2019). GabaA receptors are well preserved in the hippocampus of aged mice. ENeuro, 6(4). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0496-18.2019

Parievsky, A., Moore, C., Kamdjou, T., Cepeda, C., Meshul, C. K., & Levine, M. S. (2017). Differential electrophysiological and morphological alterations of thalamostriatal and corticostriatal projections in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. Neurobiology of Disease, 108, 29–44. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.020

Paterno, R., Marafiga, J. R., Ramsay, H., Li, T., Salvati, K. A., & Baraban, S. C. (2021). Hippocampal gamma and sharp-wave ripple oscillations are altered in a Cntnap2 mouse model of autism spectrum disorder. Cell Reports, 37(6), 109970. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109970

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

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

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

Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J. L., Trimmer, J. S., Shrager, P., & Peles, E. (1999). Caspr2, a new member of the Neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K+ channels. Neuron, 24(4), 1037–1047. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81049-1

Popescu, I. R., Le, K. Q., Ducote, A. L., Li, J. E., Leland, A. E., & Mostany, R. (2021). Increased intrinsic excitability and decreased synaptic inhibition in aged somatosensory cortex pyramidal neurons. Neurobiology of Aging, 98, 88–98. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.10.007

Porges, E. C., Woods, A. J., Edden, R. A. E., Puts, N. A. J., Harris, A. D., Chen, H., Garcia, A. M., Seider, T. R., Lamb, D. G., Williamson, J. B., & Cohen, R. A. (2017). Frontal Gamma-Aminobutyric Acid Concentrations Are Associated With Cognitive Performance in Older Adults. Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, 2(1), 38–44. https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2016.06.004

Q-R

Qin, L., Ma, K., Wang, Z. J., Hu, Z., Matas, E., Wei, J., & Yan, Z. (2018). Social deficits in Shank3-deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition. Nature Neuroscience, 21(4), 564–575. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0110-8

Rafols, J. A., Cheng, H. W., & McNeill, T. H. (1989). Golgi Study of the Mouse Striatum: Age-Related Dendritic Changes in Different Neuronal Populations. The Journal of Comparative Neurology, 279, 212–227.

Raz, N., Gunning, F. M., Head, D., Dupuis, J. H., McQuain, J., Briggs, S. D., Loken, W. J., Thornton, A. E., & Acker, J. D. (1997). Selective Aging of the Human CerebralCortex Observedin Vivo: DifferentialVulnerability of the Prefrontal Gray Matter. Cerebral Cortex, 7, 268–282.

Reiner, A., Hart, N. M., Lei, W., & Deng, Y. (2010). Corticostriatal projection neurons - Dichotomous types and dichotomous functions. Frontiers in Neuroanatomy, OCT. https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00142

Reiss, A. L., Faruque, F., Naidu, S., Abrams, M., Beaty, T., Bryan, R. N., & Moser, H. (1993). Neuroanatomy of Rett syndrome: A volumetric imaging study. Annals of Neurology, 34(2), 227–234. https://doi.org/10.1002/ana.410340220

Richardson, B. D., Ling, L. L., Uteshev, V. v., & Caspary, D. M. (2013). Reduced GABAA receptor-mediated tonic inhibition in aged rat auditory thalamus. Journal of Neuroscience, 33(3). https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3277-12.2013

Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2005). Two developmental switches in GABAergic signalling: The K+-Cl- cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. Journal of Physiology, 562(1), 27–36. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.077495

Rodenas-Cuadrado, P., Ho, J., & Vernes, S. C. (2014). Shining a light on CNTNAP2: Complex functions to complex disorders. In European Journal of Human Genetics (Vol. 22, Issue 2, pp. 171–178). https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.100

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

Rozycka, A., & Liguz-Lecznar, M. (2017). The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse. In Aging Cell (Vol. 16, Issue 4, pp. 634–643). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/acel.12605

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

Russo, G., Nieus, T. R., Maggi, S., & Taverna, S. (2013). Dynamics of action potential firing in electrically connected striatal fast-spiking interneurons. Frontiers in Cellular Neuroscience, 6(NOV). https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00209

S

Sadikot, A. F., & Sasseville, R. (1997). Neurogenesis in the Mammalian Neostriatum and Nucleus Accumbens: Parvalbumin-Immunoreactive GABAergic Interneurons. In J. Comp. Neurol (Vol. 389). Wiley-Liss, Inc.

Saint-Martin, M., Joubert, B., Pellier-Monnin, V., Pascual, O., Noraz, N., & Honnorat, J. (2018). Contactin-associated protein-like 2, a protein of the neurexin family involved in several human diseases. In European Journal of Neuroscience (Vol. 48, Issue 3, pp. 1906–1923). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/ejn.14081

Salat, D. H., Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Greve, D. N., Desikan, R. S. R., Busa, E., Morris, J. C., Dale, A. M., & Fischl, B. (2004). Thinning of the cerebral cortex in aging. Cerebral Cortex, 14(7), 721–730. https://doi.org/10.1093/cercor/bhh032

Salazar de Pablo, G., Jordá, C. P., Vaquerizo-Serrano, J., Moreno, C., Cabras, A., Arango, C., Hernández, P., Veenstra-VanderWeele, J., Simonoff, E., Fusar-Poli, P., Santosh, P., Cortese, S., & Parellada, M. (2022). Systematic Review and Meta-analysis: Efficacy of Pharmacological Interventions for Irritability and Emotional Dysregulation in Autism Spectrum Disorder and Predictors of Response. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry. https://doi.org/10.1016/j.jaac.2022.03.033

Scheibel, M. E., Lindsay, R. D., Tomiyasu, U., & Scheibel, A. B. (1975). Progressive Dendritic Changes in Aging Human Cortex. In EXPERIMENTAL NEUROLOGY (Vol. 47).

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

Scott, R., Sánchez-Aguilera, A., van Elst, K., Lim, L., Dehorter, N., Bae, S. E., Bartolini, G., Peles, E., Kas, M. J. H., Bruining, H., & Marín, O. (2019). Loss of Cntnap2 Causes Axonal Excitability Deficits, Developmental Delay in Cortical Myelination, and Abnormal Stereotyped Motor Behavior. Cerebral Cortex, 29(2), 586–597. https://doi.org/10.1093/cercor/bhx341

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

Sedmak, G., Jovanov-Milosevic, N., Puskarjov, M., Ulamec, M., Kruslin, B., & Judas, M. (2016). Developmental Expression Patterns of KCC2 and Functionally Associated Molecules in the Human Brain. Cerebral Cortex, 26, 4574–4589. https://doi.org/10.1093/cercor/bhw218

Selimbeyoglu, A., Kim, C. K., Inoue, M., Lee, S. Y., Hong, A. S. O., Kauvar, I., Ramakrishnan, C., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Wright, M., & Deisseroth, K. (2017). Modulation of prefrontal cortex excitation/inhibition balance rescues social behavior in CNTNAP2-deficient mice. Science Translational Medicine, 9(401). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6733

Siafis, S., Çıray, O., Wu, H., Schneider-Thoma, J., Bighelli, I., Krause, M., Rodolico, A., Ceraso, A., Deste, G., Huhn, M., Fraguas, D., San José Cáceres, A., Mavridis, D., Charman, T., Murphy, D. G., Parellada, M., Arango, C., & Leucht, S. (2022). Pharmacological and dietary-supplement treatments for autism spectrum disorder: a systematic review and network meta-analysis. Molecular Autism, 13(1). https://doi.org/10.1186/s13229-022-00488-4

Sieghart, W. (2006). Structure, Pharmacology, and Function of GABAA Receptor Subtypes. Advances in Pharmacology, 54, 231–263. https://doi.org/10.1016/S1054-3589(06)54010-4

Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., & Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: Prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 47(8), 921–929. https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e318179964f

Specchio, N., di Micco, V., Trivisano, M., Ferretti, A., & Curatolo, P. (2022). The epilepsy–autism spectrum disorder phenotype in the era of molecular genetics and precision therapy. In Epilepsia (Vol. 63, Issue 1, pp. 6–21). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/epi.17115

Speyer, R., Chen, Y. W., Kim, J. H., Wilkes-Gillan, S., Nordahl-Hansen, A. J., Wu, H. C., & Cordier, R. (2021). Non-pharmacological Interventions for Adults with Autism: a Systematic Review of Randomised Controlled Trials. In Review Journal of Autism and Developmental Disorders. Springer. https://doi.org/10.1007/s40489-021-00250-1

Starkstein, S., Gellar, S., Parlier, M., Payne, L., & Piven, J. (2015). High rates of parkinsonism in adults with autism. Journal of Neurodevelopmental Disorders, 7(1). https://doi.org/10.1186/s11689-015-9125-6

Stoehr, J. D., & Wenk, G. L. (1995). Effects of age and lesions of the nucleus basalis on contextual fear conditioning. In Psychobiology (Vol. 23, Issue 3).

Stomby, A., Boraxbekk, C. J., Lundquist, A., Nordin, A., Nilsson, L. G., Adolfsson, R., Nyberg, L., & Olsson, T. (2016). Higher diurnal salivary cortisol levels are related to smaller prefrontal cortex surface area in elderly men and women. European Journal of Endocrinology, 175(2), 117–126. https://doi.org/10.1530/EJE-16-0352

Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Huentelman, M. J., Gottlieb, S., Dobrin, S. E., Parod, J. M., Stephan, D. A., & Morton, D. H. (2006). Recessive Symptomatic Focal Epilepsy and Mutant Contactin-Associated Protein-like 2. New England Journal of Medicine, 354(13), 1370–1377. https://doi.org/10.1056/nejmoa052773

Subramanian, K., Brandenburg, C., Orsati, F., Soghomonian, J. J., Hussman, J. P., & Blatt, G. J. (2017). Basal ganglia and autism – a translational perspective. Autism Research, 10(11), 1751–1775. https://doi.org/10.1002/aur.1837

T

Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., & Takai, Y. (1997). SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. Journal of Biological Chemistry, 272(18), 11943–11951. https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.11943

Taylor, E. N., Huang, N., Wisco, J., Wang, Y., Morgan, K. G., & Hamilton, J. A. (2020). The brains of aged mice are characterized by altered tissue diffusion properties and cerebral

microbleeds. Journal of Translational Medicine, 18(1). https://doi.org/10.1186/s12967-020-02441-6

Tepper, J. M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T. W., & Assous, M. (2018). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons: Update 2018. In Frontiers in Neuroanatomy (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00091

Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. In Frontiers in Neuroanatomy (Issue DEC). https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00150

Tepper, J. M., Wilson, C. J., & Koós, T. (2008). Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. In Brain Research Reviews (Vol. 58, Issue 2, pp. 272–281). https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.10.008

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

Tu, Z., Zhao, H., Li, B., Sen, Y., Lu, W., Yongjin, T., Zhujun, L., Dazhang, B., Caijuan, L., Yingqi, L., Yuefeng, L., Jianrong, L., Hao, X., Xiangyu, G., Yong-Hui, J., Yong, Q. Z., & Xiao-Jiang, L. (2019). CRISPR/Cas9-mediated disruption of SHANK3 in monkey leads to drug-treatable autism-like symptoms. Human Molecular Genetics, 28(4), 561–571. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy367

U-V

Uchimura, N., Cherubini, E., & North, R. A. (1989). Inward Rectification in Rat Nucleus Accumbens Neurons (Vol. 62, Issue 6). www.physiology.org/journal/jn

van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. Journal of Neuroscience, 25(38), 8680–8685. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005

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

Vogt, D., Cho, K. K. A., Shelton, S. M., Paul, A., Huang, Z. J., Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L. R. (2018). Mouse Cntnap2 and Human CNTNAP2 ASD Alleles Cell Autonomously Regulate PV + Cortical Interneurons. Cerebral Cortex, 28(11), 3868–3879. https://doi.org/10.1093/cercor/bhx248

W

Wang, H. bin, Tahara, Y., Luk, S. H. C., Kim, Y. S., Hitchcock, O. N., MacDowell Kaswan, Z. A., In Kim, Y., Block, G. D., Ghiani, C. A., Loh, D. H., & Colwell, C. S. (2020). Melatonin treatment of repetitive behavioral deficits in the Cntnap2 mouse model of autism spectrum disorder. Neurobiology of Disease, 145(May), 105064. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105064

Wang, Z. J., Zhong, P., Ma, K., Seo, J. S., Yang, F., Hu, Z., Zhang, F., Lin, L., Wang, J., Liu, T., Matas, E., Greengard, P., & Yan, Z. (2020). Amelioration of autism-like social deficits by targeting histone methyltransferases EHMT1/2 in Shank3-deficient mice. Molecular Psychiatry, 25(10), 2517–2533. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0351-2

Wiegel, J., Flory, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Yong Ma, S., Imaki, H., Wiegel, J., Cohen, I. L., London, E., Wisniewski, T., & Brown, W. T. (2014). Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism ... Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alter. Acta Neuropathologica Communications, 2(141), 1–18.

Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K. J., Wolfer, D. P., Welzl, H., Gall, D., Schiffmann, S. N., & Schwaller, B. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. Translational Psychiatry, 5(January 2014), e525. https://doi.org/10.1038/tp.2015.19

X-Y

Xing, X., Zhang, J., Wu, K., Cao, B., Li, X., Jiang, F., Hu, Z., Xia, K., & Li, J. da. (2019). Suppression of Akt-mTOR pathway rescued the social behavior in Cntnap2-deficient mice. Scientific Reports, 9(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39434-5

Yang, H., de Jong, J. W., Tak, Y. E., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. Neuron, 97(2), 434-449.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022

Z

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

Zec, R. F. (1995). The Neuropsychology of Aging. Experimental Gerontology, 30(3/4), 431–442.

Zeng, H., Liu, S., Huang, R., Zhou, Y., Tang, J., Xie, J., Chen, P., & Yang, B. X. (2021). Effect of the TEACCH program on the rehabilitation of preschool children with autistic spectrum disorder: A randomized controlled trial. Journal of Psychiatric Research, 138, 420–427. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.04.025

Zhang, F., Rein, B., Zhong, P., Shwani, T., Conrow-Graham, M., Wang, Z. J., & Yan, Z. (2021). Synergistic inhibition of histone modifiers produces therapeutic effects in adult Shank3-deficient mice. Translational Psychiatry, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41398-021-01233-w

Zhang, L., Qin, Z., Ricke, K. M., Cruz, S. A., Stewart, A. F. R., & Chen, H. H. (2020). Hyperactivated PTP1B phosphatase in parvalbumin neurons alters anterior cingulate inhibitory circuits and induces autism-like behaviors. Nature Communications, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-14813-z

Zhang, Z., Yao, Z., Wu, K., Zhang, T., Xing, C., & Xing, X. L. (2021). Resveratrol rescued the pain related hypersensitivity for Cntnap2-deficient mice. European Journal of Pharmacology, 891(October 2020), 173704. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173704