



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Magali HERNANDEZ

**Effets de l'administration chronique de corticostérone sur le
développement postnatal du cervelet.**

Soutenue le 20/12/2019.

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Catherine JOUSSELME	Professeur des Universités - Praticien hospitalier Fondation Vallée, Gentilly, Paris.
	Mr Yves BOUCHER	Professeur des Universités - Praticien hospitalier Laboratoire de Neurobiologie Oro-faciale, EA7543, Université de Paris Diderot, Paris.
Examineurs :	Mlle Catherine STRAZIELLE	Professeur des Universités - Praticien hospitalier Laboratoire Stress, Immunité, Pathogènes, EA73000, Université de Lorraine, Nancy. Directeur de thèse.
	Mr Robert LALONDE	Professeur des Universités Département de Psychologie, Centre de Recherches sur les Fonctionnements et Dysfonctionnements Psychologiques, EA7475, Université de Normandie, Rouen. Co-directeur de thèse.
Invité :	Mr Simon THORNTON	Professeur des Universités U1116 UL-INSERM, Université de Lorraine, Nancy.

Remerciements

Madame Catherine JOUSSELME, Monsieur Yves BOUCHER et Monsieur Simon THORNTON,

Je remercie chacun d'entre vous pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger parmi les membres du jury en qualité de rapporteur ou de membre invité. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

Mademoiselle Catherine STRAZIELLE et Monsieur Robert LALONDE,

Le soutien, la patience, l'aide précieuse, les encouragements que vous m'avez témoigné à chacune des étapes de ce travail m'ont permis d'accomplir mes premiers pas dans ce vaste monde de la recherche en Neurosciences. Vous m'avez fait le grand honneur de diriger cette thèse en partageant vos connaissances avec bienveillance. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et recevez ici toute ma gratitude.

Madame Brigitte LEININGER et Monsieur Jean-François GHERSI-EGEA,

Vous m'avez accompagné au cours de ces trois années dans le cadre du comité de suivi de thèse, en partageant vos points de vue éclairés. Vos encouragements et vos remarques pertinentes ont permis d'enrichir ma réflexion, je vous en remercie vivement.

A l'équipe du laboratoire Stress, Immunité, Pathogènes, et plus particulièrement à Stéphanie GHISLIN et Guillaume HARLE, je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et initiée aux subtilités des techniques de qPCR.

A mes consœurs et confrères odontologistes,

Sachez que je mesure pleinement la chance qui m'est offerte d'exercer à vos côtés. Merci infiniment de partager avec moi vos expériences et points de vue, nos échanges enrichissent considérablement ma pratique professionnelle.

A Madame Dominique DROZ,

Pour vos encouragements énergisants et la tournure qu'a pris mon parcours universitaire à vos côtés, je ne cesserai de vous exprimer ma profonde gratitude et de vous témoigner mon plus fidèle soutien.

A Madame Catherine CARRE,

Qui m'a accompagné de mes premiers pas en Odontologie jusqu'à ce jour. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

A mes amies et amis,

Un immense merci d'avoir uni votre destin au mien par les liens sincères de l'amitié, de façonner ensemble une ribambelle de joyeux souvenirs et de m'accorder votre confiance.

A ma famille,

Parce que « nous ne sommes faits que de ceux que nous aimons et de rien d'autre. » Christian Bobin.

A ma sœur,

Pour son soutien, pour tout, partout, tout le temps. « Comme inséparables, sont racines et immenses arbres ».

A mes absents,

Qui continuent de me souffler dans les ailes.

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
1. Exposition précoce à une expérience stressante et pathologies psychiatriques	1
1.1. Déficits de l'attention, hyperactivité (DAH) et cervelet	3
1.2. Troubles du spectre autistique (TSA) et cervelet	3
1.3. Schizophrénie et cervelet.....	4
1.4. Troubles bipolaires et cervelet.....	5
1.5. Syndrome dépressif majeur (SDM) et cervelet	6
1.6. Conclusion	7
2. Le cervelet	7
2.1. Organisation anatomique et fonctionnelle du cervelet	7
2.2. Organisation histologique du cervelet	16
2.3. Développement postnatal du cervelet.....	17
3. Corticostérone et Corticolibérine ou <i>Corticotropin-releasing hormone</i> (CRH)	20
3.1. L'axe Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien ou Hypothalamic pituitary adrenal (HPA).....	20
3.2. Récepteurs à la CRH dans le cervelet	23
3.3. Les effets de la CRH sur le cervelet	28
3.4. Localisation et effets des glucocorticoïdes sur le cervelet.....	29
3.5. Résumé des localisations cellulaires des récepteurs aux GC, de la CRH et de ses récepteurs au sein du cervelet à l'âge adulte.....	33
4. BDNF (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>) : généralités	34
4.1. Principaux rôles du BDNF dans le système nerveux central (SNC)	35
4.2. BDNF et le cervelet en développement	36
4.3. BDNF et Stress	41
4.5. Résumé des localisations de BDNF et TrkB au sein du cervelet adulte	42
5. Protéines du cytosquelette	42
5.1. Protéines du cytosquelette : rôles et fonctions	43
5.2. Protéines du cytosquelette et pathologies psychiatriques.....	43
5.3. Les effets de la corticostérone sur les protéines du cytosquelette	44
6. Les récepteurs glutamatergiques	45
6.1. Rôles et fonctions de GluR δ 2 dans le développement du cervelet	45
6.2. Les effets du stress aigu et chronique sur les synapses glutamatergiques.....	46
II. OBJECTIFS	49

III. MATERIELS et METHODES	51
1. Animaux	51
2. Préparation des solutions de corticostérone et de DMSO	54
3. Mise à mort et prélèvements des tissus	54
4. Préparation des coupes histologiques	54
5. Coloration histologique au crésyl violet	55
6. Etude Morphométrique.....	55
7. Marquage histochimique de la cytochrome c oxydase	57
8. Dosage de la corticostérone sérique	61
9. Extractions ARN sur colonnes d'affinité.....	61
10. Transcription inverse des ARNm	63
11. PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	63
12. Evaluation comportementale.....	65
12.1. Evaluation comportementale durant la période de développement postnatal.....	65
12.2. Evaluation comportementale à l'âge adulte	68
13. Analyses statistiques	73
IV. RESULTATS.....	75
➤ PREMIER VOLET DE L'ETUDE	
1. Évaluation du poids des animaux.....	75
2. Évaluation du taux de corticostérone sérique.....	75
3. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur la morphométrie cérébelleuse et hippocampique observée à J15 PN et à J29 PN.....	76
4. Impact d'une administration de corticostérone de J8 à J15 PN sur l'expression de transcrits d'hormones du stress, de protéines du cytosquelette, de neurotrophines et du récepteur GluRδ2	77
5. Activité métabolique régionale à J15PN et à J29 PN	80
➤ SECOND VOLET DE L'ETUDE	
1. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur le poids de l'animal.	83
2. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur la fonctionnalité cérébelleuse.	83
2.1. Effets précoces	84
2.2. Effets tardifs à l'âge adulte	87
3. Évaluation du taux de corticostérone sérique à 3 mois.	93

4. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur la morphométrie du cervelet et de l'hippocampe.	93
4.1. Morphométrie cérébelleuse et hippocampique de la souris adulte (3 mois).....	93
4.2. Corrélations entre la morphométrie du cervelet et les résultats comportementaux	94
5. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur l'activité métabolique régionale de l'encéphale à l'âge adulte.....	95
5.1. Modifications de l'activité métabolique régionale de certaines régions du SNC	95
5.2. Corrélations entre l'activité métabolique régionale et les résultats comportementaux .	96
6. Evaluation de l'impact d'une administration chronique de corticostérone durant la période postnatale sur l'expression à long terme des transcrits d'hormones du stress, de protéines du cytosquelette, de neurotrophines et du récepteur GluRδ2.	97
6.1. Hormones du stress.....	97
6.2. Protéines du cytosquelette	98
6.3. Neurotrophines : BDNF	100
6.4. Récepteurs glutamatergiques	100
V. DISCUSSION	101
➤ PREMIER VOLET DE L'ETUDE	
1. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur l'axe HPA ..	101
2. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur le développement postnatal du SNC	103
3. Effets de l'administration répétée de corticostérone de J8 à J15 PN sur l'expression des gènes d'intérêt à J15 PN.....	107
4. Effets de l'administration répétée et chronique de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur l'activité métabolique régionale à J15 et à J29 PN.....	110
➤ SECOND VOLET DE L'ETUDE	
1. Impact d'une injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur le taux sérique de corticostérone à l'âge adulte.	112
2. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur l'évolution pondérale de l'animal	113
3. Impact d'une injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur le phénotype moteur de l'animal.....	114
4. Impact d'une injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur la morphométrie cérébelleuse et hippocampique à l'âge adulte.	119
5. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur l'activité métabolique régionale de l'encéphale à l'âge adulte.....	120
6. Evaluation de l'impact d'une administration chronique de corticostérone durant la période postnatale sur l'expression à long terme des gènes d'intérêt	122

BIBLIOGRAPHIE	129
ANNEXES.....	165
ARTICLES	169

ABREVIATIONS

ACTH : *Adreno-Cortico-Trophic Hormone*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-Propionate.

AP-1 : *Activating protein 1*

ARNm : ARN messenger (ARN : Acide ribonucléique)

BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*

Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*

BNST : *Bed Nucleus of Stria Terminalis*

CA : Corne d'Ammon

COX : Cytochrome c oxidase

CRH : *Corticotropin Releasing Hormone*

CRH-R1 : *Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1*

CRH-R2 : *Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2*

CRH-R2-fl : *Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2 forme complete*

CRH-R2- tr : *Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2 forme tronquée*

DAH : Déficits de l'Attention, Hyperactivité

E : Embryonnaire

EAAT : *Excitatory Amino Acid Transporter*

ELISA : *Enzyme linked immunosorbent Assay*

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GC : GlucoCorticoïdes

GD : Gyrus denté

GluR δ 2 : *Glutamate Receptor δ 2*

GR : *Glucocorticoids Receptors*

GRE : *Glucocorticoids receptors Responsive Element*

HPA : *Hypothalamic-Pituitary Adrenal*

11 β -HSD2 : 11beta-Hydroxysteroïde Désydrégénase 2

Ig-G : Immunoglobine G

JC : Jour de Comportement

MAP2 : *Microtubule Associated Protein 2*

MR : *Mineralocorticoids Receptors*

NFL : *NeuroFilament Light chain*

NGF : *Nerve Growth Factor*

NMDA : *N-Methyl-D-Aspartique Acid*

NPV : Noyau Paraventriculaire

NT : Neurotrophine

PN : Postnatal

qPCR : PCR quantitative en temps réel (PCR : réaction de polymérisation en chaîne)

SDM : Syndrome Dépressif Majeur

SNC : Système Nerveux Central

TrkB : *Tropomyosin-Related Kinase B*

TSA : Trouble du Spectre Autistique

I. INTRODUCTION

1. Exposition précoce à une expérience stressante et pathologies psychiatriques

Certains événements stressants survenant précocement dans de la vie d'un individu pourraient être impliqués dans la survenue de pathologies psychiatriques telles que les troubles de l'humeur, les troubles affectifs ou cognitifs (Tsankova *et al.*, 2007, Lupien *et al.*, 2009). Par exemple, certains auteurs ont établi une association entre un traumatisme durant l'enfance et le risque de développer à l'âge adulte un syndrome dépressif majeur (Heim et Binder, 2012). Ainsi, Patchev *et al.* (2014) en utilisant un protocole qualifié *d'early life stress*, protocole qui consiste à séparer les souriceaux de leur mère durant 3 heures à des moments variables de la journée, lors des 10 premiers jours de la vie postnatale (PN) ont mis en évidence des troubles du comportement, des altérations de l'apprentissage spatial et un phénotype anxieux chez la souris devenue adulte. Des résultats similaires ont été observés chez l'animal stressé durant le développement (protocole *Early life stress* appliqué de J1 à J10 PN) qui a l'âge adulte présentait significativement plus de déficiences cognitives et émotionnelles (Murgatroyd *et al.*, 2009, Meaney 2010). Mueller et Bale (2008) ont également montré que la souris stressée précocement durant la gestation (avant l'apparition de l'encéphale du fœtus), présentait un phénotype caractérisé par un comportement dépressif associé à une surexpression du gène codant pour la corticolibérine (*corticotropin releasing hormone*, CRH) dans le noyau central de l'amygdale. Le lien entre le stress aigu ou chronique et des troubles affectifs, cognitifs ou de l'humeur a aussi été confirmé par d'autres auteurs (Holsboer et Ising 2010, Sousa et Almeida, 2012). Cliniquement, il semblerait que les enfants exposés à un stress important durant leurs premières semaines de vie postnatale, seraient plus susceptibles de développer des troubles émotionnels et cognitifs tels que des troubles de l'attention, de la mémoire et de l'apprentissage ou encore des troubles moteurs perdurant durant l'enfance et l'adolescence (Sapolsky 2000).

Il est intéressant de noter que ces événements de vie générant un stress ne conduisent pas nécessairement à des changements comportementaux irréversibles. En effet, certaines études ont observé un rétablissement spontané de certains changements comportementaux (Sousa et Almeida 2012) et de déficits neuro endocriniens, émotionnels et cognitifs (Murgatroyd *et al.*, 2009) préalablement induits par un stress chez la souris durant les premiers jours de vie postnatale. La capacité à reverser les altérations fonctionnelles de l'encéphale et donc probablement structurales semble dépendre de la qualité, de l'ampleur, de la durée et de la période à laquelle l'animal est exposé au stress initial.

Parallèlement, les auteurs ont également montré que chez les souris ayant subi un stress précoce durant la vie postnatale, le taux de glucocorticoïdes (GC) était augmenté à l'état basal et en condition de stress. Cette augmentation concernait à la fois l'amplitude et la durée du pic du taux de glucocorticoïdes (Patchev *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent une perte d'efficacité du rétro contrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) et/ou une hyperactivation des neurones hypothalamiques responsables *in fine* de la sécrétion de glucocorticoïdes. Cette augmentation du taux de glucocorticoïdes vient confirmer les résultats observés chez les patients souffrants d'anxiété ou de syndrome dépressif majeur. En effet, ces derniers présentent un taux excessivement élevé de glucocorticoïdes (Holsboer et Ising, 2010). De plus, chez les enfants nés prématurés, il a été démontré que le nombre de procédures invasives et le degré de sévérité de l'état de santé à la naissance étaient corrélés à des taux élevés de cortisol de base. Ces taux élevés persistaient à 8 et 18 mois (Grunau *et al.*, 2009).

Ces différentes études mettent en évidence les effets d'expériences stressantes précoces durant le développement ou l'enfance sur le comportement de l'animal et la survenue potentielle de certaines pathologies psychiatriques. Elles permettent également d'établir une corrélation entre ces différents événements stressants et la régulation de la sécrétion de glucocorticoïdes à l'âge adulte suggérant ainsi un éventuel mécanisme étiopathogénique des pathologies psychiatriques.

Certaines régions de l'encéphale étant impliquées dans le contrôle des émotions et des fonctions cognitives, ces études laissent supposer que les troubles comportementaux, les déficits moteurs (Manto *et al.*, 2013), cognitifs (Stoodley *et al.*, 2012) et émotionnels (Schmahmann *et al.*, 2007), observés chez l'animal soumis à un stress précocement lors du développement, peuvent résulter d'une altération structurale des régions concernées.

Ainsi, plusieurs études récentes ont rapporté une forte corrélation entre les altérations structurales et fonctionnelles du cervelet et des pathologies psychiatriques comme la schizophrénie (Chen *et al.*, 2013 ; Fatemi *et al.*, 2013), les troubles bipolaires (Baldacara *et al.*, 2011 ; Liang *et al.*, 2013), la dépression (Bledsoe *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2012 ; Ma *et al.*, 2013 ; Peng *et al.*, 2011), l'anxiété (Nakao *et al.*, 2011 ; Schutter *et al.*, 2012, Talati *et al.*, 2013), les déficits de l'attention – hyperactivité (An *et al.*, 2013 ; Tomasi *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2013) et l'autisme (Marko *et al.*, 2015 ; Wegiel *et al.*, 2014).

Si le cervelet est principalement décrit comme une structure impliquée dans l'équilibre et le contrôle moteur, de nombreuses études ont contribué à démontrer qu'il intervenait également dans d'autres fonctions comme la régulation des émotions, l'inhibition de prise de décision impulsive, l'attention, la mémoire de travail (Andreasen *et al.*, 2008 ; Bugalho *et al.*, 2006 ; Gottwald

et al., 2003 ; Ravizza *et al.*, 2006 ; Schmahmann *et al.*, 2007) ou encore l'apprentissage (Doya *et al.*, 2000 ; Moustafa *et al.*, 2013 ; Schweighofer *et al.*, 2001). Ces résultats sont supportés par le fait que certaines régions cérébelleuses se projettent sur les aires motrices, mais aussi sur le cortex préfrontal et le système limbique.

1.1. Déficits de l'attention, hyperactivité (DAH) et cervelet

Chez l'adolescent âgé de 15 à 18 ans souffrant de déficits de l'attention ou d'hyperactivité, une diminution de volume de l'encéphale et du cervelet ont été observées (Castellanos *et al.*, 2002). Une autre étude longitudinale qui a suivi des enfants souffrants des mêmes déficits sur une période de 2 à 14 ans, a comparé les différences de volume du cervelet chez ces patients et un groupe « contrôle ». Les enfants atteints de DAH présentaient une réduction de volume du vermis par rapport au groupe « contrôle » (Mackie *et al.*, 2007). Cependant les auteurs n'ont pas pu déterminer si les anomalies cérébelleuses observées étaient présentes dès la naissance ou si elles s'étaient développées durant la croissance de l'enfant.

1.2. Troubles du spectre autistique (TSA) et cervelet

Les TSA sont définis comme des troubles envahissants du développement. Ils incluent un ensemble de symptômes qui peuvent être caractérisés par la triade suivante, 1) troubles moteurs, tels que des mouvements stéréotypés et répétitifs ; 2) déficits dans les interactions sociales ; 3) anomalies de la communication verbale et non verbale.

Le cervelet se projetant indirectement via le thalamus sur le cortex moteur et le cortex préfrontal, deux structures impliquées dans le contrôle moteur et les fonctions cognitives sociales, est une structure d'intérêt dans l'étude des TSA.

Trois anomalies architectoniques majeures sont fréquemment observées chez les patients atteints de TSA :

- 1) Une diminution du volume du cervelet (Phillips *et al.*, 2015) ;
- 2) Des anomalies de nombre et des anomalies fonctionnelles de cellules de Purkinje ;

En utilisant un modèle animal, Tsai *et al.* (2012) ont démontré que les souris dont la fonctionnalité des cellules de Purkinje était perturbée présentaient un comportement proche des TSA, notamment un comportement moteur et social anormal (Tsai *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2014). Ces résultats semblent confirmer les études *post mortem* effectuées chez l'homme. En effet, ces dernières ont montré une diminution du nombre des cellules de Purkinje chez les patients atteints de TSA (Wang *et al.*, 2014 ; Skefos *et al.*, 2014). Etant donné que les cellules de Purkinje sont des cellules inhibitrices, une moindre quantité de ces cellules engendre un

défaut d'inhibition sur les aires corticales et sous-corticales induisant ainsi une hyperactivation des régions cérébrales observée chez la plupart des patients TSA (Baron-Cohen *et al.*, 2009).

3) Un défaut des boucles de rétrocontrôle entre les aires cérébelleuses et cérébrales.

De plus, plusieurs études ont démontré que les défauts d'adaptation des comportements sociaux observés chez les patients atteints de TSA pourraient résulter d'un rétro contrôle déficient des circuits neuronaux établis entre le cervelet et le cortex cérébral (Rogers *et al.*, 2013 ; Sivaswamy *et al.*, 2010). Par ailleurs, les fibres des pédoncules cérébelleux moyens et inférieurs connectant le cervelet au lobe frontal sont désorganisées. Ces déficits organisationnels pourraient expliquer les déficits de coordination, et l'ataxie observés chez certains patients souffrants de TSA (Dunn *et al.*, 2001).

1.3. Schizophrénie et cervelet

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique sévère, hautement liée à des facteurs génétiques, environnementaux et neuro développementaux. Les symptômes apparaissent généralement à la fin de l'enfance ou au début d'adolescence. Ils regroupent des troubles de la pensée (idées délirantes, hallucinations), un langage désordonné, un comportement anormal ou catatonique (*American psychiatric association*, 2013). Les patients rapportent également des déficits cognitifs tels que des troubles de la mémoire (Aleman *et al.*, 1999), de l'apprentissage (Saykin *et al.*, 1991) et des fonctions exécutives (Ueland *et al.*, 2004). Plusieurs de ces symptômes sont similaires aux symptômes observés chez les patients atteints de lésion du cortex cérébelleux (Langegrebe *et al.*, 2006 ; Vitrac *et al.*, 2017).

Des études de neuro-imagerie menées chez des patients schizophrènes ont montré que les déficits cognitifs observés pouvaient être liés à un dysfonctionnement cérébelleux, notamment causé par des connections cortico-cérébelleuses anormales (Uledand *et al.*, 2004 ; Konarski *et al.*, 2006 ; Laidi *et al.*, 2015). Certains auteurs suggèrent que ces altérations des circuits cortico-ponto-cérébello-thalamo-corticaux pourraient être considérées comme un mécanisme étiopathogénique de la schizophrénie. Par ailleurs, par le biais de l'imagerie fonctionnelle, Andreasen *et al.* (1996) ont évalué l'activité cérébrale des patients schizophrènes soumis à un exercice de mémoire. Ils ont ainsi démontré que ces patients présentaient un niveau d'activité plus faible des circuits cortico-ponto-cérébello-thalamo-corticaux en comparaison à un groupe de patients sains.

D'autres études d'imagerie structurale ont mis en évidence une réduction de volume du cervelet notamment du vermis chez les patients schizophrènes (Levitt *et al.*, 1999 ; Nopoulos *et al.*, 1999).

Une diminution du flux sanguin du cortex cérébelleux, notamment du vermis durant des tâches cognitives comme l'attention, la mémoire, incluant des tâches à court à terme, la mémoire de travail (Crespo-Facorro *et al.*, 2007), et les interactions sociales (Andreasen *et al.*, 2008) a été observée par imagerie fonctionnelle chez les patients schizophrènes.

En résumé, chez ces patients, plusieurs anomalies cérébelleuses ont été observées, comme une diminution de volume, une diminution du flux sanguin ou encore des voies neuronales corticales dysfonctionnelles. Cependant, ces caractéristiques sont également communes à d'autres pathologies (TSA, DAH). Chez les patients TSA, la réduction de volume du cervelet pourrait être liée à la diminution du nombre de cellules de Purkinje. Chez les patients schizophrènes et les patients sains, le nombre de cellules de Purkinje est identique (Andersen *et al.*, 2003). La diminution de volume du cervelet chez les patients schizophrènes pourrait s'expliquer par une réduction ou par l'absence de certaines régions du cervelet (Phillips *et al.*, 2015) .

1.4. Troubles bipolaires et cervelet

Selon *American psychiatric association* (2013), les troubles bipolaires sont définis par une alternance de périodes maniaques et dépressives, les symptômes dépressifs survenant immédiatement après un épisode maniaque. Ce dernier est caractérisé par un sentiment de grandeur, une euphorie, une hyperactivité et un caractère impulsif alors que les symptômes dépressifs regroupent un manque de motivation, une déficience ou agitation psychomotrice (*American psychiatric association*, 2013). Les mécanismes physiopathologiques exacts des symptômes des troubles bipolaires et le mode d'action des traitements comme le lithium ne sont pas parfaitement connus. Plusieurs études ont démontré des modifications cérébelleuses, notamment une atrophie chez ces patients souffrant de troubles bipolaires (Baldacara *et al.*, 2011 ; Andreasen *et al.*, 2008 ; Brambilla *et al.*, 2002 ; Jurjus *et al.*, 1994 ; Monkul *et al.*, 2008).

Soares et Mann (1997) ont mis en évidence une diminution du volume de certaines régions cérébelleuses chez les patients atteints de troubles bipolaires et chez les patients souffrant d'épisodes dépressifs majeurs en comparaison à des patients sains. Cette diminution de volume était corrélée à la progression de la maladie et à la sévérité des symptômes. En comparaison à des patients sains, le volume de la région vermienne V3 (correspondant aux lobules VIII – X de la classification de Larsell et Jansen, 1972) était réduit de manière significative chez les patients qui rapportaient de multiples épisodes bipolaires. Le volume du vermis V2 (correspondant aux lobules VI – VII de la classification de Larsell et Jansen, 1972) était également plus faible chez les patients ayant connu plusieurs crises en comparaison au volume mesuré lors d'un premier épisode bipolaire. Ces résultats ont été confirmés par Mills *et al.* (2005). Cependant une étude plus récente, n'a

montré aucune différence de volume du cervelet entre les patients bipolaires et les patients sains (Laidi *et al.*, 2015). A noter que dans cette étude, les antécédents médicamenteux des patients n'ont pas été pris en compte. Or il a été démontré que la réduction de volume du cervelet était moindre chez les patients sous traitement médicamenteux (*anti-manic drug regime*) alors qu'elle est plus importante chez les patients non traités (Kim *et al.*, 2013).

Enfin une étude réalisée par imagerie fonctionnelle (IRM) a montré que les patients bipolaires résistants aux traitements présentaient un hypermétabolisme du glucose au sein de cervelet (Ketter *et al.*, 2001).

1.5. Syndrome dépressif majeur (SDM) et cervelet

Le diagnostic de syndrome dépressif majeur s'établit après l'apparition d'au moins un épisode dépressif qui se caractérise par des symptômes cognitifs et moteurs (*American psychiatric association*, 2013). Le plus fréquemment, les symptômes cognitifs regroupent des difficultés d'attention ou des difficultés à prendre des décisions (*American psychiatric association*, 2013), fonctions supportées par le système limbique et le cortex préfrontal (Drevets *et al.*, 2000). Les patients souffrant de SDM présentent également de nombreuses anomalies cérébelleuses. Le volume du vermis, une région cérébelleuse impliquée dans la régulation des émotions et la cognition, était réduit chez les patients SDM (Yucel *et al.*, 2013 ; Brambilla *et al.*, 2002).

Le flux sanguin dans le vermis semble également être modifié. Les patients dépressifs sous différents types de traitements montrent une activité métabolique neuronale et un flux sanguin cérébelleux augmentés (résultats obtenus par analyses d'IRM fonctionnelle). Ces résultats étaient positivement corrélés à la sévérité des épisodes dépressifs, à la sévérité des déficits cognitifs et à la résistance aux traitements antidépresseurs (Guo *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2012 ; Liotti *et al.*, 2002).

De plus, chez les patients dépressifs non traités, certains auteurs ont observé des anomalies dans les circuits nerveux entre le cervelet et le cortex cingulaire antérieur (Ma *et al.*, 2013), impliqué dans les émotions affectives, les rapports sociaux, le contrôle moteur et la motivation (Paus, 2001).

Les circuits neuronaux entre le cervelet et le lobe frontal étaient également perturbés chez les patients dépressifs majeurs, chez les patients dépressifs résistants aux traitements (Schmahmann *et al.*, 2007) et dans la population gériatrique dépressive (Alalade *et al.*, 2011).

En résumé, les études ont montré que les patients souffrant de syndrome dépressif majeur présentaient une réduction de volume du cervelet, une activité cérébelleuse augmentée, et des anomalies des circuits neuronaux impliquant le cervelet. Il est à noter que l'hyperactivité

métabolique neuronale du cervelet ne semble pas être liée aux changements d'humeur chez les patients dépressifs (Kimbrell *et al.*, 2002 ; Graeff, 2007).

1.6. Conclusion

La réduction de volume du cervelet a été observée dans plusieurs pathologies psychiatriques (syndrome dépressif majeur, ADHD, schizophrénie). Cette diminution de volume est plus particulièrement observée dans le vermis chez les patients dépressifs et ADHD, or cette région est connue pour être impliquée dans l'attention (Baldacara *et al.*, 2011 ; Townsend *et al.*, 1999). Ce défaut de taille est également mis en évidence chez les patients bipolaires qui présentent des déficits de l'attention (Torres *et al.*, 2007). Cependant, pour une même anomalie, ici la réduction de volume du vermis, plusieurs symptômes différents sont observés en fonction de la pathologie. Chaque région cérébelleuse se projette sur différentes régions du cortex cérébral et du mésencéphale (Sang *et al.*, 2012), la variabilité des symptômes suggère que chaque pathologie psychiatrique implique un ou plusieurs lobules cérébelleux spécifiques plutôt que le cervelet dans son ensemble.

2. Le cervelet

Le cervelet est classiquement considéré comme une structure supra-segmentaire du système nerveux central impliquée dans l'équilibre, la posture, les mouvements rapides des yeux et la coordination des mouvements. Il participe également à la régulation d'autres fonctions telles que les fonctions cognitives et la programmation du mouvement ainsi que dans les régulations émotionnelles et végétatives de par ses connexions réciproques avec l'hypothalamus (Vuillier *et al.*, 2011 ; Manto et Habas, 2013). Le cervelet partage des fonctions communes avec l'hippocampe dans l'apprentissage et la mémorisation.

2.1. Organisation anatomique et fonctionnelle du cervelet

Macroscopiquement, le cervelet est constitué de 2 parties : le cortex cérébelleux composé d'un vermis impair et médian entouré de part et d'autre par un hémisphère et les noyaux cérébelleux profonds au nombre de trois de chaque côté. Plusieurs divisions du cervelet ont été décrites en se basant :

- 1) sur la structure anatomique grâce aux différentes fissures (fissure primaire et fissure secondaire). Celles-ci permettent de diviser le cervelet en lobes antérieur, postérieur, et flocculo-nodulaire, eux même constitués de plusieurs lobules (*Figures 1 et 2*) ;

- 2) sur l'évolution phylogénétique qui propose ainsi trois parties distinctes : l'archécerebellum qui correspond en partie au lobe flocculo-nodulaire, le palécerebellum qui est constitué de la majeure partie du lobe antérieur et d'une petite partie du lobe postérieur et le néocerebellum qui correspond à la majeure partie du lobe postérieur (Larsell et Jansen, 1972) (Figure 2) ;
- 3) sur l'organisation fonctionnelle et la sémiologie clinique autrement dit sur le type d'afférences reçues par le cervelet (Ito *et al.*, 1990 ; Nieuwenhuys *et al.*, 1988). Cette division fonctionnelle est décrite dans le plan sagittal et distingue les cervelets médian, intermédiaire et latéral. Pour chacun de ces cervelets, le cortex cérébelleux est associé à un noyau profond (Tableau 1). S'ajoute à cette organisation fonctionnelle le lobe flocculo-nodulaire.

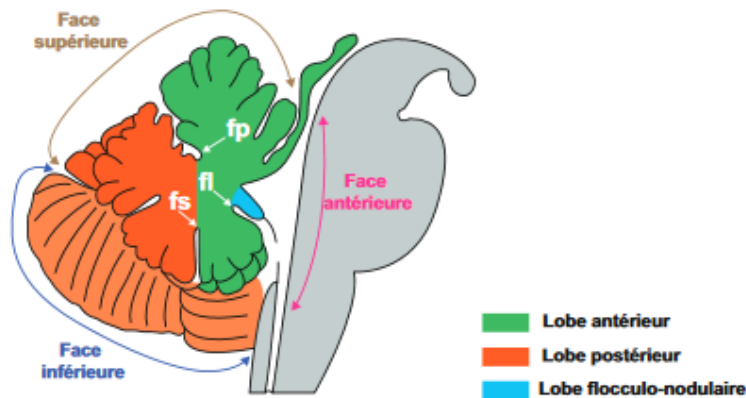


Figure 1 : Coupe sagittale médiane schématisée du cervelet. Les nombreuses fissures et sillons qui parcourent la surface du cervelet permettent de délimiter les lobes et les lobules du cervelet. Ainsi la fissure primaire (fp) sépare le lobe antérieur du lobe postérieur alors que la fissure postérolatérale (fl) sépare le lobe antérieur du lobe flocculo-nodulaire (Vuillier *et al.*, 2011).

mouvements des muscles axiaux et des muscles proximaux des membres (Ito, 1984 ; Nieuwenhuys *et al.*, 1988 ; Duvernoy, 1995).

Le cervelet latéral intervient dans la programmation du mouvement et plus particulièrement dans sa temporalité. Il est également impliqué dans l'apprentissage de nouveaux mouvements. Il permet donc d'assurer un enchaînement progressif et coordonné des mouvements successifs (Nieuwenhuys *et al.*, 1988 ; Duvernoy, 1995).

La fonction principale du lobe flocculo-nodulaire est d'assurer l'équilibre postural du corps (Nieuwenhuys *et al.*, 1988). Par ailleurs, il intervient dans la coordination de certains mouvements réflexes de la tête et des yeux.

Autres fonctions du cervelet

La mise en évidence de voies anatomiques reliant le cervelet aux aires associatives du cortex non moteur a laissé supposer que le cervelet, en parallèle de ses fonctions motrices, est également impliqué dans la régulation des émotions et des fonctions cognitives (Baillieux *et al.*, 2008). Les observations cliniques et les données obtenues par imagerie fonctionnelle ont montré qu'il existe une dichotomie fonctionnelle entre le lobe antérieur (lobules I-V) et le lobule VIII et le lobe postérieur (lobules VI, VII incluant les lobules crus I, crus II).

La neuro-imagerie fonctionnelle chez l'homme a permis de montrer une activation 1) du lobe antérieur (lobules I-V), de la région paravermienne du lobule VI et du lobule VIII durant l'exécution de tâches sensorimotrices par le patient ; 2) du lobe postérieur (région vermienne du lobule VI et lobules VII, ainsi que crus I et crus II) durant l'exécution de tâches impliquant le langage, la mémoire de travail, les fonctions exécutives ou lors de tâches affectives et spatiales (Stoodley et Schmahmann, 2010).

Différentes études ont mis en évidence la présence de troubles moteurs tels qu'une ataxie, une altération de l'équilibre et de la démarche chez les patients présentant une lésion tumorale ou ayant subi un accident vasculaire cérébral localisés au niveau du noyau fastigial, du lobe antérieur (région vermienne des lobules I-III), des lobules VIII et IX du lobe postérieur (Ilg *et al.*, 2008 ; Konczak *et al.*, 2005 ; Schoch *et al.*, 2006).

D'autres auteurs ont présenté une série d'images émotionnelles ou neutres selon les critères de l'IAPS (*international affective picture scale*, Lang *et al.*, 2005) à des patients soumis à un IRM fonctionnel et à un PETScan. Les résultats ont montré une activation :

1) du vermis dans les situations évoquant une situation triste et de deuil (Beauregard *et al.*, 1998 ; Gundel *et al.*, 2003 ; Lane *et al.*, 1997) ;

2) du lobe antérieur de cervelet devant des images évoquant une expérience douloureuse (Becerra *et al.*, 1999 ; Borsook *et al.*, 2007 ; Ploghaus *et al.*, 1999 ; Singer *et al.*, 2004) ;

3) du lobe postérieur du cervelet dans l'anticipation de la douleur (Ploghaus *et al.*, 1999).

Chez l'homme, une entité sémiologique qualifiée de « syndrome cérébelleux affectif et cognitif » regroupe des troubles des fonctions exécutives (ensemble de processus cognitifs dont le rôle principal est de faciliter l'adaptation aux nouvelles situations ou aux situations complexes), des troubles visuo-spatiaux, une perte partielle de la mémoire, des troubles de langage et des troubles émotionnels mais aucun signe moteur (Schmahmann et Sherman, 1998). Ce syndrome est associé à une lésion touchant exclusivement le vermis et le lobe postérieur du cervelet. De plus, chez l'enfant atteint de tumeur cérébelleuse localisée au vermis postérieur, après chirurgie d'exérèse tumorale, ont été observés 1) des changements de personnalité, des troubles affectifs, un mutisme postopératoire qui évolue secondairement en troubles de langage, de la parole et en troubles comportementaux (anxiété, agressivité, troubles de l'attention) (Richter *et al.*, 2005) ; 2) une hyper-spontanéité, un comportement désinhibé (Aarsen *et al.*, 2004). Lorsque la lésion tumorale n'est pas extensive dans la région vermienne, aucun désordre émotionnel n'a été mis en évidence (Levisohn *et al.*, 2000). D'autres études ont montré qu'une malformation ou une agénésie de la région vermienne postérieure était associée à des déficits cognitifs et des symptômes émotionnels (Tavano *et al.*, 2007). Cette région est également la principale région cérébelleuse qui présente des différences structurales chez les patients atteints de TSA (Bauman et Kemper, 2005 ; Courchesne *et al.*, 1998 ; Penn, 2006).

Ces études cliniques montrent que le vermis postérieur est une structure impliquée dans la modulation des émotions. Il pourrait être qualifié de « pacemaker émotionnel » (Heath, 1977).

Stoodey et Schmahmann (2010) ont proposé une organisation topographique du cervelet : 1) le lobe antérieur correspondrait au cervelet sensori-moteur impliqué dans le contrôle du mouvement ; 2) le lobe postérieur correspondrait à la partie plus cognitive ; 3) la partie postérieure du vermis correspondrait au cervelet limbique (*Figure 3*).

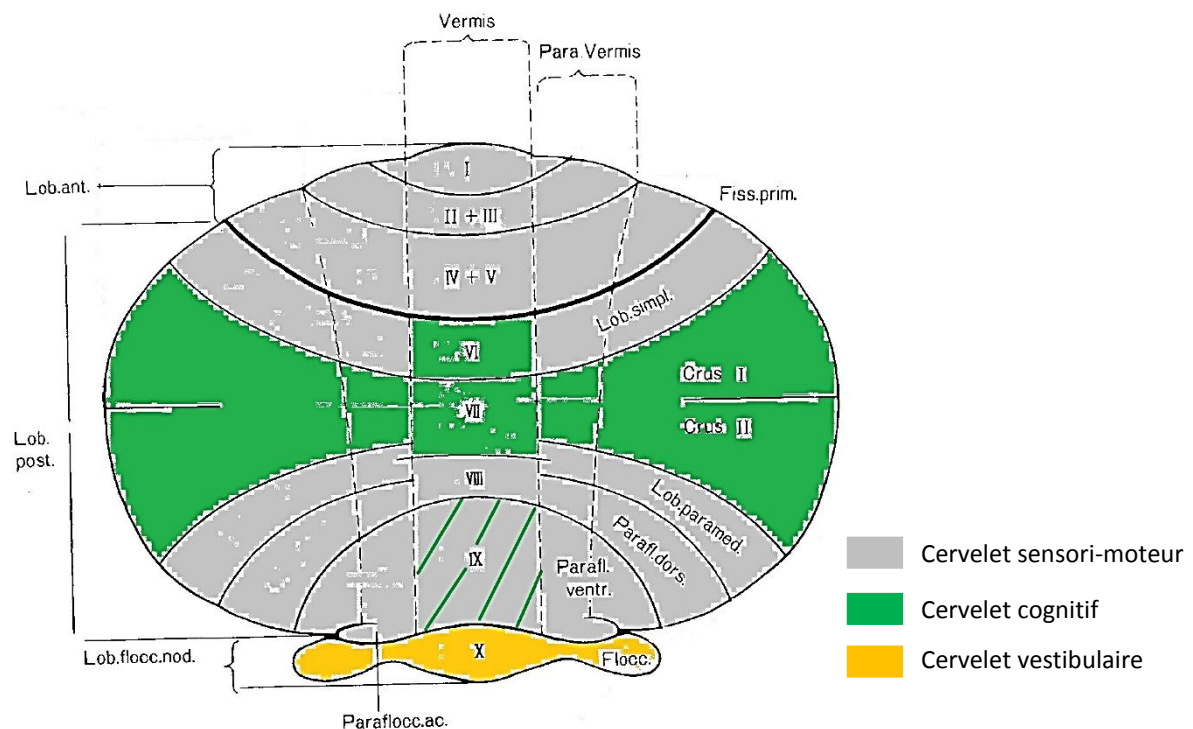


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du cervelet. A noter que la région vermienne postérieure et le noyau fastigial sont qualifiés de cervelet limbique (donnée non illustrée sur le schéma). Lob. Ant. : Lobe antérieur ; Lob. Post. : Lobe postérieur ; Lob. Flocc. Nod. : Lobe Flocculo-nodulaire ; Fiss. Prim. : Fissure primaire. Flocc. : Flocculus ; Paraflocc. ac. : Paraflocculus accessorius. D'après Vuillier et al., 2011 ; Stoodley et Schmahmann, 2010.

Par ailleurs d'autres auteurs en s'appuyant sur des données cliniques obtenues par IRM fonctionnelle ont décrit une autre organisation fonctionnelle hémisphérique. L'hémisphère cérébelleux droit intervient plus spécifiquement dans les fonctions du langage alors que l'hémisphère gauche est plus spécialisé dans les fonctions visuo-spatiales (Ackermann *et al.*, 2007 ; Molinari et Leggio, 2007).

Les afférences du cervelet (Vuillier *et al.*, 2011 ; Purves *et al.*, 2011)

Les principales afférences du cervelet sont détaillées dans le tableau 2. Le cervelet reçoit de nombreuses afférences en lien avec ses différentes fonctions sensori-motrices, cognitives et son implication dans les régulations émotionnelles et végétatives. Des informations spinales, vestibulaires, trigéminales ou encore visuelles issues de la périphérie sont transmises au cervelet après avoir fait relais dans des structures segmentaires. Ces afférences véhiculent des informations correspondant à la proprioception inconsciente et consciente ou en rapport avec la sensibilité épicrotique. Parallèlement, le cervelet reçoit des afférences de structures supra-segmentaires telles

que les noyaux du pont recevant les informations du cortex cérébral, la formation réticulée et l'olive bulbaire. Ces différentes voies permettent au cervelet d'exercer un contrôle sur la motricité.

Par ailleurs, des informations en provenance du système nerveux autonome sont transmises au cervelet, elles lui permettent ainsi de réguler certaines fonctions végétatives. Enfin, des fibres mono-aminergiques se projettent sur le cervelet afin d'exercer un rôle de modulation dans la transmission synaptique.

Les informations issues de l'olive bulbaire sont transmises à la cellule de Purkinje par les fibres grimpantes alors que toutes les autres sont véhiculées à la cellule de Purkinje par les fibres moussues qui font synapses avec les cellules à grains qui elle-même font synapses avec la cellule de Purkinje par le biais des fibres parallèles.

Les efférences du cervelet (Vuillier *et al.*, 2011 ; Purves *et al.*, 2011)

Le cortex cérébelleux se projette tout d'abord sur les noyaux cérébelleux profonds, schématiquement le cérébro-cervelet se projette principalement sur le noyau denté, le spino-cervelet sur les noyaux interposés et le vestibulo-cervelet sur le noyau fastigial.

Le lobe flocculo-nodulaire se projette sur le noyau vestibulaire latéral qui émet 1) le tractus vestibulospinal latéral modulant ainsi le tonus musculaire et le maintien de l'équilibre postural ; 2) le tractus vestibulospinal médial. Les efférences du noyau fastigial gagnent les noyaux vestibulaires médial et inférieur et la formation réticulée avant de se projeter sur la moelle spinale formant ainsi respectivement les voies vestibulospinale et réticulospinale. Par ces voies, le cervelet médian intervient sur l'équilibre postural et le tonus musculaire. Parallèlement, le noyau fastigial émet des efférences vers 1) le noyau ventral latéral du thalamus avant d'atteindre le cortex moteur et 2) la formation réticulée paramédiane pontine.

Le cervelet intermédiaire se projettent par l'intermédiaire des noyaux interposés sur :

- le noyau ventral latéral du thalamus controlatéral puis sur le cortex moteur. Cette voie permet de moduler le fonctionnement de la voie motrice principale en ajustant les paramètres cinématiques (durée, direction, vitesse et amplitude) afin d'assurer la précision du mouvement mais aussi l'arrêt du mouvement.
- la formation réticulée qui envoie des afférences vers la moelle spinale formant ainsi le faisceau réticulospinal dont l'un des rôles serait de moduler le tonus musculaire.
- la partie magnocellulaire du noyau rouge (le paleorubrum), qui émet des afférences vers la moelle spinale formant ainsi la voie rubrospinale qui participerait à la réalisation précise du geste final.

La voie cortico-ponto-cérébelleuse se projette sur le cortex cérébelleux qui lui-même se projette sur le noyau denté dont les efférences se dirigent vers le noyau ventral latéral du thalamus et d'autres noyaux diffus avant de gagner le cortex moteur formant ainsi la boucle cortico-ponto-

cérébello-thalamo-corticale. Le rôle de cette boucle est d'assurer un enchaînement progressif et coordonné des mouvements successifs (Nieuwenhuys *et al.*, 1988 ; Duvernoy, 1995). Le noyau denté émet des collatérales vers le noyau rouge parvocellulaire qui lui-même se projette sur l'olive bulbaire inférieure afin d'exercer un rétrocontrôle sur l'une des principales afférences du cervelet (fonction adaptative).

Les principales afférences et efférences du cervelet sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Principales afférences et efférences du cervelet. D'après Laget, 1973 ; Ito, 1984 ; Strazielle et al., 1998 ; Vuillier et al., 2001, Purves et al., 2011. VTA : Aire tegmentale ventrale ; VL : ventro-latéral ; VM : ventro-médian.

Afférences	Efférences
Moelle spinale - faisceau spino-cérébelleux dorsal - faisceau spino-cérébelleux ventral	Noyaux du thalamus (VL, VM, Reuniens- rhomboïde) Relais vers le cortex moteur
Noyau cunéiforme accessoire - faisceau cunéo-cérébelleux	Formation réticulée pontique, bulbaire et mésencéphalique Relais vers : - la moelle spinale - les noyaux sensitivo-moteurs du tronc cérébral
Noyaux trigéminaux - faisceau trigémino-cérébelleux dorsal - faisceau trigémino-cérébelleux ventral - fibres trigéminales (nerf V)	Noyau rouge - magnocellulaire Relais vers la moelle spinale - parvocellulaire Relais vers : - l'olive bulbaire inférieure - les noyaux du thalamus
Noyaux vestibulaires - faisceaux vestibulo-cérébelleux - fibres vestibulaires (nerf VIII)	Noyaux vestibulaires
Noyaux végétatifs (noyaux du faisceau solitaire, moteur du nerf vague et parabrachial) - fibres du nerf glossopharyngien (IX) - fibres du nerf vague (X)	Colliculus supérieur (tectum)
Formation réticulée bulbaire et pontique - noyau réticulaire latéral - noyau réticulaire paramédian - noyau réticulaire tegmental du pont - noyaux prepositus	
Noyaux du pont Relais du : - cortex cérébral (cortex moteur primaire, aires prémotrices du lobe frontal, cortex somesthésiques primaire et secondaire du lobe pariétal antérieur, aires visuelles secondaires du lobe pariétal postérieur, cortex cingulaire) - hippocampe - tectum du mésencéphale	
Olive bulbaire Relais du : - cortex moteur - hypothalamus - noyaux du mésencéphale (noyau rouge, formation réticulaire, substance grise périaqueducale) - moelle spinale, complexes nucléaires vestibulaire, trigéminal et tectal	
Fibres mono-aminergiques - sérotoninergiques (noyaux raphé dorsal et médian) - dopaminergiques (VTA et substance noire) - noradrénergiques (locus coeruleus).	

2.2. Organisation histologique du cervelet

Comme vu précédemment, le cervelet est composé 1) d'un cortex cérébelleux formé d'une partie centrale, le vermis, entourée latéralement par deux hémisphères cérébelleux et 2) de noyaux profonds. D'un point de vue architectural, les cellules du cortex cérébelleux s'organisent en trois couches distinctes, de la profondeur vers la surface externe du cortex : la couche des cellules à grains, la couche des cellules de Purkinje et la couche moléculaire.

L'organisation fonctionnelle de ces trois couches est bien connue (Manto et Habas, 2013). La couche granulaire se compose de neurones, les grains, et de deux types d'interneurones inhibiteurs GABAergiques : les cellules de Golgi et de Lugaro. Les cellules à grains émettent un axone ascendant qui traverse les couches sus-jacentes et qui se divise en deux branches de direction opposée pour former les fibres parallèles dans la couche moléculaire. L'extrémité dendritique de ces cellules effectue un contact synaptique avec les terminaisons renflées des fibres moussues afférentes formant ainsi une rosette. Les dendrites des grains et les terminaisons des fibres moussues peuvent également s'associer aux axones des cellules de Golgi au sein de glomérules. La couche des cellules de Purkinje est une couche monostratifiée constituée par la juxtaposition des corps cellulaires des cellules de Purkinje qui sont les cellules effectrices du cortex cérébelleux. De nature GABAergique, elles se projettent sur les noyaux cérébelleux profonds. Leur arborisation dendritique s'étend sur toute la hauteur de la couche moléculaire et se charge dès la troisième bifurcation d'épines dendritiques. La couche moléculaire renferme essentiellement 1) les arbres dendritiques des cellules de Purkinje qui reçoivent au niveau distal les fibres parallèles émises par les cellules à grains et au niveau proximal, sur les troncs lisses, les fibres grimpantes issues de l'olive bulbaire ; et 2) deux types d'interneurones GABAergiques : les cellules à panier et les cellules étoilées ; ces deux types cellulaires exerçant respectivement un contrôle inhibiteur sur les sorties et les entrées des cellules de Purkinje (*Figure 4*).

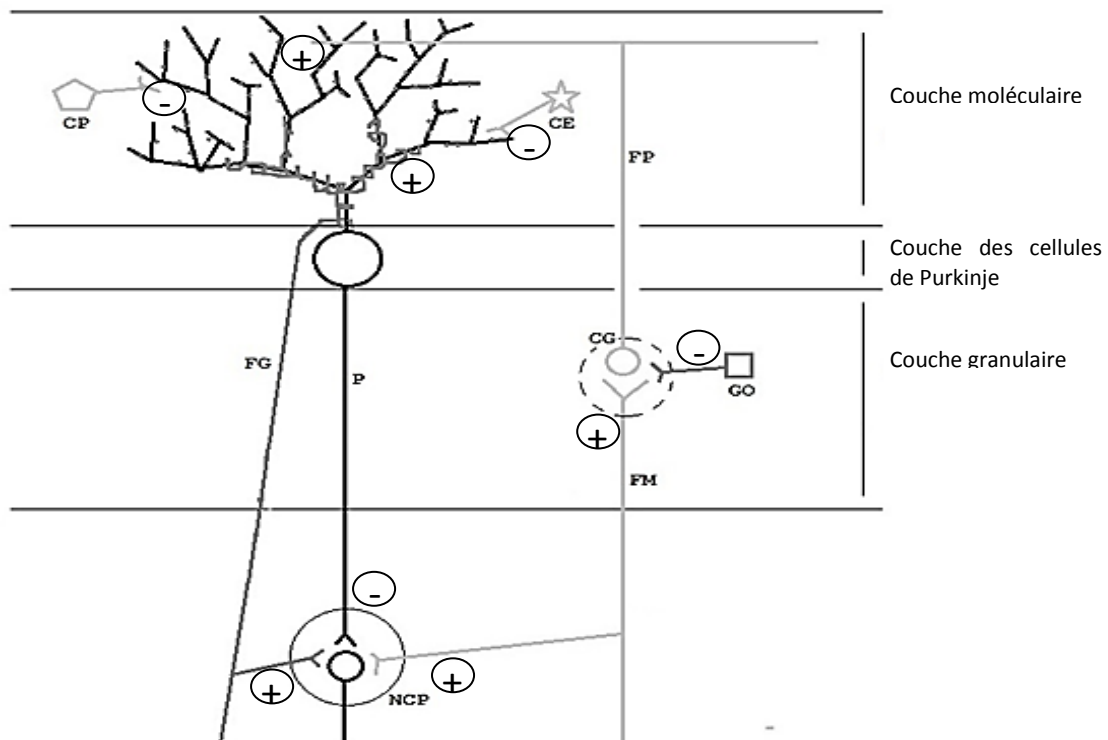


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation cytotologique du cervelet. La cellule de Purkinje, cellule effectrice du cervelet, reçoit deux types afférences : les fibres grimpantes qui proviennent de l'olive inférieure et les fibres moussues qui proviennent des noyaux du pont, du tronc cérébral, de la moelle épinière et du système vestibulaire. Ces fibres moussues font synapse sur les grains dans la couche granulaire. L'axone des grains traverse les couches sus-jacentes et se divise en deux branches pour former les fibres parallèles. Les cellules à panier et les cellules étoilées exercent un contrôle inhibiteur sur les cellules de Purkinje. CP : Cellule à panier ; CE : cellule étoilée ; FP : fibres parallèles ; CG : cellule à grains ; GO : cellule de Golgi ; FM : fibres moussues ; FG : fibres grimpantes ; P : cellule de Purkinje et NCP : noyau cérébelleux profond.

2.3..Développement postnatal du cervelet

Le cervelet, comme l'hippocampe et le cortex cérébral, est une structure dont le développement débute en prénatal puis se poursuit tardivement jusqu'à la fin de la troisième semaine postnatale (Manto et Habas, 2013). Les futures cellules de Purkinje quittent le neuro-épithélium pour former initialement une couche pluricellulaire (E13-E15). Elles commencent à recevoir alors une multi-innervation par les fibres grimpantes, projections afférentes de l'olive bulbaire. Ainsi, dans un premier temps, plusieurs fibres grimpantes se projettent sur chaque cellule de Purkinje. Simultanément, les précurseurs des grains adoptent un trajet tangentiel et forment en superficie la couche granulaire externe recouvrant la couche des cellules de Purkinje.

A la naissance, la mise en place des cellules de Purkinje est effective selon une couche monocellulaire et la couche granulaire externe se divise en deux zones distinctes, une zone externe où les futurs grains se multiplient sous l'influence de facteurs mitogènes libérés par les cellules de Purkinje, et une zone interne qui correspond à une zone de migration. Dans cette dernière zone, les grains émettent deux expansions polaires horizontales et une expansion verticale qui s'enfonce en

profondeur en direction des fibres moussues. Lorsque cette expansion verticale atteint la couche moléculaire, le soma des futurs grains descend le long de cette expansion par translocation en direction de la future couche granulaire interne. Les expansions horizontales fusionnent en T au sommet de l'expansion verticale formant ainsi les fibres parallèles qui établissent dans un premier temps des contacts synaptiques avec les dendrites proximales des cellules de Purkinje (pic J8-J15 PN). La couche granulaire externe disparaîtra au terme de la migration descendante des grains (J21 PN).

A partir de J8 PN, sous la dépendance des cellules à panier, les dendrites primaires des cellules de Purkinje développent leur arborisation par bifurcations successives au sein de la couche moléculaire. A partir de J12 PN, les dendrites secondaires et tertiaires poursuivent leur développement selon le même mécanisme, jusqu'au sommet de la couche granulaire externe, sous la dépendance des cellules étoilées. Ces dendrites se couvrent en distal d'épines dendritiques.

La multi-innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpanes (J3 à J7 PN) évolue secondairement vers une mono-innervation postnatale. En effet, initialement plusieurs fibres grimpanes entrent en contact synaptique avec la base du soma des cellules de Purkinje puis au pôle apical de ces cellules et enfin sur l'arbre dendritique naissant. Il se produit ensuite une compétition fonctionnelle entre les différentes fibres grimpanes mêlées dans le nid périsonatique selon 4 phases distinctes (Choo *et al.*, 2017). La première phase correspond à un processus de sélection fonctionnelle, au cours de laquelle la fibre grimpanne la plus active est conservée. A partir de J9 PN, une translocation de la fibre grimpanne sélectionnée est observée au niveau des dendrites primaires en croissance de la cellule de Purkinje. Parallèlement, les autres fibres moins actives régressent lors de deux dernières phases distinctes. De J7 à J11 PN, des phénomènes d'apoptose permettent l'élimination des fibres non sélectionnées. Puis de J12 à J17 PN, la phase d'élimination qualifiée de tardive débute lorsque les fibres parallèles ont établi des contacts synaptiques avec l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (Watanabe *et al.*, 2011 ; Hashimoto et Kano, 2013 ; Hashimoto *et al.*, 2009). Ainsi une cellule de Purkinje adulte ne se connecte plus qu'à une seule fibre grimpanne au niveau de ses dendrites primaires. De J15 à J30 PN, la fibre grimpanne sélectionnée se développant autour des dendrites proximales, les synapses établies entre les fibres parallèles et les dendrites proximales des cellules de Purkinje sont éliminées. Seules les synapses au niveau des fibres distales sont conservées (Ichikawa *et al.*, 2016) et stabilisées grâce à la présence du récepteur GluR δ 2 (associée au peptide Cbln1) qui empêche ainsi la fibre grimpanne d'établir des synapses au niveau des fibres distales. De plus, entre J15 et J16 PN, l'expression des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) au sein des synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje est essentielle à l'élimination des fibres grimpanes (Kakizawa *et al.*, 2000). Les synapses

périsomatiques avec les fibres grimpantes sont remplacées progressivement par des synapses avec les cellules à panier (*Figure 5*).

Les précurseurs des interneurons des couches granulaire interne (cellules de Golgi : E19-P2) et moléculaire (cellules étoilées pic entre J9-J10 PN et à panier pic entre J4-J7 PN) quittent la zone ventriculaire issue du neuroépithélium pour gagner la substance blanche présomptive où ils se divisent et y séjournent plusieurs jours avant de reprendre leur migration vers leur couche cellulaire respective. Le placement précis des futures cellules de Golgi au sein de la couche granulaire semble impliquer les grains. Au sein de la couche moléculaire, les précurseurs des interneurons conservent tardivement leur multipotence avant d'acquérir irréversiblement leur phénotype de cellules étoilées ou à panier sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux inducteurs (Manto et Habas, 2013).

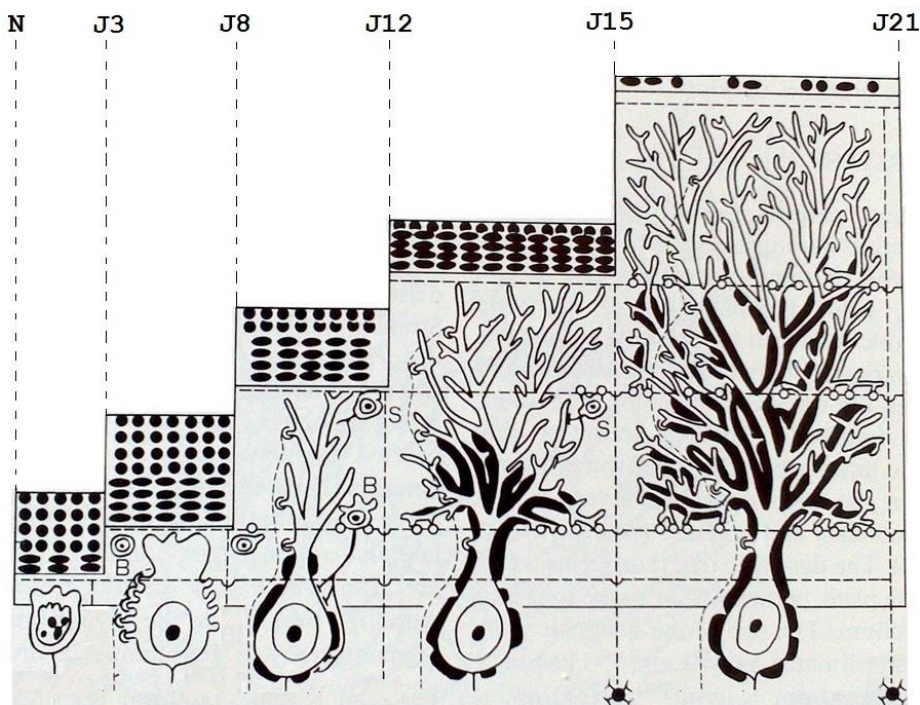


Figure 5 : Représentation schématique du développement postnatal du cervelet. Cette période est marquée par 3 événements majeurs concomitants qui sont cruciaux pour la fonctionnalité du cervelet : 1) la prolifération et la migration des précurseurs des futures cellules à grains, de la couche granulaire externe à la couche granulaire interne ; 2) la croissance de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje ; 3) l'établissement et la maturation des connexions synaptiques entre la cellule de Purkinje et ses afférences : les fibres grimpantes et les fibres parallèles D'après Altman dans ITO, 1984.

Chez la souris, le développement du cervelet s'étend sur une période de 6 semaines entre le 7^{ème} jour embryonnaire et le 30^{ème} jour postnatal. La mise en place des différentes cellules constitutives des trois couches du cortex cérébelleux et de leurs afférences fait intervenir de nombreux facteurs tels que la CRH et ses récepteurs, les glucocorticoïdes, le facteur neurotrophique *Brain-derived*

neurotrophic factor (BDNF) et ses récepteurs, les protéines du cytosquelette comme la protéine 2 associée aux microtubules (*microtubule-associated protein 2*, MAP2) et la sous-unité légère des neurofilaments (*neurofilament light chain*, NFL), ou encore le glutamate et ses récepteurs notamment GluR δ 2.

3. Corticostérone et Corticolibérine ou *Corticotropin-releasing hormone* (CRH)

3.1. L'axe Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien ou *Hypothalamic pituitary adrenal* (HPA)

La CRH, peptide de 41 acides aminés, est considérée comme une hormone du stress de par son implication dans l'activation de l'axe HPA en réponse à un stress. Cet axe implique trois structures qui vont s'activer en cascade, l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et les glandes surrénales. Sous l'effet du stress, les neurones du noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus vont sécréter la CRH. Cette hormone a pour rôle de stimuler le relargage de l'adrénocorticotrophine (*adreno-cortico-trophic hormone*, ACTH) par l'hypophyse antérieure. L'ACTH rejoint alors sa cible, la glande corticosurrénale où elle active la synthèse et la libération dans la circulation sanguine systémique de glucocorticoïdes (GC) tels que le cortisol chez l'homme ou la corticostérone chez l'animal. L'activité de cet axe est fortement régulée par plusieurs structures du SNC. Deux études ont montré qu'une administration de GC ou une adrénalectomie induisaient respectivement une diminution de l'activité des neurones du NPV de l'hypothalamus et une hypersécrétion d'ACTH. Ces résultats démontrent que la première boucle régulatrice de l'axe HPA implique les glucocorticoïdes. Ils exercent un rétrocontrôle négatif sur le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et l'antéhypophyse. L'action des GC est médiée par deux récepteurs : les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) codés par le gène *Nr3c1* et les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) codés par le gène *nr3c2*. Les GC se lient sur ces deux récepteurs avec une affinité variable. Lorsque le taux de GC est à l'état basal, les GC se fixent préférentiellement sur les MR. En revanche, si le taux de GC est élevé, ils se fixent avec une forte affinité sur les GR. Cette différence d'affinité en fonction de la concentration en GC suggère que les MR régulent l'état basal de l'axe HPA alors que les GR participent au rétrocontrôle négatif de l'axe (Smith *at al.*, 2006). Les GC modulent l'activité de l'axe HPA selon deux mécanismes distincts de cinétique différente ; 1) lors de la fixation du GC sur GR, ces derniers forment un homodimère au sein de cytoplasme de la cellule pour ensuite traverser la membrane nucléaire et se fixer sur une courte séquence de nucléotides présente dans l'ADN au niveau des promoteurs de gènes, le GRE (*glucocorticoid receptor responsive element*). Cette liaison à l'ADN permet de réprimer ou d'induire l'expression de gènes cibles. Les GR sont également capables de réguler l'expression de gènes cibles sans interagir avec le GRE mais en induisant des interactions protéines – protéines avec des facteurs de transcription comme AP-1 (*activating*

protein 1) ou NFκB (Moussard et Mouglin, 2006). Les GR sont donc considérés comme des facteurs de transcription et ce mécanisme d'action est dit génomique. 2) Parallèlement, les GR peuvent avoir une expression membranaire. Lorsque les GC se fixent sur ces récepteurs membranaires, cette liaison induit une cascade de seconds messagers et active une voie de signalisation qui *in fine* module l'expression de gènes cibles. Ce mécanisme est dit non génomique puisqu'il n'y a pas d'interaction directe des GR avec l'ADN (Nicolaidis *et al.*, 2005). Ce mécanisme d'action et son rôle physiologique sont peu décrits dans la littérature.

Parallèlement au rétrocontrôle négatif des GC sur le NPV de l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure, trois autres principales structures du SNC sont impliquées dans la régulation de l'axe HPA : il s'agit de l'hippocampe, de l'amygdale et du noyau du lit de la strie terminale (BNST : *Bed nucleus of stria terminalis*).

Certains auteurs ont montré que des lésions hippocampiques induisaient 1) une augmentation du taux basal de GC ; 2) une réponse exagérée de l'axe HPA lors d'une exposition à un stress avec des sécrétions d'ACTH et de GC augmentées et prolongées dans le temps. Ces résultats ont été observés chez l'animal soumis à un champ ouvert ou à un stress de contention. Aucune modification n'était mise en évidence pour d'autres stress comme une hypoxie, suggérant ainsi que l'hippocampe répond à des modalités différentes de stress (Smith *et al.*, 2006). L'hippocampe envoie des projections efférentes GABAergiques sur les régions périphériques du NPV de l'hypothalamus qui elles même se projettent directement sur les neurones parvocellulaires du NPV responsables de la sécrétion de CRH. L'hippocampe envoie également des fibres afférentes glutamatergiques sur le BNST qui projette des neurones GABAergiques, donc inhibiteurs sur le NPV de l'hypothalamus. Par cette voie neuronale, l'hippocampe renforce l'action inhibitrice du BSNT sur la sécrétion de CRH par le NPV de l'hypothalamus.

Les amygdales centrale et médiale dont les neurones expriment des GR et MR participent également à la régulation de l'axe HPA. Les neurones de l'amygdale centrale semblent préférentiellement activés lors d'un stress biologique (physique, infectieux) notamment dans les cas d'hémorragie ou d'activation du système immunitaire alors que l'amygdale médiale est activée suite à un stress « émotionnel » comme lorsque l'animal est soumis à l'odeur d'un prédateur, à la nage forcée, à des interactions sociales ou encore à un stress de contention (Smith *et al.*, 2006). L'amygdale intervient dans la régulation de l'axe HPA par l'intermédiaire du BNST sur lequel elle projette des neurones GABAergiques. En levant l'inhibition exercée par le BSNT sur le NPV de l'hypothalamus, l'amygdale favorise la sécrétion de CRH par le NPV de l'hypothalamus.

3.2. Récepteurs à la CRH dans le cervelet

Parallèlement à son implication dans l'axe HPA, la CRH est également exprimée par d'autres structures du SNC comme l'hippocampe et le cervelet au sein desquelles elle exerce un rôle de neurotransmetteur et/ou neuromodulateur. King *et al.* (1997) et Sawada *et al.* (2008) ont précisé la localisation de la CRH dans le cervelet au niveau de ses afférences, les fibres grimpantes et les fibres moussues.

L'action biologique de la CRH est médiée par deux récepteurs CRH-R1 et CRH-R2, récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont exprimés au niveau des deux types d'afférences du cervelet : fibres grimpantes et moussues. Le CRH-R1 est également observé au sein des péricaryons et des dendrites proximales des cellules de Purkinje et en moindre quantité au niveau des noyaux cérébelleux profonds (Bishop *et al.*, 2000). Cependant, le CRH-R1 n'est pas retrouvé dans la membrane post-synaptique des épines dendritiques (Swinny *et al.*, 2003). Cette localisation au niveau des afférences cérébelleuses implique que la CRH en se fixant à son récepteur module présynaptiquement la transmission des informations transmises au cortex cérébelleux par les voies afférentes.

Durant la période postnatale, les deux types de récepteurs à la CRH, CRH-R1 et CRH-R2 présentent une expression temporelle similaire mais leur localisation intracellulaire est différente au sein du cervelet.

Localisation de CRH-R1 au sein du cervelet en développement (King et Bishop, 2002) (*Tableau 3*)

La localisation du récepteur CRH-R1 au sein du cervelet varie au cours du développement postnatal suggérant un rôle potentiel du système CRH/CRH-R1 dans le développement et la maturation de cette structure.

A la naissance, le récepteur CRH-R1 est localisé au niveau du pôle apical du soma des cellules de Purkinje qui s'organisent en couche monocellulaire. Entre J0 et J8 PN, CRH-R1 adopte une position supra-nucléaire pour ensuite circonscrire le noyau des cellules de Purkinje entre J9 et J14 PN. Ce n'est qu'entre J16 et J21 PN que le CRH-R1 acquiert une distribution identique à celle observée à l'âge adulte, au niveau du soma et des dendrites primaires des cellules de Purkinje.

Le récepteur CRH-R1 est observé au niveau des fibres grimpantes à partir de J10 PN. Sa localisation aux dendrites primaires des cellules de Purkinje n'est effective que lorsque ces dernières établissent leurs contacts synaptiques avec les fibres grimpantes.

Concernant les neurones GABAergiques, de la naissance jusqu'à J5 PN, le CRH-R1 est observé au pôle apical du soma des cellules qui migrent en direction de la couche granulaire interne. Les cellules de Golgi localisées au sein de la couche granulaire interne expriment le récepteur CRH-R1 durant la phase de développement postnatal et à l'âge adulte. Au cours de la migration des neurones GABAergiques (les cellules étoilées et les cellules à panier) à travers la couche des cellules de Purkinje, l'expression de CRH-R1 au sein de ces cellules diminue progressivement. Dès que les cellules étoilées et les cellules à panier atteignent la couche moléculaire, le CRH-R1 n'est plus observé au niveau de ces cellules. Ces résultats suggèrent que le système CRH/CRH-R1 est impliqué dans la mise en place des interneurones inhibiteurs au sein de la couche moléculaire et notamment dans leur migration.

Tableau 3 : Localisation de CRH-R1 au sein de cervelet en développement. D'après King et Bishop, 2002.

	Naissance	N-J5 PN	J5 PN	J9-14 PN	J16-21 PN	Adulte
Cellules de Purkinje	+ Pôle apical du soma	+ Supra-nucléaire	+ Supra-nucléaire	+ Circonscriit le noyau	+ Soma + Dendrite primaire	+ Soma + Dendrite primaire
Fibres grimpantes	-			+ à partir de J10 PN		+
Fibres parallèles						
Cellules à grains						
Fibres moussues						
Cellules de Golgi	+	+	+	+	+	+
Cellules étoilées	-	+ de J4-15 PN			- après mise en place de la cellule dans la couche moléculaire	
Cellules à panier	+ de N- J10 PN			- après mise en place de la cellule dans la couche moléculaire		

Localisation de CRH-R2 au sein du cervelet en développement (Lee K.H. et al., 2004) (Tableau 4)

De J0 à J3 PN, le CRH-R2 est retrouvé dans le soma des cellules de Purkinje de manière ponctiforme. A cet âge, la distinction entre les deux isoformes de CRH-R2 ne peut pas être établie. Puis à partir de J5 PN, le CRH-R2 se situe également au niveau des segments initiaux de l'axone des cellules de Purkinje. Enfin entre J12 et J14 PN, le CRH-R2 acquiert une localisation identique à celle observée à l'âge adulte. La forme complète du CRH-R2 est retrouvée au niveau du pôle basal du soma des

cellules de Purkinje alors que la forme tronquée est présente au niveau des segments axonaux initiaux des cellules de Purkinje. Entre J3 et J14 PN, la forme tronquée de CRH-R2 est également observée au sein de la couche moléculaire, plus précisément au niveau des synapses entre les fibres parallèles et les dendrites des cellules de Purkinje. La présence de ce récepteur durant le développement axonal suggère que la liaison de la CRH sur son récepteur CRH-R2 peut moduler le relargage du glutamate, le neurotransmetteur des fibres parallèles. Or il a été démontré qu'une modification du taux de glutamate au niveau des dendrites immatures pouvait induire des perturbations de la différenciation dendritique ou de la synaptogenèse (Catania *et al.*, 2001 ; Monti et Contestabile, 2000 ; Monti *et al.*, 2002 ; Morrison et Masson, 1998).

Les interneurons GABAergiques immatures qui se différencieront en cellules étoilées, cellules à panier et cellules de Golgi, expriment également le CRH-R2 durant la période postnatale. Les expressions temporelle et spatiale du CRH-R1 et CRH-R2 au sein de ces interneurons sont identiques. Cependant alors que le CRH-R1 reste confiné au sein des corps cellulaires des interneurons, le CRH-R2 est retrouvé au niveau des segments axonaux initiaux des cellules de Golgi dès J8 PN. De plus, la présence du CRH-R2 au sein des interneurons GABAergiques est observée durant la période postnatale et à l'âge adulte alors que le CRH-R1 n'est plus exprimé à l'âge adulte par les interneurons GABAergiques. La localisation présynaptique du CRH-R2 au niveau des neurones GABAergiques implique que la liaison de la CRH sur ce récepteur peut moduler le relargage du GABA et donc ainsi perturber la synaptogenèse. En effet, plusieurs études ont démontré que le GABA était un acide aminé capital pour le développement normal des circuits cérébelleux (Kwong *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 1996).

Tableau 4 : Localisation de l'isoforme complète de CRH-R2 au sein du cervelet en développement. D'après Lee et al., 2007 ; Gounko et al., 2006 ; Lee et al., 2004.

		J0-3 PN	J5PN	J6 PN	J8 PN	J12 PN	J14 PN	J15 PN	J30 PN
CRH-R2-f1	Cellules de Purkinje	+ Soma + Soma Dendrites	+ Soma + Soma dendrites proximales Segment initial axonal	+ Soma	++ Soma supra nucléaire + Dendrites primaires, secondaires + Soma Dendrites primaires, secondaires	++ Soma Dendrites primaires Segment initial axonal	++ Soma supra nucléaire + Dendrites primaires ++ Soma Dendrites primaires Segment initial axonal	++ Soma + Dendrites primaires, secondaires et tertiaires Segment initial axonal	++ Soma Dendrites primaires, secondaires et tertiaires Segment initial axonal ++ Soma Segment initial axonal
	Cellules à panier			-		-		+ Soma	+ Soma
	Cellules à grains			-		-		+ Soma Axone	+ Soma Axone
	Cellules étoilées			-					
	Cellules de Golgi	++ + Soma	+ + Soma péri	-	+ +	+ Soma	+/- + Axone et/ou dendrites	+ Soma	+ Soma
	Fibres parallèles			-	+	-		++	++
	Fibres grimpanes			+		+		++	++
	Fibres moussues			+		+		+++	++
	Astrocytes	- -	+ +		+ +			++ +	

Il existe deux isoformes fonctionnelles du récepteur CRH-R2, une forme complète CRH-R2-fl (CRH-R2-*full length*) ou CRH-R2 α et une forme tronquée CRH-R2-tr ou CRH-R2 α -tr. Dans la plupart des études ayant pour objectif de décrire la localisation de CRH-R2, l'anticorps anti-CRH2 utilisé reconnaît les 2 isoformes, ne permettant pas de discriminer la localisation des 2 isoformes. Dans le cervelet, il semblerait que la forme complète, CRH-R2-fl, soit plutôt localisée au sein du corps cellulaire des neurones alors que la forme tronquée CRH-R2-tr soit identifiée au niveau des segments initiaux des axones (*Tableau 5*) (Lee *et al.*, 2004).

*Tableau 5 : Localisation de l'isoforme tronquée de CRH-R2 au sein du cervelet en développement. D'après Lee et al., 2004 ; King et Bishop, 2002 ; *Bishop et al., 2000 ; Tian et al., 2006.*

		J5 PN	J8 PN	J12-14 PN	J15 PN	J30 PN
CRH-R2-tr	Cellules de Purkinje	++ Soma Segment initial axonal	++ Soma Segment initial axonal	++ Soma Segment initial axonal	++ Soma Segment initial axonal	++ Segment initial axonal *
	Interneurones GABAergiques	++	++	++	++	+
	Cellules à panier					+*
	Cellules étoilées					+*
	Cellules de Golgi					+*

La localisation du CRH-R1 et du CRH-R2 est donc différente au cours du développement et à l'âge adulte. Cette différence de distribution suggère que les fonctions de la CRH diffèrent selon la période de développement et de maturation du cervelet. Durant la période postnatale, la CRH semble être impliquée dans la synaptogenèse et la maturation des circuits cérébelleux. Ses mécanismes d'action diffèrent en fonction de son site de liaison : CRH-R1, CRH-R2 forme complète ou forme tronquée. En se fixant sur CRH-R1 ou la forme complète de CRH-R2, deux récepteurs de localisation postsynaptique, la CRH peut réguler la réponse des neurones immatures aux différents facteurs de croissance et neurotransmetteurs relargés par les afférences axonales. En se fixant sur la forme tronquée de CRH-R2, récepteur de localisation présynaptique, la CRH peut directement moduler le relargage des neurotransmetteurs libérés par les neurones afférents excitateurs ou par les interneurones inhibiteurs, ces neurotransmetteurs étant directement impliqués dans la maturation des circuits cérébelleux.

3.3. Les effets de la CRH sur le cervelet

Initialement décrit comme un acteur majeur de la régulation de l'axe HPA, le rôle CRH ne se limite pas à la régulation des réponses au stress. Bien qu'elle n'exerce pas d'action excitatrice directe sur les cellules de Purkinje, la CRH semble jouer un rôle de neuromodulateur dans la transmission synaptique entre les deux types d'afférences (fibres grimpantes et fibres parallèles) et les cellules de Purkinje. En effet, la CRH augmenterait l'excitabilité des cellules de Purkinje via trois mécanismes 1) en potentialisant l'effet des neurotransmetteurs endogènes excitateurs comme le glutamate, 2) en bloquant l'effet des acides aminés inhibiteurs des cellules GABAergiques et 3) en réduisant l'amplitude de la phase d'hyperpolarisation post-transmission (Ito, 2009 ; Bishop *et al.*, 2000).

Les effets de la CRH sur l'organisation du cervelet

La localisation au niveau de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje suggère que le CRH-R1 pourrait jouer un rôle dans la croissance et la maturation de l'arbre dendritique de ces cellules. Plusieurs études *in vitro*, ont permis de préciser l'implication de la CRH dans le développement de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Swinny *et al.*, (2004) ont mis en culture des cellules cérébelleuses de rat en présence de CRH soit de manière intermittente (12h par jour pendant 10 jours) soit de manière continue (24h par jour pendant 10 jours). Les cellules de Purkinje exposées de manière intermittente à la CRH présentaient 45 % de dendrites supplémentaires par rapport aux cellules non exposées à la CRH. De plus, la longueur des dendrites était également augmentée de 25 %. Cependant, les auteurs ont également démontré qu'une exposition continue à la CRH inhibait le développement de l'arborisation dendritique. La CRH est donc impliquée dans la croissance de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Ses effets inhibiteur ou potentialisateur semblent être déterminés par son niveau d'expression.

Parallèlement, la CRH semble également influencer la densité des épines dendritiques des cellules de Purkinje. En effet, des cellules cérébelleuses prélevées chez des animaux ayant subi ou non un stress ont été mises en culture en présence de CRH. Une augmentation de la densité des épines dendritiques des cellules de Purkinje a été observée. Celle-ci était significativement plus marquée pour les animaux ayant subi un stress (Gounko *et al.*, 2013).

Les effets de la CRH sur les fonctions motrices

Chez la souris, il a été démontré qu'une injection unique de CRH induit une augmentation significative de l'activité motrice de l'animal. *A contrario*, chez la souris mutante n'exprimant pas le récepteur CRH-R1, une exposition à la CRH ne modifie pas le phénotype moteur (Contarino *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que le système CRH/CRH-R1 module directement les fonctions

motrices. L'action de la CRH sur les fonctions motrices semble toutefois dépendre de son taux d'expression. En effet, si une injection unique de CRH semble stimuler l'activité motrice, une surexpression de celle-ci, induit des troubles de la coordination motrice associés à une atrophie de nombreuses régions du système nerveux central, la plus importante observée étant celle du cervelet de l'animal (Goebel *et al.*, 2010). De plus, Il semblerait qu'une altération de la régulation de la CRH au niveau des fibres grimpantes serait impliquée dans l'apparition de déficits moteurs tels que l'ataxie (Sawada *et al.*, 2001 ; Jeong *et al.*, 2006 ; Xiao *et al.*, 2007).

3.4. Localisation et effets des glucocorticoïdes sur le cervelet

Effets des glucocorticoïdes à l'âge adulte

Au sein du cervelet adulte, la présence de récepteurs aux glucocorticoïdes a été rapportée dans la couche des cellules à grains et dans la couche des cellules de Purkinje. Ces récepteurs sont exprimés à la fois par les neurones et par la glie (Flügge *et al.*, 1988 ; Morimoto *et al.*, 1996).

De récentes études menées au sein du laboratoire SIMPA ont mis en évidence une altération de la coordination motrice chez des souris (C57BL/6J) soumises à un stress pharmacologique par injection intrapéritonéale répétée de corticostérone. Les souris âgées de seize semaines en moyenne, ont reçu une dose de corticostérone (15 mg/kg) durant trois semaines selon le calendrier suivant : 1) injection à J1, J2 et J3 la première et la seconde semaine puis une injection de J1 à J6 inclus pour la troisième semaine. Une heure après l'injection, les souris subissaient des tests d'exploration (première semaine), des tests moteurs (seconde semaine) et des tests d'apprentissage visuo-spatial (troisième semaine). Les performances motrices de ces souris lors des tests du Rotarod (en version accélérée) et du cintre étaient diminuées. Le cervelet est particulièrement impliqué dans ces tâches sensori-motrices qui requièrent équilibre, coordination motrice et apprentissage moteur dans la mesure où les essais sont répétés. Parallèlement, une analyse moléculaire du cervelet pour des souris ayant reçu les injections de corticostérone, montrait une augmentation de la transcription des gènes codant pour les GR et une diminution de la transcription des gènes codant pour le CRH-R1 (Harlé *et al.*, 2017). Des résultats similaires ont été observés par Bishop et King en 2013. Dans cette étude, les souris ayant reçu une injection d'astressine, un antagoniste de la CRH présentaient également un déficit des performances motrices dans le test du rotarod. Ces résultats montrent que le cervelet serait une région sensible aux glucocorticoïdes et que ceux-ci auraient un impact direct ou indirect sur la fonction cérébelleuse via le système CRH/CRH-R1. De plus, Jalewa *et al.*, (2014) ont précisé l'effet dose des glucocorticoïdes sur le phénotype moteur : des souris adultes traitées par injection chronique de corticostérone (20 mg/kg ou 50 mg/kg) durant 3 semaines ne présentaient aucun changement comportemental lorsque celles-ci étaient observées dans un champ ouvert alors qu'après 5

semaines de traitement, les souris effectuaient plus de mouvements de toilettage (1.65 fois plus de mouvements pour les souris traitées à la dose de 20 mg/kg vs 2.12 fois plus de mouvements pour les souris traitées à la dose de 50 mg/kg).

Rôles des glucocorticoïdes endogènes et leurs récepteurs lors du développement

Durant la période néonatale, le cervelet exprime trois fois plus de récepteurs aux glucocorticoïdes que d'autres régions du système nerveux central (Pavlik *et al.*, 1984). A sein du cervelet, la plus forte concentration de récepteurs aux glucocorticoïdes est observée au sein de la couche granulaire externe. A noter que le taux de récepteurs aux glucocorticoïdes augmente parallèlement à l'épaisseur de la couche granulaire externe et réciproquement, son expression diminue lorsque la couche granulaire externe disparaît progressivement au cours du développement (Noguchi, 2014) suggérant une localisation préférentielle des récepteurs aux glucocorticoïdes au sein de la couche granulaire externe. Ces observations laissent supposer un rôle potentiel des glucocorticoïdes et de leur récepteur dans la prolifération, la migration ou la survie des cellules progénitrices des cellules à grains de la couche granulaire externe (cf. *les effets de la corticostérone sur le cervelet en développement*).

Après la naissance, la sécrétion de corticostérone endogène est très faible, de même que la capacité des glandes surrénales à synthétiser cette hormone en réponse au stress (Schmidt *et al.*, 2002 ; Dakine *et al.*, 2000). Cette période qualifiée comme une période hyposensible au stress (*stress hyporesponsive period*) s'étend de J2 à J15 PN et correspond à la période de prolifération des cellules progénitrices des cellules à grains de la couche granulaire externe. Une augmentation du taux de corticostérone semblable au taux observé à l'âge adulte durant cette période, induit une augmentation significative de l'apoptose des futures cellules à grains aboutissant à une diminution de la prolifération de ces cellules associées à une disparition prématurée de la couche granulaire externe. Dans ces conditions, la taille de l'encéphale est diminuée (Ferguson *et al.*, 1999 ; Bohn et Lauder, 1980 ; Benesova et Pavlik, 1985, 1989). *A contrario*, l'inhibition des glucocorticoïdes endogènes à l'aide d'un antagoniste provoque une diminution significative de l'apoptose des cellules progénitrices des cellules à grains de la couche granulaire externe (Noguchi *et al.*, 2011). Des résultats similaires sont observés en cas d'adrénalectomie. En effet, cette dernière induit une diminution du taux de glucocorticoïdes endogènes qui s'accompagne 1) d'une augmentation de la prolifération des cellules progénitrices des cellules à grains ; 2) d'une disparition retardée de la couche granulaire externe et 3) d'une augmentation du poids de l'encéphale (Meyer, 1983 ; Yehuda et Meyer, 1991). Ces résultats montrent qu'au cours du développement, les glucocorticoïdes endogènes semblent orchestrer l'élimination par apoptose de la couche granulaire externe à l'issue des phases de prolifération et de migration des cellules progénitrices des cellules à grains.

Durant la période de prolifération des cellules progénitrices des cellules à grains qui correspond à la période d'hyposensibilité au stress, les effets pro-apoptotiques des glucocorticoïdes endogènes sont modérés par la 11 β -hydroxysteroid déshydrogénase de type II (11 β -HSD2). Cette enzyme impliquée dans le neuro développement (Seckl, 2004) est capable d'inactiver les glucocorticoïdes endogènes de manière rapide avant leur fixation sur leur récepteur (Holmes *et al.*, 2006 ; Robson *et al.*, 1998). A la naissance, la 11 β -HSD2 est exclusivement trouvée dans la couche granulaire externe puis son niveau d'expression diminue progressivement parallèlement à l'élimination de la couche granulaire externe (Holmes *et al.*, 2006) suggérant ainsi le rôle de cette enzyme dans le maintien puis l'élimination de la couche granulaire externe. Une étude a démontré chez la souris, qu'une inhibition de la 11 β -HSD2 au cours de la période d'hyposensibilité au stress induit une augmentation dramatique de l'apoptose des cellules progénitrices des cellules à grains au sein de la couche granulaire externe (Noguchi *et al.*, 2011). Inversement, une augmentation de la 11 β -HSD2 favorise la survie des futures cellules à grains (Heine *et al.*, 2011). La 11 β -HSD2 a donc à rôle protecteur contre l'apoptose induite par les glucocorticoïdes endogènes. A l'issue de la migration des futures cellules à grains, l'expression de la HSD2 diminue, levant ainsi les effets inhibiteurs exercés sur les glucocorticoïdes endogènes. Ces derniers régulent alors l'apoptose physiologique des précurseurs des cellules à grains et ainsi contribuent à l'élimination de la couche granulaire externe.

Les effets de la corticostérone sur le cervelet en développement

Chez la souris, le développement du cervelet s'étend sur une période de 6 semaines entre le septième jour embryonnaire et le trentième jour postnatal. Durant cette période, à l'instar de l'hippocampe, le cervelet est une structure vulnérable à toutes modifications environnementales comme une exposition au stress. Plusieurs études sur l'animal en cours de développement ont montré que la fenêtre de vulnérabilité au stress est importante et qu'elle affecte les deux périodes : prénatale et postnatale. Un stress prénatal, par confinement de la mère en gestation, induit chez la souris une anomalie des cellules de Purkinje affectant plus particulièrement le développement de leur arborisation dendritique : plus développée chez le jeune (à J22 et J52 PN), elle s'atrophie ensuite à l'âge adulte d'environ 70% (Pascual *et al.*, 2010). Une autre étude a montré qu'un même stress exercé durant la période embryonnaire, affectait durablement la multiplication des cellules du cortex cérébelleux dans le sens d'une augmentation de la quantité des cellules de Purkinje par rapport à celle des cellules à grains (Ulupinar *et al.*, 2006) modifiant ainsi l'organisation des contacts synaptiques entre ces cellules.

Par ailleurs, un stress périnatal aigu par injection unique de corticostérone chez le souriceau à J4, J7 ou J10 PN induit une apoptose rapide et sélective des précurseurs de cellules à grains de la couche granulaire externe réduisant ainsi de manière permanente le nombre de cellules à grains

de la couche granulaire interne à l'âge adulte (Noguchi *et al.*, 2008, 2011). Ces résultats suggèrent qu'en fonction de la période pré ou postnatale, les glucocorticoïdes exogènes peuvent perturber le développement de certaines populations cellulaires du cervelet et donc *in fine* son architecture.

De plus, ces deux dernières études ont un impact clinique important car un traitement aux glucocorticoïdes est administré au nouveau-né prématuré en situation de souffrance respiratoire, or celui-ci induirait des modifications durables dans l'organisation cellulaire du cervelet.

Perturbations des fonctions motrices

Durant la période postnatale, Howard et Granoff (1968), ont traité pharmacologiquement des souris par pose d'un implant sous-cutané de corticostérone de J2 et J14 PN. Ils ont observé une augmentation d'activité motrice des souris mesurée quotidiennement par la distance parcourue dans une roue. Cette augmentation d'activité s'observait dès le début du test démarré à J13 et s'exprimait jusqu'à J26 PN. Toutefois, les souris devenues adultes étaient hypoactives dans le test du champ ouvert et dans le rotarod. Cette diminution des performances motrices était associée à une réduction de volume de 25% du cervelet.

De plus, chez le souriceau ayant reçu de la dexaméthasone durant la période postnatale (J7, J9 et J11 PN), une diminution des performances motrices dans le test du rotarod, un test évaluant plus particulièrement la coordination motrice, a été observée. Celle-ci s'accompagnait d'un taux d'apoptose élevé des cellules progénitrices des cellules à grains localisées au sein de la couche granulaire externe aboutissant à un nombre réduit de 20 % de cellules à grains de la couche granulaire interne (Maloney *et al.*, 2011). Dans cette étude, aucune diminution de nombre des cellules de Purkinje n'a été mise en évidence. Ces différents résultats démontrent que les effets des glucocorticoïdes sur l'activité motrice dépendent de la période d'administration et de l'âge de la souris.

Perturbation des fonctions cognitives

Bien que considéré comme structure motrice, le cervelet est également impliqué de façon importante dans les fonctions cognitives et émotionnelles de par ses connexions réciproques avec des structures du système limbique, le cortex frontal et préfrontal ainsi que le thalamus.

Brabham *et al.*, (2000) ont mis en évidence une altération des fonctions cognitives notamment des capacités d'apprentissage et de mémorisation testées par le biais du test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris chez des rats adultes ayant subi une exposition à la dexaméthasone au cours de leur développement embryonnaire (E15 à l'accouchement) via une administration sous cutanée de la drogue chez la mère. Cependant, une étude par imagerie cérébrale a montré une corrélation négative entre le volume du cervelet et le degré d'anxiété (Schutter *et al.*, 2012). De

plus, Darcet *et al.*, (2014) ont montré que le rat adulte traité chroniquement à la corticostérone durant 4 semaines montrait des déficits dans les capacités de mémorisation, dans la mémorisation associative et dans les capacités d'apprentissage visuospatial.

Des défauts structuraux du cervelet ont été observés dans certaines pathologies psychiatriques caractérisées par des désordres émotionnels (*cf* paragraphe 1). Plusieurs études précliniques et cliniques ont montré l'implication du cervelet dans certaines dysfonctions cognitives et émotionnelles. Des anomalies structurales du vermis ont été corrélées avec certaines pathologies psychiatriques comme les déficits de l'attention, l'hyperactivité, la schizophrénie, les troubles bipolaires, la dépression, l'anxiété ou encore l'autisme (Pascual *et al.*, 2010). Ces résultats ne sont pas surprenants, étant donné que le vermis établit de nombreuses connexions avec le système limbique (hypothalamus, amygdale, hippocampe et le cortex préfrontal) (Onat et Cavdar, 2003 ; Strick *et al.*, 2009 ; Watson *et al.*, 1999).

3.5. Résumé des localisations cellulaires des récepteurs aux GC, de la CRH et de ses récepteurs au sein du cervelet à l'âge adulte

Tableau 6 : Récapitulatif des localisations intra cérébelleuses à l'âge adulte des hormones du stress et de leurs récepteurs. [1] Flügge et al., 1988 ; [2] King et al., 1997 ; Sawada et al., 2008 ; [3] Bishop et al., 2000 ; King et Bishop, 2002 ; Bishop et King, 2013 ; [4] Lee et al., 2004 ; [5] Gounko et al., 2006 ; [6] Morimoto et al., 1996 ; [7] Swinny et al., 2003

	Récepteur GC	CRH	CRH-R1	CRH-R2
Soma cellules de Purkinje	+ Couche des cellules de Purkinje [1] Marquage modéré [9]		+ [3]	+ Pole basal (CRH-R2 full) [4] + Axone initial (CRH-R2 tr) [4]
Arborisation dendritique des cellules de Purkinje			+ Dendrites proximales [3]	
Fibres grimpantes		+ [2]	+ [3]	+ [5]
Fibres parallèles			- [7]	++ [5]
Cellules à grains	+ Couche granulaire [1] Marquage marqué [6]		+ [3]	+ Soma, Axone [5]
Fibres moussues		+ [2]	+ [3]	+ [5]
Cellules de Golgi			+ [6]	+ Axones initiaux, localisation présynaptique [7]
Cellules étoilées			- [6]	
Cellules à panier		- [6]		

4. BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) : généralités

Le BDNF est un facteur de croissance appartenant à la famille des neurotrophines qui comprend le *nerf growth factor* (NGF) et les neurotrophines-3/4/5 (NT-3, NT-4, NT-5). Protéine homodimérique de 112 acides aminés, le BDNF est initialement sécrété sous la forme d'un précurseur glycosylé, le pro-BDNF. Ce dernier sera ensuite clivé pour former le BDNF mature. Ces deux formes, pro-BDNF et BDNF sécrétées par les neurones (Yang *et al.*, 2009) sont biologiquement actives cependant leurs fonctions sont distinctes (Park et Poo, 2013).

Les actions biologiques du BDNF sont médiées par la fixation de ce ligand sur un récepteur à activité tyrosine kinase, le TrkB ou sur le récepteur p75. Le BDNF se lie avec une forte affinité pour le récepteur TrkB et avec une faible affinité pour le récepteur p75 (Reichardt, 2006). A contrario, le pro-BDNF se lie avec une forte activité uniquement au récepteur p75 (Singh *et al.*, 2008 ; Woo *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2001).

En fonction du contexte cellulaire et moléculaire, la liaison du BDNF à TrkB induit l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire comme les voies de la *Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase* (MAPK/ERK), de la phospholipase γ (PLC γ) et de la phosphoinostide 3 kinase (PI3K) (Huang et Reichardt, 2003). Le BDNF est ainsi impliqué dans la régulation de la prolifération, la migration, la différenciation, la croissance et la survie des cellules neuronales (Chao, 2003 ; Reichardt 2006).

Le BDNF est fortement exprimé au sein de l'encéphale en développement et de l'encéphale mature. L'expression de BDNF dans l'encéphale varie selon les régions et selon une certaine dynamique lors du développement (Baquet ZC *et al.*, 2004). Il est plus particulièrement mis en évidence dans l'hippocampe, le cortex cérébral, le cervelet et l'amygdale (Numakawa *et al.*, 2010). Dans des conditions physiologiques, l'expression intracellulaire du BDNF est surtout observée au sein des neurones glutamatergiques. En revanche, il n'est pas exprimé par les interneurones et les astrocytes (Zafra *et al.*, 1992 ; Yoshimoto *et al.*, 1995 ; Cellerino *et al.*, 1996 ; Rocamora *et al.*, 1993).

Dans le cervelet, BDNF et son récepteur TrkB sont fortement exprimés en période postnatale et durant la majeure partie de la période de synaptogénèse (Rico *et al.*, 2002 ; Lindholm *et al.*, 1997). Plus précisément, le BDNF est fortement retrouvé dans le cortex cérébelleux au sein de la couche granulaire interne à l'extrémité des fibres mossues (Chen *et al.*, 2016), et dans les noyaux profonds alors que le TrkB est exprimé par les cellules de Purkinje, les cellules à grains, les interneurones et les cellules gliales (Klein *et al.*, 1993 ; Yan *et al.*, 1997).

4.1. Principaux rôles du BDNF dans le système nerveux central (SNC)

BDNF et survie neuronale

Plusieurs études ont montré que le BDNF possède un effet neuroprotecteur. Chez l'animal, une perfusion de BDNF après un accident ischémique cérébral diminue significativement les déficits neurologiques séquellaires, le volume cortical nécrosé et l'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bax. De plus, l'apport de BDNF augmente significativement l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2. Ces résultats suggèrent que le BDNF favorise la survie des cellules neuronales en régulant le niveau d'expression des molécules pro et anti-apoptotiques (Schäbitz *et al.*, 2000). D'autres auteurs ont montré que le BDNF en se liant sur son récepteur TrkB active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, notamment les voies ERK/CREB, PI3K/Akt, impliquées dans la survie des neurones (Huang et Reichardt, 2003).

BDNF et plasticité synaptique

Dans l'hippocampe, le BDNF améliore la neurotransmission et potentialise la plasticité synaptique (Kang et Schuman, 1995; Korte *et al.*, 1996 ; Patterson *et al.*, 1996). Il en est de même dans le cervelet. En effet, chez la souris présentant une délétion du gène codant pour le BDNF (souris BDNF knockout), Carter *et al.* (2002) ont montré que la plasticité synaptique à court terme et la fonction présynaptique entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles dans le cervelet étaient altérées.

Plusieurs études ont associé ces défauts dans la fonction synaptique à des modifications de l'ultrastructure de la synapse tant dans le nombre de vésicules synaptiques que dans leur distribution. En effet, chez la souris BDNF^{-/-}, l'altération de la plasticité synaptique à court terme est associée à une augmentation du nombre de vésicules synaptiques. Cependant en l'absence de BDNF, tous les pools de vésicules présynaptiques n'étaient pas affectés en nombre. Dans les 100 premiers nm par rapport à la fente synaptique, le nombre de vésicules présynaptiques n'était pas modifié. Au-delà, l'augmentation du nombre de vésicules était significative alors que dans la zone localisée à 50 nm de la zone active, zone considérée comme la zone d'amarrage, le nombre de vésicules était significativement diminué en l'absence de BDNF. Ces résultats montrent qu'un déficit en BDNF conduit à une augmentation ou une diminution sélective de certaines vésicules présynaptiques situées respectivement en marge de la zone active et au sein de la zone active (Carter *et al.*, 2002). Des changements similaires dans la densité et la distribution des vésicules présynaptiques ont été observés dans les neurones afférents de l'hippocampe chez la souris TrkB^{-/-} (Martinez *et al.*, 1998). Dans cette même structure, Pozzo-Miller *et al.* (1999) ont également mis en évidence une diminution du nombre de vésicules amarrées à la membrane présynaptique chez la souris BDNF^{-/-}. Le BDNF semble donc moduler le nombre et la distribution des vésicules présynaptiques et ainsi la plasticité synaptique à court terme.

Morphologie axonale et dendritique (Numakawa *et al.*, 2010)

Les effets du BDNF sur la croissance axonale sont controversés. Pour certains auteurs, il promeut l'élongation axonale des neurones moteurs et sensitifs (Tucker *et al.*, 2001) ainsi que des neurones de l'hippocampe (Yoshimura *et al.*, 2005) alors que pour d'autres, le BDNF serait impliqué non pas dans la croissance en longueur de l'axone mais orienterait celle-ci dans une direction déterminée (Nishiyama *et al.*, 2008) en agissant comme un facteur chimio attractif (Song *et al.*, 1997). Le BDNF serait également impliqué dans l'architecture de l'arborisation axonale offrant ainsi sa complexité à la morphologie axonale (Deppmann *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2008).

Il est couramment admis que la croissance dendritique est un élément fondamental pour l'établissement des circuits neuronaux. Horch et Katz (2002) ont montré que le BDNF libéré par les dendrites ou les corps cellulaires des neurones du cortex cérébral du furet induit la croissance de l'arborisation dendrite des neurones adjacents. Les effets du BDNF sur la morphologie dendritique semblent différents selon la localisation du dendrite, proximal ou distal (Mc Allister *et al.*, 1995). Dans le cervelet, un défaut d'expansion des dendrites des cellules de Purkinje associé à une couche moléculaire d'épaisseur réduite a été mis en évidence chez la souris BDNF^{-/-} (Carter *et al.*, 2002). La croissance de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux du néocortex est également altérée chez la souris TrkB knockout. D'autres auteurs ont démontré l'implication des voies de signalisation PI3K et MAPK/ERK dans la croissance en longueur des dendrites, leur calibre et leur nombre (Dijkhuizen et Ghosh, 2005 ; Kumar *et al.*, 2005). A noter que ces deux voies peuvent être activées lors de la fixation de BDNF sur son récepteur TrkB.

4.2. BDNF et le cervelet en développement

Les neurotrophines ont un rôle essentiel dans le développement du système nerveux. En effet, l'absence de neurotrophines ou de leurs récepteurs est associée à des troubles du comportement, des pathologies neurodégénératives ou des pathologies psychiatriques telles que la dépression, les troubles bipolaires, l'addiction ou encore l'anxiété (Chao *et al.*, 2006).

Parmi ces neurotrophines, plusieurs études ont montré que dans le cervelet, le BDNF et son récepteur TrkB étaient fortement exprimés en période postnatale et durant la majeure partie de la période de synaptogénèse (Rico *et al.*, 2002 ; Lindholm *et al.*, 1997) suggérant ainsi l'implication du BDNF et du TrkB dans le développement du cervelet. En effet, le BDNF en se liant à son récepteur TrkB semble réguler de nombreux aspects du développement du cervelet, notamment la survie et la migration des cellules à grains, l'innervation des fibres grimpantes, la formation et la maintenance des synapses inhibitrices et la plasticité synaptique (Chen *et al.*, 2011 ; Yoshii *et al.*, 2011).

Migration des cellules à grains

Plusieurs études ont montré que le BDNF promeut la migration des cellules à grains dans une direction donnée de la couche granulaire externe à la couche granulaire interne (Zhou *et al.*, 2007). En effet, en l'absence de BDNF, cette migration est perturbée (Borghesani *et al.*, 2002). D'autres études ont mis en évidence la présence d'un gradient de concentration de BDNF au sein du cortex cérébelleux : celle-ci étant deux fois plus importante dans la couche granulaire interne que dans la couche granulaire externe (Zhou *et al.*, 2007). Cette concentration augmente donc tout au long de la trajectoire de migration des précurseurs des cellules à grains (Borghesani *et al.*, 2002 ; Rocamora *et al.*, 1993 ; Wetmore *et al.*, 1990). L'établissement de ce gradient de concentration de BDNF est essentiel pour la migration. En effet, si la concentration de BDNF est constante au sein des différentes couches cellulaires du cortex cérébelleux, le pourcentage de précurseurs en migration diminue et les cellules migrent dans des directions anarchiques sans pour autant perturber la vitesse et la durée de migration. Le gradient de concentration de BDNF au sein des couches cellulaires du cortex cérébelleux agit donc comme un facteur chimiotactique en fournissant un signal directionnel précis pour la migration des futures cellules à grains.

L'action du BDNF sur cette migration semble impliquer le récepteur TrkB. Une étude *in vivo* a montré que l'inhibition du TrkB induit une diminution de la migration des précurseurs de cellules à grains et altère le sens de migration alors que l'inhibition du p75NTR ne produit aucun effet (Zhou *et al.*, 2007). Ces résultats démontrent que seul le TrkB est impliqué dans la fonction de chimiotactisme du BDNF. Une fois activé par le BDNF, le TrkB initie une libération autocrine de BDNF amplifiant ainsi le signal. Les récepteurs TrkB ainsi activés subissent un phénomène d'endocytose qui aboutit à une accumulation des vésicules d'endocytose localisées au sein du prolongement cellulaire de la future cellule à grains qui fait face à la plus forte concentration de BDNF. Ces deux mécanismes permettent la polarisation et donc la migration des futures cellules à grains dans une direction donnée en réponse à l'effet chimiotactique du BDNF.

D'un point de vue moléculaire, l'activation du TrkB suite à la fixation de son ligand BDNF stimule deux voies de signalisations parallèles, Tiam1/Rac et PI3Kinase qui sont essentielles pour le chimiotactisme exercé par le BDNF dans la migration des précurseurs des cellules à grains (Zhou *et al.*, 2007).

Chez la souris TrkB mutante, un retard de migration des cellules à grains a été observé (Minichiello et Klein, 1996). Cependant, au terme des 3 premières semaines postnatales, la couche granulaire externe avait complètement disparu chez les souris mutantes comme chez les souris *wild-type*. En l'absence du TrkB, le développement des cellules à grains ne semblait pas perturber. En effet, la densité des cellules à grains n'était pas réduite, la morphologie des cellules était normale, le diamètre du corps cellulaire des cellules à grains et des fibres parallèles était similaire au groupe

« contrôle ». Les cellules à grains exprimaient bien la sous unité alpha6 du récepteur au GABA, un marqueur moléculaire de la maturité et de la fonction postsynaptique (Rico *et al.*, 2002).

Arborisation dendritique des cellules de Purkinje

A J8 PN, les dendrites des cellules de Purkinje sont sévèrement atrophiées et désorganisées chez la souris en l'absence de BDNF (Schwartz *et al.*, 1997). Ces résultats ont été confirmés par Carter *et al.* (2002). En effet chez les souris BDNF^{-/-}, l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje était réduite à J8, J15 et J24 postnatal. Ce défaut d'expansion était associé à une couche moléculaire de moindre épaisseur. Toutefois même en l'absence de BDNF, leur développement en embranchements secondaires et tertiaires était observé à PN15 et PN24. Cependant, chez ces souris, la dendrite primaire était plus courte et se divisait en un nombre réduit de dendrites secondaires et tertiaires. De plus, le nombre d'épines dendritiques était diminué (Morrison *et Mason*, 1998 ; Shimada *et al.*, 1998). Par ailleurs, une délétion du gène codant pour le récepteur TrkB, induit une réduction d'environ 20 % de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (Minichiello *et Klein*, 1996 ; Rico *et al.*, 2002 ; Bosman *et al.*, 2006) sans modification du nombre de cellules de Purkinje et de cellules à grains (Minichiello *et Klein*, 1996 ; Rico *et al.*, 2002). Dans le cervelet, le BDNF et son récepteur TrkB régulent donc le développement morphologique des cellules de Purkinje (Schwartz *et al.*, 1997).

Mise en place des fibres grimpantes

Initialement les cellules de Purkinje sont innervées par de multiples fibres grimpantes. Au cours du développement, cette multi-innervation évolue secondairement vers une mono-innervation postnatale suite à une compétition fonctionnelle entre les différentes fibres grimpantes mêlées. Lors de cette sélection fonctionnelle, la fibre grimpante la plus active sera conservée alors que les autres fibres grimpantes régresseront par voie apoptotique. Ainsi dans le cervelet mature, les dendrites proximales d'une cellule de Purkinje établissent des synapses avec une unique fibre grimpante.

Plusieurs molécules ont été impliquées dans l'élimination des fibres grimpantes, notamment le récepteur métabotrophique du glutamate de type 1 (mGlu1), (Kano *et al.*, 1997* ; Ichise *et al.*, 2000*), Gαq (Offermanns *et al.*, 1997*), la phospholipase Cβ4 (PLC β4*) (Kano *et al.*, 1998*), la protéine kinase Cγ (PKCγ) (Kano *et al.*, 1995*), le récepteur au glutamate δ2 (GluRδ2) (Hashimoto *et al.*, 2001* ; Ichikawa *et al.*, 2002*), les canaux Ca²⁺ voltages dépendant de type P/Q (Rabacchi *et al.*, 1992* ; Kakizawa *et al.*, 2000*) et Arc/Arg3.1 (Mikuni *et al.*, 2013*) (*Références citées par Johnson *et al.* 2007). De plus, une étude a montré chez la souris TrkB^{-/-} que les cellules de Purkinje conservaient leur multi-innervation par les fibres grimpantes à J14 et entre J20-24 postnatal

(Bosman *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007) suggérant ainsi que le TrkB est impliqué dans l'élimination des fibres grimpantes surnuméraires. Plus précisément, le BDNF dérivé des cellules de Purkinje agit de manière rétrograde en se fixant sur son récepteur TrkB exprimé par les fibres grimpantes pour promouvoir la régression des fibres grimpantes les moins actives à partir de J16 post natal. Cependant le signal induit par la liaison de BDNF sur TrkB n'influence ni la sélection de la fibre grimpante la plus active ni sa translocation sur les dendrites de la cellule de Purkinje (Choo *et al.*, 2017). Le BDNF n'agit donc pas comme un facteur trophique pour la synapse entre la fibre grimpante et la cellule de Purkinje durant le développement du cervelet.

Choo *et al.* (2017) ont également démontré que le récepteur p75NTR n'était pas requis pour ce processus d'élimination des fibres grimpantes alors que chez la souris, une délétion du gène codant pour le récepteur TrkB dans le cervelet, altère le processus d'élimination des fibres grimpantes moins actives lors du développement (Johnson *et al.*, 2007). Ces résultats précisent donc le rôle du BDNF et de son récepteur TrkB dans l'élimination des fibres grimpantes.

De plus, dans le cervelet en développement, l'élimination des synapses des fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje n'implique pas seulement une compétition homosynaptique mais aussi une compétition hétérosynaptique entre les fibres parallèles et grimpantes (Watanabe *et al.*, 2011 ; Hashimoto *et al.*, 2009 ; Hashimoto *et al.*, 2001 ; Ichikawa *et al.*, 2002).

L'inhibition GABAergique joue également un rôle important dans le contrôle de l'élimination des fibres grimpantes. En effet, chez la souris qui présente une diminution de la transmission GABAergique grâce une mutation du gène codant pour la GABA *synthesizing enzyme* (GAD67), l'élimination des fibres grimpantes surnuméraires sur la cellule de Purkinje était altérée (Nakayama *et al.*, 2012).

Par ailleurs, Bao *et al.*, (1999) puis Seil et Drake-Baumann (2000) ont montré qu'en absence de TrkB, la formation et la maturation des synapses GABAergiques étaient retardées. L'action du TrkB sur l'élimination des fibres grimpantes pourrait impliquer les synapses GABAergiques.

Synaptogenèse glutamatergique entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje

La localisation du BDNF au sein de la synapse entre les fibres parallèles et la cellule de Purkinje suggère que celui-ci pourrait avoir un rôle important dans la formation et le développement de ces synapses. Carter *et al.* (2002) ont démontré qu'en l'absence de BDNF, le développement et la juxtaposition des éléments pré- et postsynaptiques entre les fibres parallèles et la cellule de Purkinje ne sont pas altérés et ce malgré les effets délétères décrits précédemment sur la morphologie de l'arborisation dendritique. Le BDNF ne serait donc pas requis pour la mise en place des synapses entre les fibres parallèles et la cellule de Purkinje. Cependant, dans cette étude, le nombre de ces synapses était réduit. Ce résultat est confirmé par d'autres études qui ont montré

que l'absence de BDNF est délétère pour la morphologie et le nombre d'épines dendritiques des cellules de Purkinje (Morrison et Mason, 1998 ; Shimada *et al.*, 1998).

Shimada *et al.*, (1998) ont montré que des cellules de Purkinje mises en culture en présence de BDNF présentaient une densité plus importante d'épines dendritiques avec une répartition similaire des épines entre les dendrites proximales et les dendrites distales. Cet effet trophique n'était pas observé après inhibition du BDNF endogène (par ajout de TrkB-IgG) confirmant ainsi le rôle du facteur neurotrophique sur la densité des épines dendritiques.

Chez la souris TrkB^{-/-}, Bosman *et al.* (2006) n'ont observé aucune perturbation de la transmission synaptique entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles à partir de P14. Les auteurs ont conclu que le TrkB ne jouait pas un rôle majeur dans la formation des synapses des fibres parallèles et grimpantes sur la cellule de Purkinje.

Synaptogenèse GABAergique

Des études *in vivo* et *in vitro*, ont montré que dans le cervelet l'absence de BDNF induit une diminution du nombre de synapses GABAergiques alors que l'ajout exogène de BDNF favorise la formation de ces synapses (Bao *et al.*, 1999 ; Gonzalez, 2014 ; Baquet *et al.*, 2004). Cependant, les sources de BDNF impliquées dans la régulation des synapses GABAergiques dans le cortex cérébelleux restent indéterminées (Yoshii *et al.*, 2011 ; Dean *et al.*, 2009).

L'action du BDNF sur la formation et la maintenance des synapses inhibitrices semble médiée par son récepteur TrkB. En effet, des auteurs ont démontré que l'activation de TrkB était nécessaire à la différenciation des éléments pré- et post synaptiques et à la maintenance des synapses GABAergiques dans le cervelet (Chen *et al.*, 2011 ; Rico *et al.*, 2002). Plus précisément, il favorise notamment la formation de synapses GABAergiques dans la couche moléculaire du cortex cérébelleux (Rico *et al.*, 2002). En effet, l'absence du TrkB induit des effets marqués sur les cellules étoilées et les cellules en panier, notamment une diminution du nombre de leurs synapses qui pourrait perturber les circuits neuronaux établis par ces interneurons sur la cellule de Purkinje (Rico *et al.*, 2002).

L'absence d'expression de BDNF par les cellules à grains, n'influence pas la formation des synapses GABAergiques. Ces observations suggèrent qu'en l'absence de BDNF dans la couche granulaire interne, une compensation par une autre neurotrophine permet d'activer le TrkB ou que la source de BDNF qui active le TrkB n'est pas localisée dans la couche granulaire interne (Chen *et al.*, 2016).

4.3. BDNF et Stress

Plusieurs études ont montré chez l'animal soumis à un stress aigu ou chronique, que l'expression de BDNF était significativement diminuée dans l'hippocampe, structure du SNC vulnérable au stress (Duman et Monteggia, 2006 ; Rasmussen *et al.*, 2002). Cette diminution d'expression de BDNF (ARNm et protéine) dans l'hippocampe était également observée lorsque l'animal subissait une injection unique de corticostérone (Schaaf *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 1995) ou une injection chronique de corticostérone (Dwivedi *et al.*, 2006). Des expériences de stress peuvent également altérer à long terme l'expression du BDNF (Rasmussen *et al.*, 2002).

Chez l'homme, plusieurs études ont mis en évidence une diminution du taux d'expression de BDNF chez des patients qui présentaient des pathologies psychiatriques sévères comme la schizophrénie, les troubles bipolaires ou des syndromes dépressifs majeurs (Knable *et al.*, 2004 ; Gervasoni *et al.*, 2005 ; Karege *et al.*, 2005). Par exemple, le taux d'expression de BDNF dans l'hippocampe était diminué chez les patients dépressifs suicidaires (analyses *post mortem*) (Karege *et al.*, 2005 ; Dwivedi *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2011), la diminution pouvant être reversée par un traitement antidépresseur. En effet, certaines classes pharmacologiques d'antidépresseurs comme les inhibiteurs de la recapture de sérotonine (SSRI), les inhibiteurs de la recapture de norépinéphrine (NESRI), ou encore les inhibiteurs de la mono-amine oxydase (IMAO) augmentent significativement le niveau d'expression de BDNF dans l'hippocampe (Coppell *et al.*, 2003 ; Dias *et al.*, 2003 ; Garza *et al.*, 2004 ; Castrén, 2005). Cependant ces effets semblent dépendre de la dose utilisée et de la durée du traitement.

De plus, chez les patients atteints de syndrome dépressif majeur, des volumes réduits de l'hippocampe et de l'amygdale associés à une atrophie neuronale ont été observés (Campbell *et al.*, 2004). Pour d'autres pathologies psychiatriques, comme la schizophrénie, la réduction du volume du cortex préfrontal et les dysfonctions cognitives qui en découlent semblent être associées à un polymorphisme du gène codant pour le BDNF (Varnäs *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que le BDNF sous l'effet d'un stress pourrait être impliqué dans les mécanismes conduisant à une altération volumétrique de certaines structures du SNC. Kumamaru *et al.* (2008) ont montré qu'*in vitro* la dexaméthasone inhibait la croissance des dendrites des neurones immatures de l'hippocampe induite par le BDNF. Cette action inhibitrice de la dexaméthasone sur les effets trophiques du BDNF semble agir sur la voie MAPK/ERK1-2 activée par le BDNF (Numakawa *et al.*, 2004 ; Matsumoto *et al.*, 2006 ; Kumamaru *et al.*, 2008).

Chez l'animal, une exposition à un stress aigu ou chronique (odeur de prédateur, séparation maternelle, chocs électriques *footshock*) induit une diminution de la neurogénèse dans l'hippocampe adulte (Duman, 2004). Dans certains cas, cette diminution était corrélée à des troubles du comportement (Malberg et Duman, 2003) et à une diminution de l'expression du BDNF

(Duman et Monteggia, 2006). Une autre étude a montré que l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes réprimait l'activité transcriptionnelle du promoteur du BDNF (site spécifique) via l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (Schaaf MJ *et al.*, 2000).

4.5. Résumé des localisations de BDNF et TrkB au sein du cerveau adulte

*Tableau 7 : Récapitulatif des localisations intra cérébelleuses à l'âge adulte du BDNF et de son récepteur TrkB. [1] Chen et al., 2016 ; [2] Rico et al., 2002 ; [3] Klein et al., 1993 ; [4] Yan et al., 1997 ; * Les cellules à grains et les cellules de Golgi exprimant le TrkB, le BDNF mis en évidence au sein de ces deux types cellulaires peut résulter de la liaison de BDNF sur TrkB [1].*

	BDNF	TrkB
Soma cellules de Purkinje	+ [1]	+ Soma [4]
Arborisation dendritique des cellules de Purkinje		+ [3]
Fibres grimpantes		
Fibres parallèles		
Cellules à grains	+ Dendrites* [1]	++ [2]
Fibres moussues	++ Axones terminaux [1]	
Cellules de Golgi	+ Axone [1]	+ [2]
Cellules étoilées		
Cellules à panier		

5. Protéines du cytosquelette

Plusieurs études ont montré que certaines pathologies psychiatriques, telles que la schizophrénie (Penzes *et al.*, 2011, Glausier et Lewis, 2013), la dépression (Duman et Canli, 2015 ; Varidaki *et al.*, 2016) ou encore des déficits intellectuels (Kaufmann *et al.*, 2000) étaient associées à une réduction de la densité des épines dendritiques et de l'arborisation dendritique des neurones de l'hippocampe et du cortex préfrontal, deux structures impliquées dans l'homéostasie de l'humeur (Blanpied et Ehlers, 2004 ; Marchisella *et al.*, 2016). De même, l'analyse de coupes d'IRM de patients atteints de pathologies neuropsychiatriques a permis de montrer que dans des conditions de stress chronique, un excès de cortisol induit une atrophie de certaines régions de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex préfrontal et plus précisément une diminution de l'étendue de l'arbre dendritique et des épines dendritiques (Mc Ewen *et al.*, 2015). Les mécanismes étiopathologiques de ces anomalies de l'architecture neuronale ne sont complètement élucidés. Pour certains

auteurs, ces altérations pourraient être corrélées à des anomalies subcellulaires impliquant les protéines du cytosquelette. En effet, le cytosquelette jouant un rôle majeur dans l'architecture et donc dans les fonctions neuronales (Lazarides, 1980 ; Nixon et Sihag, 1991 cités par Reinés *et al.*, 2004 ; Julien 1999), il est donc raisonnable de supposer que l'atteinte d'un composant du cytosquelette peut induire des défauts structuro-fonctionnels tels qu'observés dans des structures du SNC impliquées dans des pathologies psychiatriques.

5.1. Protéines du cytosquelette : rôles et fonctions

Le cytosquelette des neurones est composé de 3 types de filaments : les neurofilaments appartenant à la famille des filaments intermédiaires, les microfilaments et les microtubules. Les neurofilaments sont eux-mêmes constitués de 3 sous-unités, *heavy chain* NF-H, *middle chain* NF-M et *light chain* NF-L. Leur rôle principal est d'assurer un support structural pour les neurones et leurs synapses. Plus précisément, ils déterminent le diamètre axonal des neurones influençant ainsi considérablement la vitesse de conduction de l'influx nerveux (Paysan *et al.*, 2000 ; Shea et Chan, 2008) et le transport axonal (Chan *et al.*, 2005 ; Francis *et al.*, 2005). Les neurofilaments peuvent établir des connexions (*crosslinking*) avec les microtubules sous la dépendance d'un groupe de protéines : les MAPs (*Microtubule Associated Protein*) et notamment MAP2 (Dehmelt et Harpain, 2005 ; Di Stefano *et al.*, 2006). Cette dernière, principalement retrouvée au sein des dendrites, est impliquée dans l'assemblage des microtubules et intervient également dans la croissance en longueur (Sharma *et al.*, 1994 ; Teng *et al.*, 2001), la stabilité et la forme des dendrites (Dereksen *et al.*, 2007) lors de la neurogenèse.

5.2. Protéines du cytosquelette et pathologies psychiatriques

Plusieurs études ont mis en évidence une association entre la diminution d'expression de certaines protéines du cytosquelette et les anomalies morphologiques observées dans certaines pathologies psychiatriques. Par exemple, une altération des sous-unités des neurofilaments a été observée dans plusieurs modèles de pathologies neurodégénératives (Norgren *et al.*, 2003). De plus, une diminution de leur taux d'expression semble perturber le fonctionnement neuronal (Julien, 1999 ; Gotow, 2000). Reinés *et al.*, (2004) ont montré chez le rat soumis au *learned helplessness paradigm*, un modèle de dépression, que le taux de NFL était diminué de 55 % dans le CA3 et de 60 % dans le gyrus denté alors que ceux de NFM, NFH et MAP2 étaient inchangés. Les analyses immunohistochimiques de tissus *post mortem* provenant d'encéphale de patients atteints de schizophrénie a permis d'observer une diminution de l'expression de MAP2 (Arnold *et al.*, 1991 ; Somenarain et Jones, 2010 ; Shelton *et al.*, 2015) associée à une réduction en nombre des épines dendritiques (Shelton *et al.*, 2015) et des dendrites primaires et secondaires (Broadbelt *et al.*, 2002) des neurones hippocampiques. Les mêmes modifications concernant la structure dendritique

(nombre de dendrites et d'épines) ont été observées chez les patients souffrant d'anxiété (Soetanto *et al.*, 2010) et dans les modèles animaux de dépression induit par un stress chronique (Varidaki *et al.*, 2016).

5.3. Les effets de la corticostérone sur les protéines du cytosquelette

L'augmentation de la concentration plasmatique de cortisol a été observée chez les patients atteints du syndrome de Cushing (Starkman *et al.*, 1999) et chez les patients souffrant de syndrome dépressif majeur (Holsboer, 2000). Les patients atteints d'une de ces deux pathologies présentaient des symptômes cognitifs notamment des troubles de la mémoire (Starkman *et al.*, 2001, Campbell et MacQueen, 2004) suggérant ainsi une atteinte fonctionnelle de l'hippocampe. Le lien de causalité entre ce type de trouble cognitif et les effets des glucocorticoïdes à haute dose est couramment accepté. En effet, l'hippocampe exprimant fortement des récepteurs aux glucocorticoïdes est considéré comme une structure vulnérable aux excès de glucocorticoïdes. De nombreuses études sur modèle animal (Woolley *et al.*, 1990 ; Magarinos et McEwen, 1995 ; Bisagno *et al.*, 2000 ; McKittrick *et al.*, 2000 ; Sousa *et al.*, 2000) ou par analyse d'images IRM de patients atteints de syndrome dépressif majeur ont permis, d'une part de confirmer la corrélation entre les déficits cognitifs et la diminution du volume de l'hippocampe (Starkman *et al.*, 1999 ; Lorenzetti *et al.*, 2009) et, d'autre part, d'établir le lien de causalité entre les effets des glucocorticoïdes et les altérations volumétriques de l'hippocampe.

Le cytosquelette étant fortement impliqué dans la morphologie neuronale et donc dans leur fonctionnalité, d'autres études ont cherché à préciser les effets d'un excès de glucocorticoïdes sur les protéines du cytosquelette et ont émis l'hypothèse selon laquelle une altération des protéines du cytosquelette induite par un excès de glucocorticoïdes était le mécanisme sous-jacent de l'atrophie de l'hippocampe observée chez les patients atteints de pathologies psychiatriques caractérisées par un hypercortisolisme.

Cereseto *et al.*, (2006), ont ainsi démontré qu'une administration chronique de corticostérone (deux pastilles sous cutanées de 100 mg) durant 21 jours chez le rat adulte induit une atrophie des dendrites des cellules pyramidales de l'hippocampe associée à une diminution de la transcription du gène codant pour MAP2, NFL, NFM et NFH. A noter que dans cette étude, le nombre des neurones hippocampiques n'était pas affecté par l'administration de corticostérone et restait inchangé par rapport aux rats du groupe « contrôle ». Ces résultats suggèrent que l'atrophie de l'hippocampe observée n'est pas liée à une diminution du nombre de cellules mais à des altérations morphologiques de l'arborisation dendritique des neurones hippocampiques. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude. En effet, chez la souris soumis à une administration de corticostérone (20 mg/kg) pendant 36 jours, Zhao *et al.*, (2009) ont observé des atteintes

morphologiques des dendrites des neurones hippocampiques et une diminution de l'expression de MAP2 dans l'hippocampe. De plus, chez la souris n'exprimant pas MAP2 (souris MAP2 *Knockout*), la croissance en longueur des dendrites est fortement affectée (Teng *et al.*, 2001) confirmant ainsi le rôle de MAP2 dans l'élongation des dendrites. Ces résultats, suggèrent qu'un excès chronique de glucocorticoïdes a des effets délétères sur l'expression des protéines du cytosquelette comme MAP2 aboutissant ainsi à des défauts morphologiques des dendrites, eux-mêmes responsables de l'atrophie et des altérations fonctionnelles de l'hippocampe.

6. Les récepteurs glutamatergiques

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Il peut être synthétisé *de novo* à partir du glucose par les astrocytes via le cycle de Krebs. Le glutamate peut également être recyclé par le cycle glutamine-glutamate. Une fois dans la fente synaptique, le glutamate non fixé à son récepteur, est éliminé via un transport (EAAT1 et EAAT2) exprimé par les cellules gliales. Dans ces dernières, le glutamate est converti en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine est ensuite transportée dans le neurone glutamatergique où elle est hydrolysée en glutamate par la glutaminase (Popoli *et al.*, 2012). Cet acide aminé régule la transmission et la plasticité synaptiques. Son action biologique s'exerce par la liaison sur deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques ou récepteurs à canaux ioniques et les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, elles-mêmes associées à un canal ionique. Les récepteurs ionotropiques regroupent 3 familles de récepteurs : les récepteurs : α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-Propionate (AMPA), Kaïnate et N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Les deux premiers sont principalement postsynaptiques alors que le dernier est plutôt présynaptique. Le GluR δ 2 est un récepteur particulier du glutamate appartenant à la famille des récepteurs AMPA. Cependant, contrairement aux récepteurs AMPA, le GluR δ 2 ne forme pas de canaux ioniques fonctionnels après fixation de son ligand et il ne lie aucun analogue structural du glutamate (Mandolesi *et al.*, 2009). Le récepteur GluR δ 2 est fortement exprimé au niveau des cellules de Purkinje du cervelet (Zhao *et al.*, 1998 ; Mandolesi *et al.*, 2009), et plus particulièrement au sein de la synapse entre les épines dendritiques de la cellule de Purkinje et les fibres parallèles (Landsend *et al.*, 1997). Cette localisation postsynaptique est observée dès J10 PN (Takayama *et al.*, 1996 ; Zhao *et al.*, 1998).

6.1. Rôles et fonctions de GluR δ 2 dans le développement du cervelet

La localisation synaptique de GluR δ 2 suggère un rôle éventuel du couple glutamate/GluR δ 2 dans la morphologie et/ou la fonctionnalité de la synapse entre les fibres parallèles et l'arborescence dendritique des cellules de Purkinje. Passafiumo *et al.* (2003) ont montré qu'une surexpression de

GluR δ 2 augmentait la taille et la densité des épines dendritiques des neurones hippocampiques. A *contrario*, chez la souris mutante GluR δ 2^{-/-}, le nombre de synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje est réduit (Kurihara *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que le GluR δ 2 est capital au développement normal des circuits cérébelleux et plus particulièrement à l'établissement et à la stabilisation des synapses entre l'arbre dendritique des cellules de Purkinje et les fibres parallèles.

De plus, en stabilisant ces synapses, GluR δ 2 joue un rôle actif dans l'établissement des synapses entre les fibres grimpantes et l'arborisation dendritique proximale des cellules de Purkinje de J10 à J14 PN (Zhao *et al.*, 1998 ; Hashimoto *et al.*, 2001 ; Morando *et al.*, 2001 ; Cesa *et al.*, 2003). En effet, chez la souris mutante GluR δ 2^{-/-}, les auteurs ont observé une expansion du territoire d'innervation des fibres grimpantes sur l'arborisation dendritique (Ichikawa *et al.*, 2002) et une persistance de la multi-innervation des fibres grimpantes sur la cellule de Purkinje (Kashiwabuchi *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que le glutamate en se fixant sur son récepteur GluR δ 2 induit un signal qui participe à la régression de la multi-innervation des fibres grimpantes sur l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje.

De J1 à J7 PN, GluR δ 2 se distribue le long de l'arborisation et des épines dendritiques des cellules de Purkinje (Takayama *et al.*, 1996 ; Kurihara *et al.*, 1997). Cette période correspond à la phase de compétition fonctionnelle qui permet de sélectionner la fibre grimpante la plus active (J3-J7 PN). Puis à partir de J14 PN, GluR δ 2 n'est exclusivement retrouvé qu'au sein des épines dendritiques des cellules de Purkinje (Goukko *et al.*, 2005).

6.2. Les effets du stress aigu et chronique sur les synapses glutamatergiques

Stress aigu (Popoli *et al.*, 2012)

Plusieurs études menées chez l'animal, suggèrent qu'une exposition à un stress aigu ou une administration aiguë de GC augmenteraient rapidement le relargage de glutamate dans la fente synaptique dans certaines régions limbiques et corticales du SNC comme l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal (Venero et Borrell, 1999 ; Reznikov *et al.*, 2007). Dans l'hippocampe, en l'absence de récepteurs aux GC (GR et MR), aucune augmentation du taux de glutamate n'a été observée suite à une exposition aux GC (Venero et Borrell, 1999). Ces résultats montrent l'implication des GR et MR dans les mécanismes de relargage du glutamate en situation de stress aigu. En effet, la fixation de GC sur ses récepteurs induit une augmentation d'expression du complexe SNARE. Il s'agit d'un complexe formé par l'assemblage de 2 protéines membranaires synaptiques syntaxin 1 ou 2 et SNAP25 et d'une protéine vésiculaire synaptobrevin 1 ou 2. La fonction principale du complexe SNARE est de favoriser la fusion des vésicules synaptiques à la

membrane présynaptique. Ce mécanisme permet d'augmenter le relargage de glutamate dans la fente synaptique (Popoli *et al.*, 2012).

Au niveau postsynaptique, à la suite d'un stress aigu, la surface d'expression des récepteurs au glutamate (NMDA et AMPA) est augmentée (Yuen *et al.*, 2009). Cet effet est observé une heure après l'exposition au stress aigu et perdure pendant 24 heures après sa cessation. Des résultats similaires ont été obtenus par un traitement court à la corticostérone (Yuen *et al.*, 2009 ; Yuen *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2010). Cette augmentation d'expression postsynaptique des récepteurs au glutamate induit une augmentation de la transmission synaptique basale (augmentation de la potentialisation synaptique).

Plusieurs études suggèrent qu'un stress peut également affecter les fonctions des cellules gliales notamment le métabolisme du glutamate de ces cellules. Celui-ci passe par la recapture du glutamate de la fente synaptique via un transporteur exprimé par la cellule gliale : EAAT1 ou 2. Cette étape permet 1) d'influencer la transmission synaptique et la plasticité (Tzingounis et Wadiche, 2007) et 2) d'éviter les effets excitotoxiques qui sont médiés par la fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA extra-synaptiques (O'Shea, 2002). Chez l'animal, un stress aigu semble augmenter l'expression d'EAAT2 au niveau des cellules gliales et augmenter la recapture du glutamate dans le cortex frontal et l'hippocampe (Gilad *et al.*, 1990). Ces modifications sur la recapture du glutamate pourraient contribuer à la réponse adaptative au stress sur les fonctions cognitives.

Stress chronique

Il a été démontré qu'un stress chronique par pincement répété de la queue de l'animal (3x/j) induit un relargage augmenté en durée et en amplitude de glutamate dans l'hippocampe (Moghaddam, 2002). Une autre étude a montré des résultats complémentaires, un rat stressé chroniquement pendant 21 jours soumis à une nouvelle exposition à un stress aigu présente un taux extracellulaire de glutamate qui reste élevé dans la région CA3 de l'hippocampe en comparaison à un rat soumis à un stress aigu mais non exposé préalablement à un stress chronique. Un stress chronique semble donc avoir des effets délétères sur la régulation du relargage du glutamate.

Les effets d'un stress chronique s'observent également sur l'expression postsynaptique des récepteurs au glutamate. En effet, chez les rats soumis à un stress chronique, une diminution d'expression des récepteurs NMDA et AMPA a été observée dans les neurones du cortex préfrontal (Yuen *et al.*, 2010). Ce déficit en récepteurs peut contribuer à l'altération de la transmission et la plasticité synaptiques dans le cortex préfrontal et ainsi expliquer les troubles cognitifs mis en évidence chez le rat stressé chroniquement (Liston *et al.*, 2006 ; Cerqueira *et al.*, 2005). Une diminution de la plasticité synaptique entre le cortex préfrontal et l'hippocampe a été associée à

une diminution des performances de la mémoire et des troubles de l'attention (Liston *et al.*, 2006 ; Vyas *et al.*, 2002 ; McEwen, 1999).

Chez les patients dépressifs, l'immuno-marquage de la protéine GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), principale protéine des neurofilaments des astrocytes matures était diminuée dans le cortex préfrontal, l'amygdale et le cervelet (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2000 et 2010 ; Fatemi *et al.*, 2004 ; Altshuler *et al.*, 2010). Des résultats identiques ont été observés dans l'hippocampe d'animaux soumis à un stress chronique (Fuchs, 2005 ; Liu *et al.*, 2010) ou chez l'animal traité chroniquement à la corticostérone (diminution de plus de 20 %) (O'Callaghan *et al.*, 1991 ; Nichols *et al.*, 1990). D'autres études ont au contraire montré une augmentation d'expression de GFAP dans l'hippocampe après un traitement chronique aux glucocorticoïdes (Ramos-Remus *et al.*, 2002 ; Bridges *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les effets des glucocorticoïdes sur l'expression de GFAP et donc sur le nombre de cellules gliales dépendent de la région considérée et de la dose reçue.

La recapture du glutamate de la fente synaptique via les transporteurs EAAT1 et 2 exprimés par la cellule gliale est aussi altérée dans l'hippocampe de rats soumis à un stress chronique (Zink *et al.*, 2010).

De plus, des études *post mortem* réalisées chez des patients souffrant de syndrome dépressif majeur ont montré une diminution d'expression dans le cortex préfrontal de *GLUL*, le gène codant pour la glutamine synthétase qui convertit le glutamate en glutamine (Sequeira *et al.*, 2009). Une autre étude menée chez le rat exposé à un stress chronique a montré une diminution du cycle glutamate/glutamine dans le cortex préfrontal (Banasr *et al.*, 2010). Cependant aucune modification du taux de glutamine synthétase n'a été observée. Une diminution de la recapture du glutamate par la cellule gliale pourrait par exemple expliquer ces résultats.

Suite à un stress chronique, l'augmentation du relargage de glutamate dans la fente synaptique, la diminution d'expression des récepteurs postsynaptiques au glutamate, la diminution de recapture du glutamate extracellulaire ou l'augmentation de l'activation des récepteurs extra-synaptiques au glutamate générant une excitotoxicité sont autant de mécanismes pouvant être impliqués dans les changements structuraux observés chez les patients présentant des troubles de l'humeur ou de l'anxiété (Beart et O'Shea, 2007 ; Kim *et al.*, 2011).

II. OBJECTIFS

Plusieurs études ont démontré qu'un stress subi précocement durant le développement pouvait perturber la régulation du taux sérique basal de glucocorticoïdes. Cet excès de glucocorticoïdes serait délétère pour l'organisation cellulaire et moléculaire du cervelet et de l'hippocampe en développement. Ces altérations structurales se traduiraient cliniquement par des désordres fonctionnels sous forme de déficits moteurs, cognitifs et émotionnels suggérant ainsi un éventuel mécanisme physiopathologique de pathologies psychiatriques. Les effets d'un taux supraphysiologique de glucocorticoïdes sur la mise en place des effecteurs cellulaires de l'hippocampe et du cervelet sont bien rapportés dans la littérature lorsque l'animal subi un stress chronique ou des administrations chroniques de corticostérone durant la période embryonnaire. Ainsi, un stress prénatal par confinement de la mère en gestation, affecte le développement de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje chez les souris déterminant une atrophie de cette arborisation à l'âge adulte (Pascual *et al.*, 2010). Une autre étude a montré qu'un même stress exercé durant la période embryonnaire, modifie durablement la multiplication cellulaire du cortex cérébelleux. Le ratio cellules de Purkinje/cellules à grains est augmenté modifiant ainsi l'organisation des contacts synaptiques entre ces deux types cellulaires (Ulupinar *et al.*, 2006). D'autres auteurs ont démontré que chez la souris, une injection unique de glucocorticoïdes à J1, J4, J7 ou J10 PN induit une apoptose rapide et sélective des précurseurs des cellules à grains de la couche granulaire externe réduisant ainsi de manière permanente le nombre de cellules à grains de la couche granulaire interne à l'âge adulte (Noguchi *et al.*, 2008). Durant la période postnatale, les souris traitées par corticostérone de J2 à J14 PN ont une activité motrice augmentée à J13 et J26 PN alors que leurs performances motrices sont diminuées à l'âge adulte dans les tests du rotarod et du champ ouvert. Cette diminution des performances est associée à une réduction de volume de 25 % du cervelet (Howard and Granoff, 1968). Ainsi l'analyse de la littérature montre qu'à l'instar de l'hippocampe, le cervelet est une structure sensible aux glucocorticoïdes et que ceux-ci ont un effet sur la fonction cérébelleuse notamment lorsque l'exposition aux glucocorticoïdes survient pendant la période embryonnaire et la première semaine postnatale. Cependant, le cervelet et l'hippocampe présentent la particularité d'initier leur développement durant la période embryonnaire et de l'achever après la naissance, au cours du premier mois postnatal. Il faut donc considérer la période postnatale comme une période à risque durant laquelle ces deux structures peuvent être vulnérables à toutes modifications environnementales comme une exposition au stress. D'autant plus que le premier mois postnatal est une période marquée par 3 événements majeurs concomitants qui sont cruciaux pour la fonctionnalité du cervelet : 1) la prolifération et la migration des précurseurs des futures cellules à grains, de la couche granulaire externe vers la couche granulaire interne ; 2) la croissance de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje ; 3) l'établissement et la maturation des connexions

synaptiques entre les cellules de Purkinje et ses afférences : les fibres grimpantes et les fibres parallèles.

Cependant, l'impact d'une administration chronique de corticostérone sur le développement postnatal du cervelet et plus particulièrement sur la période juvénile (J8 à J29 PN) correspondant à la mise en place de la couche granulaire interne et à l'établissement des contacts synaptiques entre les cellules de Purkinje et ses afférences reste peu étudié. Nous nous proposons donc d'étudier cette période cruciale pour la maturation fonctionnelle du cervelet afin de répondre dans un premier temps à deux principales questions : 1) La corticostérone administrée chroniquement chez le souriceau durant cette période pourrait-elle induire un effet délétère sur le développement postnatal du cervelet ? 2) Les glucocorticoïdes sont-ils capables de modifier l'expression de certains facteurs neurotrophiques impliqués dans la mise en place et l'organisation des différents types cellulaires retrouvés au sein du cervelet et *in fine* avoir un impact à long terme sur la fonctionnalité du cervelet ?

III. MATERIELS et METHODES

1. Animaux

Les études ont été menées chez des souris mâles de souche C57BL/6J âgées de 8 jours obtenues par élevage au sein du laboratoire à partir de couples de souris issues du laboratoire Charles River (L'Arbresle, France). Les souriceaux ont été élevés en présence de leur mère dans une cage transparente à une température de 23 à 25°C, une hygrométrie comprise entre 27 à 30 %, un cycle jour/nuit de 12h/12h et une alimentation *ad libitum*.

Pour la première étude, deux lots de souriceaux mâles ont été constitués. Dans chacun des lots, les souriceaux ont été répartis en 2 groupes : un groupe dit « contrôle » et un groupe dit « corticostérone ». A partir du 8^{ème} jour postnatal (J8 PN), chaque souriceau a reçu en début de matinée (heure comprise entre 8h et 10h) pendant 8 jours consécutifs (de J8 à J15 PN) pour le premier lot et pendant 22 jours consécutifs (de J8 à J29 PN) pour le second lot, une injection sous-cutanée de corticostérone (20 mg/kg) ou de diméthylsulfoxyde (DMSO pour groupe contrôle) selon son groupe d'appartenance (Figure 7).

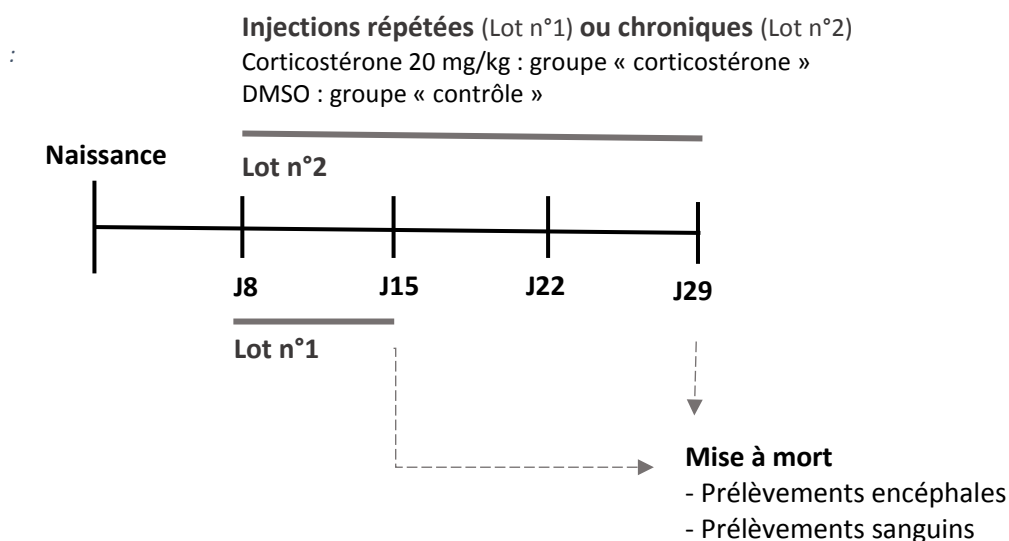


Figure 7 : Représentation schématique du protocole expérimental. Dans ce volet de l'étude, le lot de souriceaux n°1 a reçu une injection de corticostérone (20 mg/kg) ou de DMSO (pour le groupe « contrôle ») de J8 à J15 PN. Le lot n°2 a été traité pharmacologiquement de la même manière de J8 à J29 PN. La mise à mort est survenue pour ces 2 lots de souriceaux à respectivement J15 et J29 PN. Elle a été suivie du prélèvement des encéphales et de prélèvements sanguins.

Bien que les femelles soient exclues de l'étude, elles ont également été injectées avec une solution de sérum physiologique afin d'éviter tout rejet par la mère des souriceaux mâles manipulés. La mère a été écartée de la cage le temps de l'injection. Les animaux ont été pesés chaque jour afin d'adapter le volume injecté (5 µL/g) en fonction de l'évolution pondérale. Dans chaque portée, le nombre de souriceaux traités à la corticostérone était équivalent ($n \pm 1$ pour les portées ayant un nombre impair de mâles) au nombre de souriceaux traités par DMSO afin d'éviter l'effet portée.

Chaque souriceau mâle a été identifié via un marquage au feutre réalisé sur la queue et renouvelé tous les 3 à 4 jours. Les souris ont été mises à mort respectivement à J15 et J29 PN (*Figure 7*). Chaque lot comprenait 33-34 souris, dont la moitié a été destinée aux analyses histologiques et l'autre aux analyses quantitatives d'expression des gènes en qPCR.

Pour le second volet de l'étude, un troisième lot de souris a été traité pharmacologiquement de la même manière de J8 à J29 PN, le groupe corticostérone comprenant 11 souriceaux et le groupe contrôle 10 souriceaux. A la fin des injections, les souris mâles ont été séparées des femelles et élevées par cage de trois à quatre souris jusqu'à atteindre un âge de 3 mois. Elles ont alors effectué une série de tests comportementaux durant seize jours consécutifs avant d'être mises à mort (*Figure 8*).

Le poids de l'animal a été mesuré une fois par jour durant le protocole d'injection de corticostérone ou de DMSO puis une fois par semaine de J29 PN à 3 mois pour le troisième lot de souris.

Pour ces 3 lots de souris, lors de la mise à mort, les encéphales ont été prélevés, pour des études quantitatives relatives d'expression des gènes en qPCR et pour des études histologiques et histochimiques (*Tableau 8*).

Toutes les expérimentations *in vivo* ont été conduites selon les directives de l'Union européenne (2010/63/UE) et la législation en vigueur au sein de l'université de Lorraine (n° d'agrément : CELMEA-2012-0008).

Tableau 8 : Récapitulatif du nombre d'animaux utilisés par lot en fonction des différents protocoles réalisés dans l'étude.

	Lot n°1	Lot n°2	Lot n°3
Injections	J8 à J15 PN	J8 à J29 PN	J8 à J29 PN
Mise à mort	J15 PN	J29 PN	3 mois
Morphométrie COX	Contrôle : 8 encéphales CORT : 9 encéphales	Contrôle : 10 encéphales CORT : 8 encéphales	Contrôle : 10 héli-encéphales CORT : 11 héli-encéphales
qPCR	Contrôle : 8 encéphales CORT : 8 encéphales	Contrôle : 8 encéphales CORT : 8 encéphales	Contrôle : 10 héli-encéphales CORT : 11 héli-encéphales

Injections chroniques (21 jours)

Corticostérone 20 mg/kg : groupe corticostérone (n=11)

DMSO : groupe contrôle (n=10)

Lot n°3

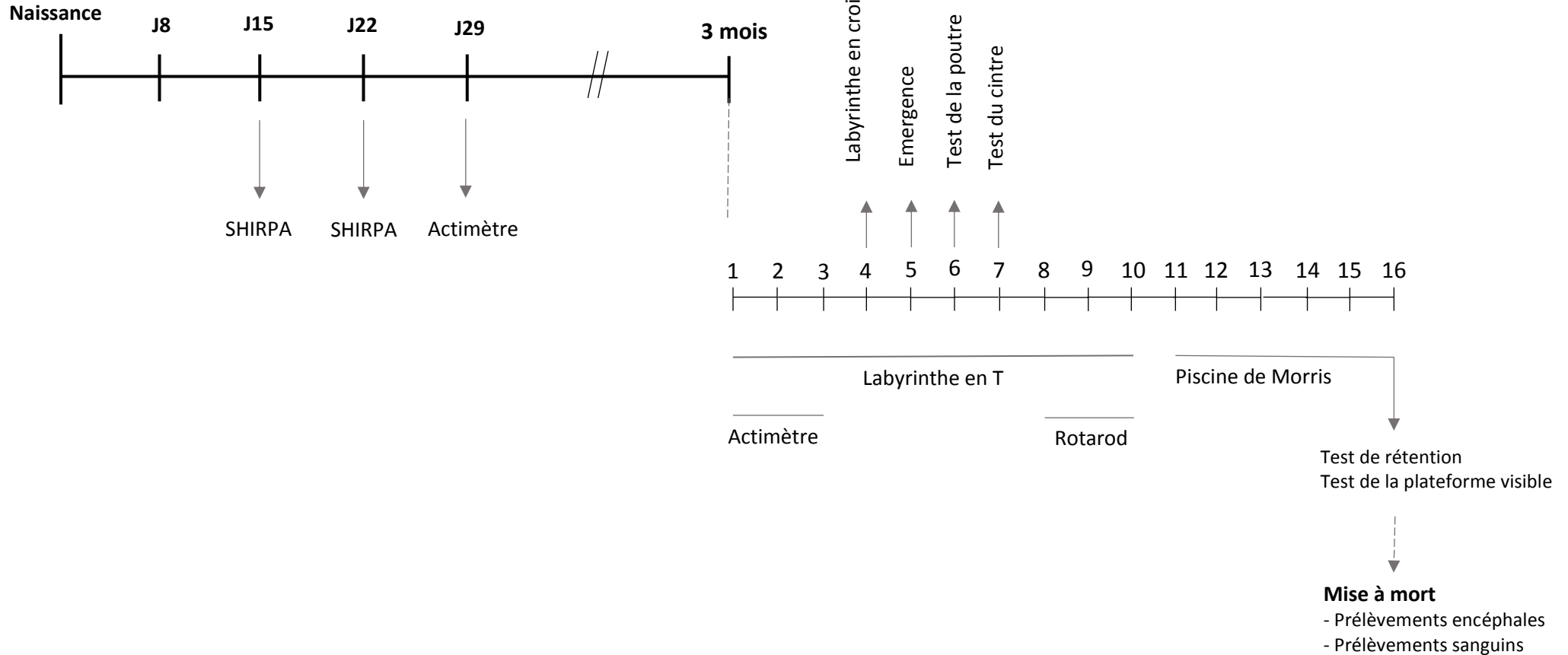


Figure 8 : Représentation schématique du protocole expérimental. A partir de J8 PN et durant 22 jours consécutifs les souriceaux ont reçu une injection de corticostérone (20 mg/kg) ou de DMSO (pour le groupe contrôle). Dans ce second volet de l'étude, les souriceaux ont subi un S.H.I.R.P.A à J15 et J22 PN puis un actimètre à J29 PN. A l'âge de 3 mois, les souris, avant d'être mises à mort, ont réalisé une nouvelle batterie de tests comportementaux afin d'expertiser l'activité motrice, les capacités d'exploration, l'anxiété, l'équilibre, la posture, la coordination motrice et les capacités d'apprentissage visuo-spatial. Les encéphales des souris de 3 mois ont été prélevés pour réaliser le dosage des transcrits en qPCR de la CRH, du CRH-R1, du récepteur aux glucocorticoïdes, du BDNF, de TrKB, de MAP2 et de NFL et pour des études histologiques et histochimiques.

2. Préparation des solutions de corticostérone et de DMSO

La corticostérone (Tocris Bioscience) est dissoute dans une solution de DMSO (Sigma-Aldrich Saint-Quentin) de 0.1 M (195 mg de DMSO dissout dans 25 mL de sérum physiologique) afin d'obtenir une concentration de corticostérone de 4 mg/mL. Les deux solutions de DMSO et de corticostérone sont préparées à une température comprise entre 30°- 40°C sous hotte à flux laminaire (Poste de sécurité Microbiologique de type II) dans des conditions optimales contre la contamination bactérienne, puis aliquotées, et enfin conservées au congélateur à – 20°C.

3. Mise à mort et prélèvements des tissus

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Baxter, Guyencourt). Chaque animal est installé en décubitus dorsal afin de réaliser une thoracotomie suivie d'un prélèvement sanguin par ponction intracardiaque. Ce prélèvement sera ensuite centrifugé à 3000 rpm durant 20 minutes à température ambiante afin de récupérer le sérum surnageant qui sera conservé à – 80°C jusqu'à réalisation des analyses. La souris est ensuite décapitée et l'encéphale est prélevé après craniotomie. Pour les analyses histologiques, l'encéphale est immédiatement plongé durant quelques secondes dans un bain d'isopentane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin) refroidi par carboglace à température comprise entre –35°C et -45°C. Une fois fixé (5 à 10 sec), il est empapilloté dans du papier aluminium identifié puis conservé à -80°C. Pour les analyses en qPCR, l'encéphale est immédiatement disséqué sur glace. Le cervelet, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex préfrontal sont prélevés, conservés dans des tubes Eppendorf au congélateur à -80°C. A noter que pour chaque souris âgée de 3 mois, l'encéphale a été divisé en deux selon le plan sagittal médian. L'hémi-encéphale droit était destiné à la préparation de coupes histologiques et l'hémi-encéphale gauche était disséqué immédiatement sur glace afin de prélever le cervelet, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex préfrontal.

4. Préparation des coupes histologiques

Pour chaque encéphale, des coupes sériées, dans le plan frontal, sont réalisées au cryostat (HM525-MM France) à - 20°C. L'épaisseur de coupe est de 20 µm. Les coupes sont montées sur lames gélatinées puis conservées au congélateur à – 80°C. Les lames histologiques sont gélatinées afin d'améliorer l'adhérence des tissus sur la lame et de préserver ainsi l'intégrité des tissus lors des traitements histologiques. Pour gélater les lames, préalablement dégraissées par le fabricant, elles sont essuyées avec un papier haute précision puis plongées quelques secondes dans un bain composé de 0,5 g de gélatine et de 0,05 g de chrome-alun dissouts dans 100 mL d'eau distillée chauffée entre 40 et 50°C (Sigma-Aldrich pour tous les produits utilisés). Cette solution est filtrée

après préparation et avant la plongée des lames. Ces dernières ont été mises à sécher pendant quarante-huit heures à température ambiante sous protection pour éviter toute pollution.

5. Coloration histologique au crésyl violet

Le crésyl violet marque les corps de Nissl et le noyau des neurones. La densité du marquage mesurée par absorbance reflète la densité cellulaire. Cette coloration permet donc d'évaluer une éventuelle modification du nombre de cellules. Une coloration au crésyl-violet est réalisée sur une série de coupes provenant des souris mises à mort à J15 PN, J29 PN et 3 mois selon le protocole de Bolam (1992) décrit ci-dessous :

- Les lames sont séchées à température ambiante puis fixées pendant vingt-quatre heures dans une solution de formaldéhyde tamponnée à 4 % ;
- Un dégraissage des tissus est obtenu par trempage successif (3 minutes chacun) des lames dans une série de bains d'alcool de concentration croissante puis décroissante : alcool 50°, 70°, 90°, 100° (2 fois), xylène, alcool 100° (2 fois), 90°, 70°, 50° ;
- Après un rinçage à l'eau distillée, les lames sont immergées dans une solution filtrée de crésyl violet à 0,5 % durant 30 minutes (15 mL d'acétate de sodium 1 M, 75 mL d'acide formique 0,2 M, 150 mL de crésyl violet aqueux 0,5 % pour 250 mL de solution (Sigma-Aldrich pour tous les produits utilisés) ;
- Un rinçage à l'eau distillée et une déshydratation par trempage (3 minutes chacun) dans des bains d'alcool (50°, 70°, 90°, 100°) (2fois), xylène (2 fois) sont effectués avant le montage des lames à l'eukitt®. Pour parfaire la différenciation de la coloration par déshydratation à l'alcool, quelques gouttes d'acide acétique sont rajoutées dans les bains d'alcool à 70 et 90°.

L'observation se fait au microscope à transmission en lumière blanche.

6. Etude Morphométrique

Pour chaque souris âgée de 15J, 29J et 3 mois, les coupes colorées au crésyl violet ont permis de mesurer 1) l'épaisseur des couches granulaire et moléculaire de plusieurs lobules du cervelet (simplex, crus I, crus II, paramédian, vermis IV/V), 2) l'épaisseur des différentes couches de la zone 1 de la corne d'Ammon (CA1) et du gyrus denté (DG) de la formation hippocampique et 3) la surface du néostriatum (caudé-putamen). Les différentes régions ont été identifiées par le biais de l'atlas de stéréotaxie de l'encéphale de souris de Franklin et Paxinos (1997). Les épaisseurs des couches cellulaires ont été mesurées à l'aide du logiciel Image J (version 1.37, *National Institutes of Health*) après avoir réalisé une calibration permettant de convertir les pixels en micromètres. Pour le

cervelet, la planimétrie du cortex a été vérifiée et validée par les cellules de Purkinje formant une ligne continue et la continuité des fissures interlobulaires. A noter que la couche des cellules de Purkinje a été incluse dans la mesure de la couche moléculaire. Au sein des lobules simplex et vermien IV/V, les mesures ont été réalisées sur 2 coupes séparées de 60 à 100 μm en effectuant 6 mesures par coupe (Figure 9). Les coupes ont été sélectionnées entre 5,8 et 6,2 mm en postérieur du point bregma. Les mesures des couches cellulaires du lobule paramédian ont été effectuées de manière similaire sur deux coupes situées en postérieur de 6,7 à 7 mm du point bregma. Enfin pour les lobules Crus I et Crus II, les coupes ont été choisies entre 6,2 et 6,5 mm en postérieur du point bregma.

Pour l'hippocampe et le striatum, les mesures ont été réalisées sur deux coupes situées respectivement en postérieur de 1,58 et 1,94 mm du point bregma et en antérieur de 0,5 et 0,14 mm de ce même point. Ces mesures morphométriques ont été réalisées sur 7 à 9 souris de chaque groupe en fonction de la planimétrie intrarégionale. Pour l'hippocampe, les mesures d'épaisseur étaient réalisées pour la région CA1 (Oriens, pyramidale et moléculaire) et la région du gyrus denté (granulaire, moléculaire et piriforme). Le calcul de la surface du néostriatum se faisait automatiquement après pointage du périmètre de la zone.

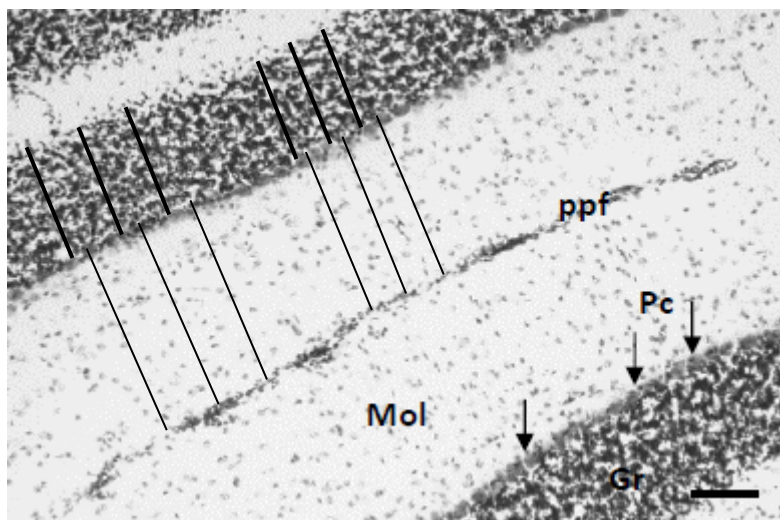
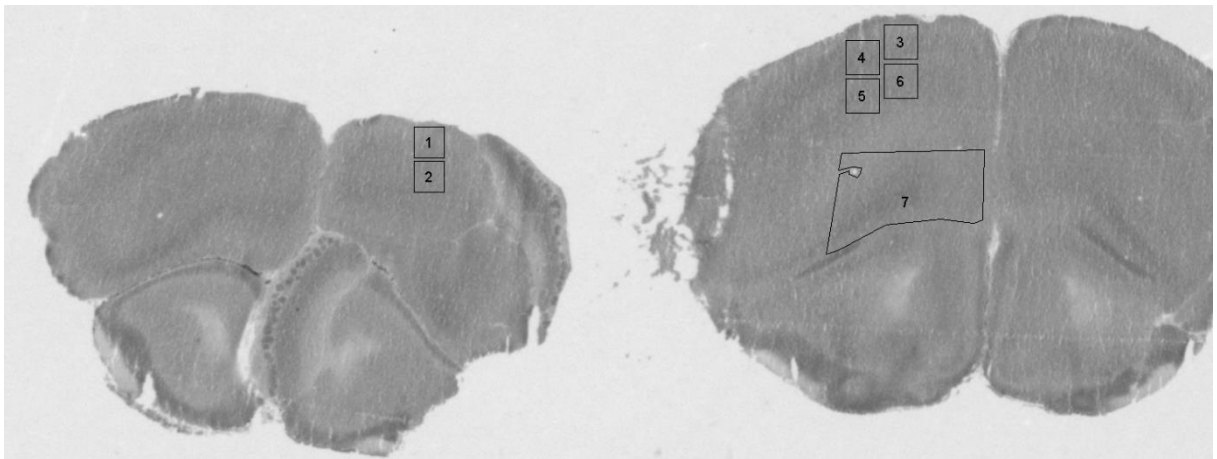


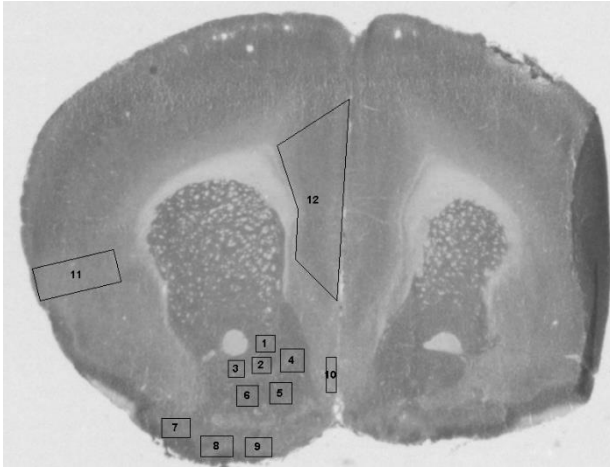
Figure 9 : Coupe histologique du lobe paramédian du cortex cérébelleux d'une souris âgée de 3 mois, colorée au crésyl violet. Les 3 couches cellulaires constitutives du cortex cérébelleux sont observées. Pour les couches moléculaire et granulaire, six mesures ont été réalisées afin de déterminer l'épaisseur de ces deux couches cellulaires. Mol : couche moléculaire ; Pc : Cellules de Purkinje ; Gr : couche granulaire. Ppf : fissure pré-pyramidale. Barre d'échelle = 300 μm .

7. Marquage histochimique de la cytochrome c oxydase

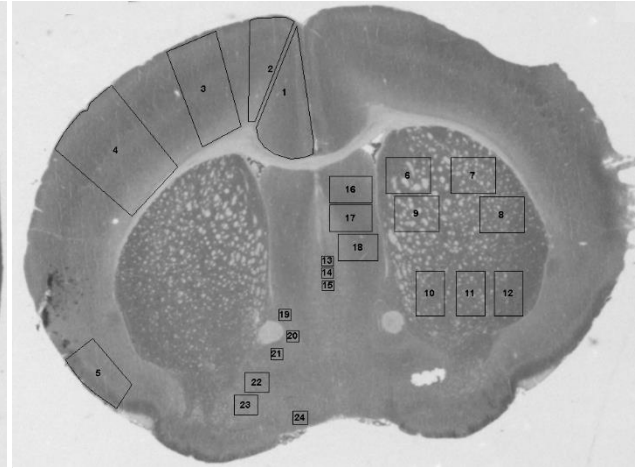
Le marquage histochimique de la cytochrome c oxydase a été réalisé sur une série de coupes d'encéphales des souris de 15J, 29J et 3 mois selon le protocole proposé par Wong-Riley (1979) et modifié par Strazielle *et al.* (1998). L'activité de la cytochrome c oxydase, une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale responsable de phosphorylation oxydative, est corrélée à l'intensité de marquage histochimique de cette dernière et à l'activité neuronale (Wong-Riley 1989 ; Gonzalez-Lima et Jones, 1994). Le protocole consiste à mélanger de façon successive sous agitation constante et à 37°C : 8 g de sucrose, 180 mL de tampon phosphate de sodium à 0.1M à pH 7.4, 40 mg de cytochrome c (Sigma-Aldrich, France) et 36 mg de catalase (Sigma-Aldrich, France). Les lames sont ensuite incubées dans cette solution durant une heure sous agitation à 37°C à l'obscurité. Un rinçage à l'aide de tampon phosphate de sodium à 0.1M sucrosé à 10 % à 4°C pendant 5 minutes est ensuite effectué afin de stopper la réaction enzymatique. Puis les lames sont fixées dans un bain de formaline (formaldéhyde 4 % tamponné) pendant 30 minutes. Trois lavages successifs de 5 minutes dans du tampon phosphate de sodium à 0.1M sont effectués. Les lames subissent alors une déshydratation par plongée dans deux bains successifs d'alcool à 100° pendant 5 minutes et deux bains de xylène pendant 5 minutes. Les coupes sont montées à l'Eukitt (Sigma-Aldrich, France) et mises à sécher une nuit à température ambiante. Des photographies des coupes ont été réalisées sur banc optique (*Figure 10*).



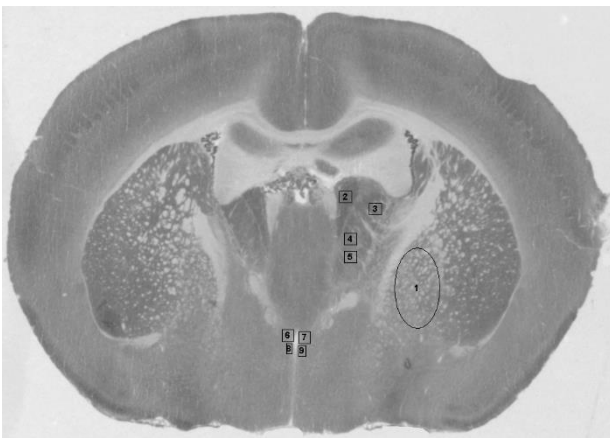
1-2 : Cortex préfrontal ; 3-6 : Cortex moteur secondaire ; 7 : Cortex orbital.



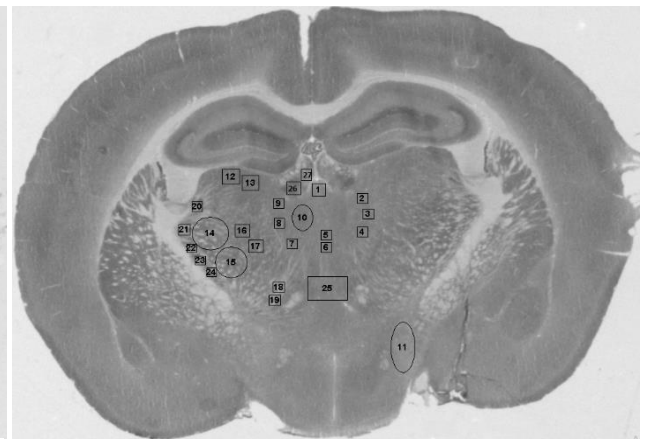
1-6 : Accumbens ; 7-9 : Tubercule olfactif ; 10 : Noyau du bras vertical de la bande diagonale de Broca ; 11 : Cortex insulaire granulaire ; 12 : cortex prélimbique.



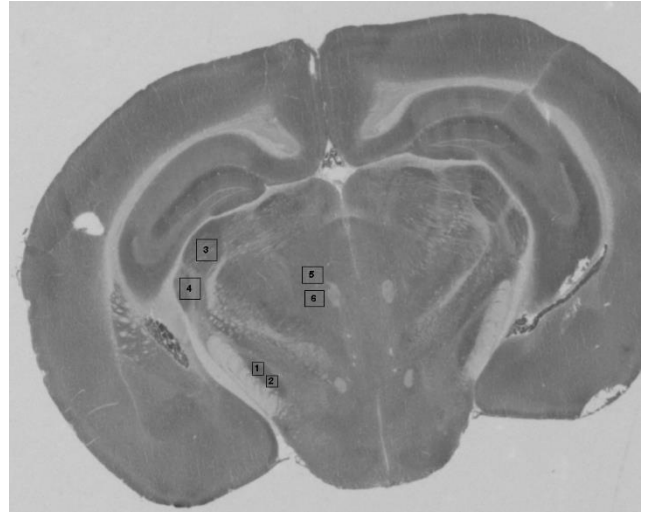
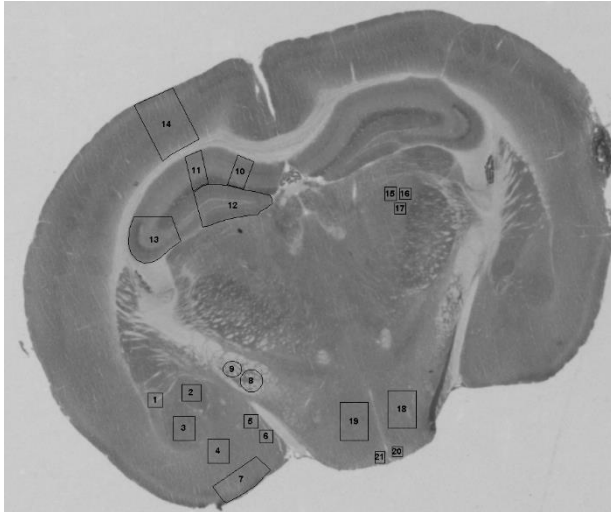
1 : Cortex cingulaire ; 2 : Cortex moteur secondaire ; 3 : Cortex vertical de la bande diagonale de Broca ; 4 : Cortex sensoriel ; 5 : Cortex piriforme ; 6 et 9 : Caudé-putamen ; 7-8 : Striatum dorsolatéral ; 10-12 : Striatum ventral ; 13-15 : Septum médial ; 16-18 : Septum latéral ; 19-21 : Noyau du lit de la strie terminale ; 22-23 : Pallidum ventral ; 24 : Noyau du bras horizontal de la bande diagonale.



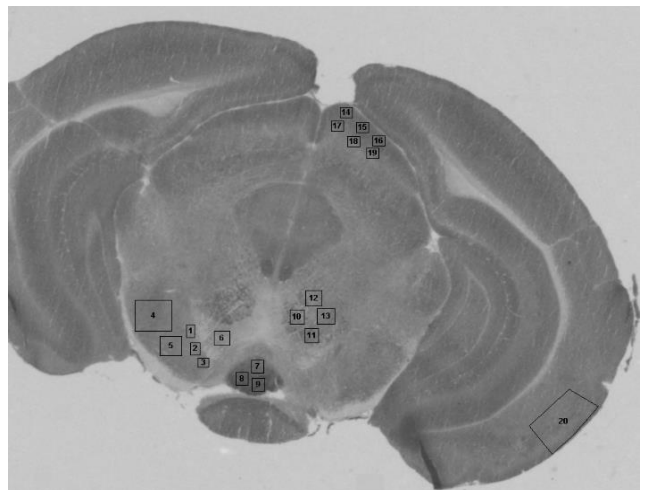
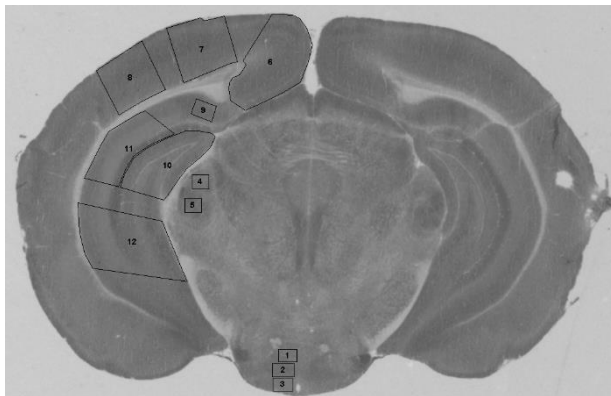
1 : Globus pallidus ; 2-5 : Thalamus antérieur ; 6-9 : Hypothalamus paraventriculaire.



1 : Noyau paraventriculaire du thalamus ; 2-9 : Noyaux thalamiques centromédial et centrolatéral ; 10 : Noyau thalamique mésiodorsal ; 11 : Noyau latéral de l'hypothalamus ; 12-13 : Noyau thalamique latérodorsal ; 14-15 : Noyaux thalamiques ventropostéromédian et ventropostérolatéral ; 16-17 : Noyau thalamique ventrolatéral ; 18-19 : Noyau thalamique ventromédial ; 20-24 : Réticulée ; 25 : Reunions Rhomboïde ; 26 : Habenula latérale ; 27 : Habenula médiale.

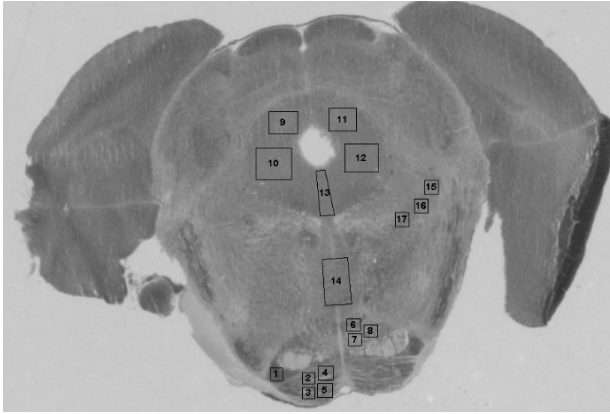


1 : Amygdale latérale ; 2 : Amygdale centrale ; 3-4 : Amygdale basale ; 5-6 : Amygdale médiale ; 7 : Amygdale corticale ; 8-9 : Pallidum médial ; 10-11 : Corne d'Ammon 1 ; 12 : Gyrus denté ; 13 : Corne d'Ammon 2/3 ; 14 : Cortex pariétal postérieur ; 15-17 : Thalamus postérieur ; 18-19 : Noyau médian de l'hypothalamus médian ; 20-21 : Noyau arqué de l'hypothalamus.

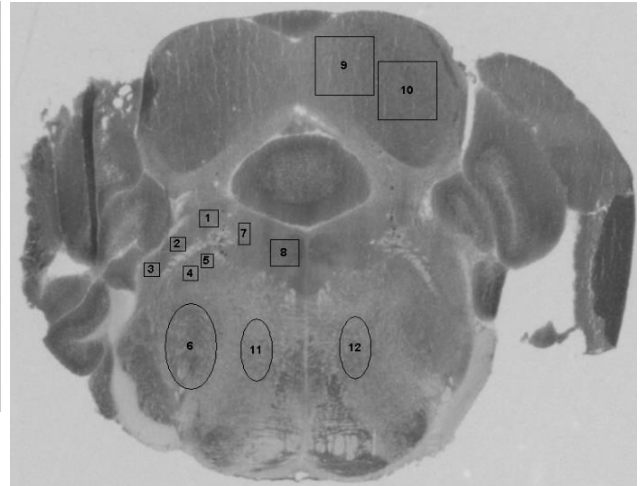


1-3 : Corps mammillaires ; 4-5 : Noyau géniculé médial ; 6 : Cortex rétrosplénus ; 7 : Cortex visuel secondaire médial ; 8 : Cortex visuel primaire ; 9 : Subiculum ; 10 : Gyrus denté ; 11 : Corne d'Ammon 1 ; 12 : Corne d'Ammon 2/3.

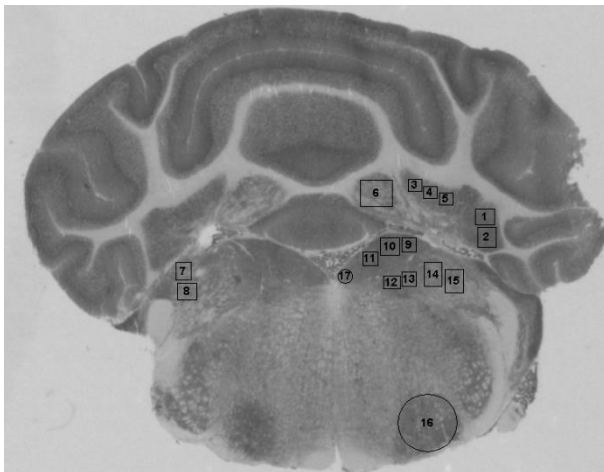
1-3 : Substance noire compacte ; 4-5 : Substance noire réticulaire ; 6 : Aire tegmentale ventrale ; 7-9 : Noyau interpédonculaire ; 10-11 : Noyau rouge magnocellulaire ; 12-13 : Noyau rouge parvocellulaire ; 14-19 : Colliculus supérieur ; 20 : Cortex entorhinal.



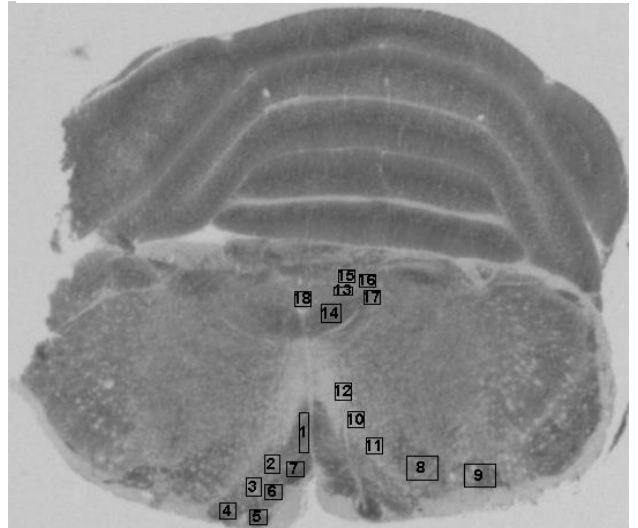
1-5 : Noyau du pont ; 6-8 : Noyau de la rétillée tegmentale ; 9-12 : Substance grise périaqueducale ; 13 : Noyau du raphé dorsal ; 14 : Noyau du raphé médian ; 15-17 : Noyau pédonculopontique du tegmentum.



1-3 : Noyau parabrachial latéral ; 4-5 : Noyau parabrachial médial ; 6 : Noyau moteur du V ; 7 : Locus Coeruleus ; 8 : Noyau tegmental latérodorsal ; 9-10 : Colliculus inférieur ; 11-12 : Rétillée pontique.



1-2 : Noyau dentelé ; 3-5 : Noyau interposé ; 6 : Noyau fastigial ; 7-8 : Noyau vestibulaire latéral ; 9-11 : Noyau vestibulaire médial parvicellulaire ; 12-13 : Noyau vestibulaire médial médiocaudal ; 14-15 : Noyau vestibulospinal ; 16 : Noyau moteur du VII ; 17 : Noyau prépositus.



1-7 : Olive bulbaire ; 8-9 : rétillée latérale ; 10-12 : Rétillée paramédiane ; 13 : Noyau moteur du X ; 14 : Noyau moteur du XII ; 15-17 : Noyau solitarii ; 18 : Area postrema.

Figure 10 : Cartographie histochimique de l'activité de la cytochrome c oxydase.

8. Dosage de la corticostérone sérique

Lors de la mise à mort de l'animal, le sang a été prélevé puis centrifugé afin de récupérer le sérum qui fut congelé à -80°C (cf. Mise à mort et prélèvements des tissus). Le taux de corticostérone sérique a été déterminé par test ELISA selon les instructions du kit « *DetectX corticosterone Enzyme Immunoassay* » (Arbon assays, Euromedex, France). Chaque échantillon a été analysé en duplicata. Les mesures d'absorbance à 450 nm ont été effectuées via un lecteur de plaque (WALLAC 1420 VICTOR², *microplate reader*). Une gamme étalon a permis de normaliser les valeurs obtenues afin d'obtenir la concentration de corticostérone en ng/mL de chaque échantillon.

9. Extractions ARN sur colonnes d'affinité

L'extraction des ARN totaux du cervelet, de l'hippocampe, et de l'hypothalamus prélevés suite à la mise à mort des souris, a été effectuée à l'aide du kit NucleoSpin[®]RNA (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les recommandations du fabricant (*Tableau 9*).

Tableau 9 : Protocole d'extraction des ARN sur colonnes d'affinité selon les recommandations du fabricant (kit NucleoSpin[®]RNA, Macherey-Nagel, Allemagne).

Pour 30 mg de tissu maximum	Pour chaque colonne
1. Préparation du tissu : Sous hotte, dans le tube contenant le tissu : <ul style="list-style-type: none">- Ajouter 350 μL de tampon RA1.- Ajouter 3.5 μL de β-mercaptoéthanol.- Vortexer puis réaliser une lyse mécanique du tissu.	+ 350 μL RA1 + 3.5 μL β -ME
2. Filtration <ul style="list-style-type: none">- Dans un tube de 2 mL, surmonté du <i>NucleoSpin Filter</i>[®] : prélever le tissu lysé (sans les agrégats) et le déposer sur la colonne.- Centrifuger à 11 000g pendant 1 min.	11 000 g 1 min
3. Adapter les conditions de liaison des ARN <ul style="list-style-type: none">- Prélever le contenu du tube et le déposer dans un tube de 1.5 mL en évitant la masse visqueuse.- Centrifuger à vitesse maximum pendant 3 min.- Récupérer le contenu du tube sans les débris et le placer dans un nouveau tube 1.5 mL.- Ajouter 350 μL d'éthanol 70 %.- Centrifuger à vitesse maximum pendant 3 min.	+ 350 μL Ethanol 70 % Vitesse maximum 3 min
4. Liaison des ARN <ul style="list-style-type: none">- Récupérer le surnageant et le déposer dans une colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®].- Centrifuger à 11 000g pendant 30 sec.- Placer la colonne dans un nouveau tube 2mL.	11 000g 30 sec
5. Desalt silica membrane <ul style="list-style-type: none">- Ajouter 350 μL de MDB (<i>Membrane Desalting Buffer</i>).- Centrifuger à 11 000g pendant 1 min.	+ 350 μL MDB 11 000g 1 min

<p>6. Elimination de l'ADN</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dans un tube de 1.5 mL : préparer la <i>DNase reaction mixture</i> avec 10 µL de <i>reconstituted rDNase</i> et 90 µL de tampon de réaction pour rDNase. Homogénéiser à la pipette. - Dans une colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®], retirer le filtre et jeter le liquide contenu dans le tube puis repositionner la colonne dans le tube. - Ajouter 95 µL de <i>DNase reaction mixture</i> au centre de la membrane de la colonne. - Laisser incuber à température ambiante pendant 15 min. 	<p>+ 95 µL <i>DNase reaction mixture</i></p> <p>Incubation 15 min</p>
<p>7. Lavage et séchage de la membrane</p> <p>1^r Lavage</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter de 200 µL tampon RAW2 dans la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®]. - Centrifuger à 11 000g pendant 30 sec. - Placer la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®] dans un nouveau tube 2mL. <p>2^{ème} Lavage</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 600 µL de tampon RA3 dans la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®]. - Centrifuger à 11 000g pendant 30 sec. - Retirer la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®], vider le tube puis repositionner la colonne. <p>3^{ème} Lavage</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 250 µL de tampon RA3 dans la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®]. - Centrifuger à 11 000g pendant 2 min. 	<p>+200 µL RAW2 11 000g 30 sec</p> <p>+ 600 µL RA3 11 000g 30 sec</p> <p>+ 250 µL RA3 11 000g 2 min</p>
<p>8. Eluer les ARN</p> <ul style="list-style-type: none"> - Placer la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®] dans un nouveau tube de 1.5 mL. - Ajouter 60 µL d'eau <i>RNase-free</i>. - Centrifuger à 11 000g pendant 1 min. 	<p>+ 60 µL RNase-free H₂O</p> <p>11 000g 1 min</p>
<p>9. Conservation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Jeter la colonne <i>NucleoSpin RNA Column</i>[®]. - Conservation sur glace si utilisation à court terme. - Conservation à – 80°C si utilisation reportée à plus long terme. 	<p>Glace ou – 80°C</p>

Les extractions d'ARN totaux concernant l'hypothalamus des souris de 15 jours, ayant été inefficaces à l'aide de ce kit, elles ont été réalisées à l'aide du protocole d'extraction au Trizol[®] (Tableau 10).

Tableau 10 : Protocole d'extraction des ARN au TRIZOL®.

<p>1. Préparation du tissu : phase de séparation</p> <p>Sous hotte, dans le tube contenant le tissu :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 500 µL TRIZOL® <i>regent</i>. - Incuber à température ambiante pendant 5 min. - Réaliser une lyse mécanique du tissu. - Ajouter 100 µL de chloroforme puis vortexer 15 sec. - Incuber à température ambiante pendant 2-3 min. - Centrifuger à 12 000 g pendant 5 min à 4°C. - Récupérer la phase aqueuse.
<p>2. Isoler les ARN totaux</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 250 µL d'isopropanol 100% à la phase aqueuse. - Incuber à température ambiante pendant 10 min. - Centrifuger à 12 000 g pendant 10 min à 4°C.
<p>3. Lavage</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eliminer le surnageant. - Ajouter 500 µL d'éthanol 70 % - Vortexer brièvement puis centrifuger à 7500 g pendant 5 min à 4°C. - Eliminer le surnageant. - Laisser sécher à l'air ambiant pendant 5-10 min. - Re suspension : ajouter 50 µL RNase-free H₂O.
<p>Conservation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Conservation sur glace si utilisation à court terme. - Conservation à – 80°C si utilisation reportée à plus long terme.

Le dosage de la concentration d'ARN de chaque éluat obtenu a été réalisé via le Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

10. Transcription inverse des ARNm

Pour chaque échantillon, la transcription inverse des ARNm obtenus a été effectuée selon le protocole suivant (Thermo Fisher Scientific, France) :

- 200 ng d'ARN ont été incubés avec un mélange de 1 µL dNTP (10 µM), 1 µL de *random primer* (50 ng/µL) pour un volume final de 12 µL pendant 5 minutes à 65°C puis 2 minutes à 4°C.
- 4 µL de tampon RT 5X, 2 µL de DDT (0.1 µLM), 0,5 µL de RNase Out (40 U/ µL) et 0,5 µL de M-MLV (200 U/ µL) ont été ajoutés avant une incubation de 10 minutes à 25°C, de 50 min à 37°C et de 5 minutes à 70°C.
- Les ADNc obtenus pour chaque échantillon ont été conservés à – 20°C.

11. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les variations d'expression des gènes d'intérêt ont été évaluées à l'aide d'analyses en PCR quantitative en temps réel (qPCR). Pour chaque échantillon, 1.5 µL d'ADNc ont été déposés dans un puit contenant le mélange suivant : 7.5 µL de *mix Takyon No ROX SYBR®* (Eurogentec, Belgique),

1.5 µL d'amorce sens à 1 µM, 1.5 µL d'amorce anti sens à 1 µM (*Tableau 11*) (Eurogentec, Belgique) et 3 µL d'eau ultra pure. Les variations d'expression des gènes d'intérêt ont été analysées à l'aide d'une machine *Realplex2 master-cycle* (Eppendorf, France). Pour chacun des gènes d'intérêt, l'efficacité d'amplification a été déterminée et une normalisation a été pratiquée en fonction de deux gènes de référence (*Ppia1* et *Eeif3*) dont la stabilité a été confirmée grâce à la feuille de calcul *Bestkeeper* (*Pfaffl et al., 2004*). Les amorces concernant les gènes codant pour la CRH, ses récepteurs CRH-R1 et CRH-R2, et le gène *NR3C1* étaient utilisées au laboratoire alors que les amorces des gènes codant pour le BDNF, son récepteur *TrkB*, *MAP2*, *NFL* et *GluRδ2* ont été nouvellement designées. Pour chacune des amorces, plusieurs mises au point ont été réalisées en fonction du tissu considéré, cervelet, hippocampe et hypothalamus, afin d'obtenir une efficacité de couple comprise entre 85 et 110%. L'efficacité est calculée à partir d'un calibrateur qui est obtenu par transcription inverse d'un mélange équimolaire des ARN de chaque souris.

Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés pour les analyses en qPCR.

Gènes	Séquence des oligonucléotides (5'-3')	Température d'hybridation Souris 3M	Température d'hybridation Souris 15 J	Taille (bp)
Gènes d'intérêt				
NR3C1	F: CAAGGGTCTGGAGAGGACAA R: TACAGCTTCCACACGTCAGC	61°C	61°C	220
CRH	F: GGCATCCTGAGAGAAGTCCCTC R: ACAGAGCCACCAGCAGCATG	62°C	62°C	128
CRH-R1	F: TGGTCTGCTGATCAACTTT R: GTCTCAGATGTGGTGGATGC	62°C	62°C	85
CRH-R2	F: GGGCATCACCTACATGCTC R: CAAAGAAACCCTGGAAGGAC	-	62°C	107
GluRδ2	F: CTGGCGACCGCTGATTCTAT R: CTGGTTGAGGTCACCAACTG	64°C	64°C	82
BDNF	F: TGGCCTAACAGTGTTCGAG R: TGTCAGCTCCACTTAGCCTC	62°C*	64°C	83
TrkB	F: TTCCGCCACCTTGACTTGTC R: ATGTCGCAGGAGCACGTGAA	60°C	60°C	25
MAP2	F: AGCTGAAGCTGTAGCAGTCC R: CTCCTCCACTGTGGCTGTT	62°C	62°C	118
NFL	F: CAAGATGGCCTTGACATCG R: ACCTGCGAGCTCTGAGAGTA	64°C	62°C	80
Gènes de référence				
Ppia1	F: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC R: GCGTGATAAAGTCACCACCCT	58 °C	58°C	150
Eif3f	F: CATCAAGGCCTATGTCAGCA R: GTGGTGGACTGTGTCTGG	61°C	61°C	117

*62°C pour le cervelet ; 64°C pour l'hippocampe.

12. Evaluation comportementale

Toutes les manipulations ont été réalisées l'après-midi (entre 13h00 et 18h00) dans une pièce spécifique dédiée à cet usage dont la luminosité a été contrôlée. Tous les tests ont été effectués selon un ordre préétabli (*Figure 8*) du moins anxiogène au plus anxiogène et selon les procédures dictées par Lalonde et Strazielle (2005).

12.1. Evaluation comportementale durant la période de développement postnatal

S.H.I.R.P.A. (SmithKline, Harwell, Imperial college, Royal hospital, Phenotype Assessment)

Indications :

Afin de suivre la mise en place des différents comportements moteurs qui signent le développement et la maturation des fonctions motrices, les 21 souriceaux ont été soumis au S.H.I.R.P.A. à J15 et J22. Le S.H.I.R.P.A., (Rogers *et al.*, 1999) regroupe une série de tests comportementaux expertisant rapidement et globalement la souris. Ils évaluent la présence des réflexes vestibulaires, posturaux, la tonicité musculaire ainsi que l'activité motrice. Ces tests explorent également succinctement les fonctions sensorielles, l'anxiété et certains paramètres végétatifs. L'évaluation est réalisée conjointement par deux observateurs.

Protocole :

Les premiers paramètres sont enregistrés lors de l'observation de l'animal placé sur une grille dans un cylindre transparent (*Figure 11A*) : la position du corps (*sur le ventre, sur le côté, prostrée, sur les quatre pattes, redressement possible, redressements répétés*), l'importance de l'activité motrice (*absente, lente, modérée, vigoureuse, extrême*), la fréquence respiratoire (*irrégulière, superficielle, normale*), le tremblement (*absent, moyen, marqué*) et la défécation (*nombre d'excréments*).

L'animal est ensuite transféré dans un champ ouvert (*Figure 11B*) afin d'observer : l'attitude de l'animal après transfert (*l'animal fige immédiatement après transfert, fige de façon prolongée, fige brièvement, fige momentanément, ne fige pas et explore*), l'activité motrice (*le nombre de carrés parcourus en 30 secondes*), l'ouverture des yeux (*ouvert, entrouvert, clos*), le redressement des poils (*absent, présent*), le réflexe auditif déclenché par des ultrasons de 90 dB (*aucun réflexe, réflexe de Preyer, sursaut ou saut > 1cm*), la démarche de l'animal (*normale, fluide mais anormale, limitée, absente*), la position de son bassin (*à plat, normale, élevée de plus de 3 mm*), et de sa queue (*vers le bas, horizontale, verticale*) ainsi que le réflexe d'évitement (*aucune réponse, léger, modéré, fuite vigoureuse après le toucher*).

La souris est ensuite saisie par la queue durant quelques secondes afin d'évaluer son état vigile (*se débat ou pas*), la tonicité des muscles dorsaux (*présence ou absence d'une lordose dorsale*) et la posture que l'animal adopte lorsqu'il est rapproché d'une grille qui va servir de support de

préhension (*absence de réponse, au contact du museau, au contact des vibrisses, par contact visuel (18cm), réponse anticipée > 25 cm*) (Figure 11C).

Sur la grille, sont enregistrées : la force d'agrippement lorsque l'animal est tracté vers l'arrière (*absent, léger, modéré, actif, extrêmement actif*), la tonicité de l'abdomen (*flasque, léger, résistant*) et l'activité des réflexes provoqués par stimulation tactile de la cornée (*absent, actif, multiples clignements des yeux*), et du pavillon de l'oreille (*absent, actif, multiples mouvements*), par flexion de la patte postérieure (*absent, léger, modéré, brusque, très brusque*) et par stimulation douloureuse provoquée par le pincement d'un orteil de la patte postérieure (*retrait de la patte postérieure absent, modéré, rapide ou très rapide*).

La souris est ensuite testée sur une barre horizontale, suspendue par les pattes antérieures pendant trente secondes, (*se déplace facilement, avec difficultés, en est incapable, chute après quelques secondes, chute immédiatement*) (Figure 11D).

La couleur de la peau (*blanche, rosée, rouge*), le rythme cardiaque (*lent, normal, rapide*), les phénomènes de larmoiement, de salivation et le réflexe de morsure (*absent, présent*) sont également renseignés. Plusieurs réflexes vestibulo-posturaux sont testés : le réflexe de redressement aérien (*atterrissage sur ses pattes, sur le côté, sur le dos*), le réflexe de retournement (Figure 11E) dans un tube transparent tourné à vitesse modérée (*absent, présent*) ainsi que le réflexe géotaxique sur une grille verticale (*tourne et grimpe, tourne et fige, se déplace sans effectuer de rotation, n'effectue aucun mouvement, chute immédiatement*) (Figure 11F). Ces observations sont complétées par tout autre signe de peur, d'irritabilité, d'agression et de vocalisation.

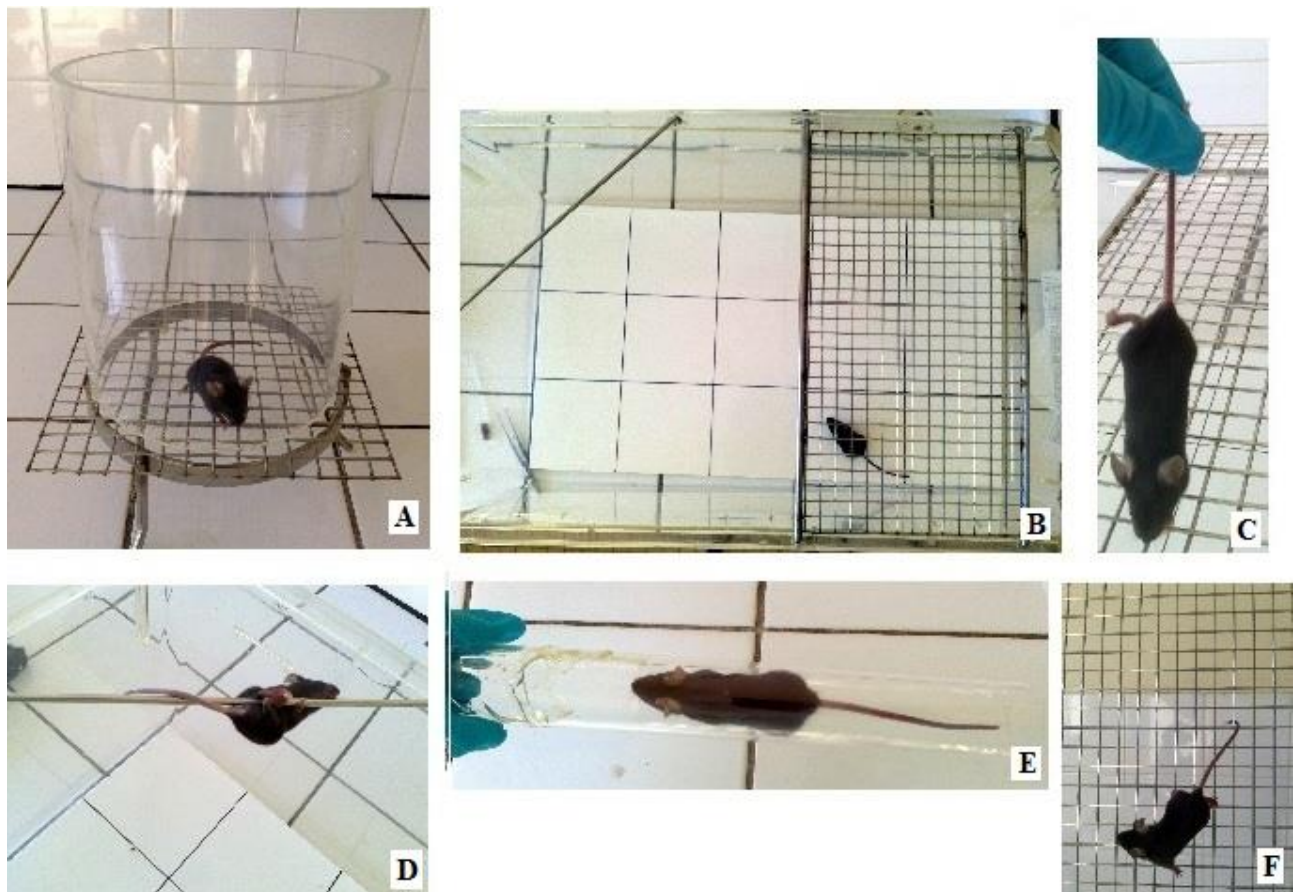


Figure 11 : Photographies du S.H.I.R.P.A. réalisé à J15 et J22 PN dans les deux groupes de souris « contrôle » et « corticostérone ». A : L'animal est placé sur une grille et dans un cylindre transparent (17.5 cm de hauteur et 14 cm de diamètre). B : Nous observons la souris dans le champ ouvert (d'une hauteur de 20 cm, d'une largeur de 32 cm et d'une longueur de 52 cm) qui est partiellement recouvert de la grille d'agrippement. Dans le coin gauche nous pouvons voir la tige métallique qui va servir au test de suspension. C : Souris atterrissant sur la grille d'agrippement. D : Souris placée sur la tige de suspension afin d'évaluer ses capacités à tenir et à se déplacer sur la barre durant 30 secondes. E : Souris placée dans un tube transparent tourné à vitesse modérée pour l'évaluation du réflexe vestibulaire de retournement. F : Souris dans son réflexe géotaxique : placée tête en bas sur une grille verticale, elle effectue normalement une rotation pour procéder à l'ascension de la grille.

Actimètre (Figure 12) (Letica, Modèle LE8811IR, Bioseb, France) : à J29

Indications :

L'actimètre est la version automatisée d'un champ ouvert. Le test mesure l'activité motrice de l'animal en relation avec son activation cérébrale et sa motivation à explorer un environnement nouveau.

Protocole :

L'animal est introduit au centre de l'enceinte (45 x 45 x 36 cm) qui permet de détecter six types de mouvements grâce à des cellules photoélectriques infrarouges : les déplacements horizontaux, les mouvements stéréotypés et les redressements rapides (< 10 cm/s) et lents (> 10 cm/s). La durée de l'essai pour chaque animal est de cinq minutes. L'enceinte est nettoyée à l'eau entre chaque souris afin de minimiser les odeurs.



Figure 12 : Actimètre (Leticia, Modèle LE8811IR) utilisé pour l'étude. Formé par une enceinte de 45 x 45 cm avec un fond noir et des parois transparentes de 36 cm de hauteur. Les capteurs à infrarouge sont placés à deux hauteurs différentes.

12.2. Evaluation comportementale à l'âge adulte

A l'âge adulte, les souris ont subi une série de tests comportementaux comprenant le test de l'alternance spontanée (JC1 à JC10), l'actimètre (JC1 à JC3), le labyrinthe en croix surélevé (JC4), le test d'émergence (JC5), le test de la poutre (JC6), le test du cintre (JC7), le rotarod (JC8 à JC10) et le test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de de Morris (JC11 à JC16).

Actimètre : de JC1 à JC3 (Figure 12)

Pour la population adulte, le test effectué sur trois jours consécutifs, du premier au troisième jour de comportement (JC), évalue le phénomène d'habituation. Le protocole est identique à celui décrit précédemment.

Labyrinthe en T : alternance spontanée (Figure 13) : de JC1 à JC10

Indications :

Cet appareillage teste l'alternance spontanée c'est-à-dire la tendance naturelle de la souris à explorer un endroit non familier de l'environnement.

Protocole :

Ce test s'effectue en deux temps : tout d'abord on impose à l'animal un choix forcé dans la mesure où la souris n'a accès qu'à un seul bras qu'elle explore pendant soixante secondes. Au terme de cette minute d'exploration, la souris est récupérée et placée à nouveau dans le bras central. Les deux bras du T sont alors ouverts et le temps mis par la souris pour rentrer dans l'un des deux bras du T est mesuré. Une alternance dans le libre choix est notée positivement (score = 1). Si la souris choisit de retourner dans le bras qu'elle a déjà exploré, le score attribué est de 0. Chaque souris effectue un essai par jour durant 10 jours consécutifs. Durant ces 10 jours, on procède à l'alternance

du bras fermé dans le choix forcé. L'enceinte est nettoyée à l'eau entre chaque souris afin de minimiser les odeurs.

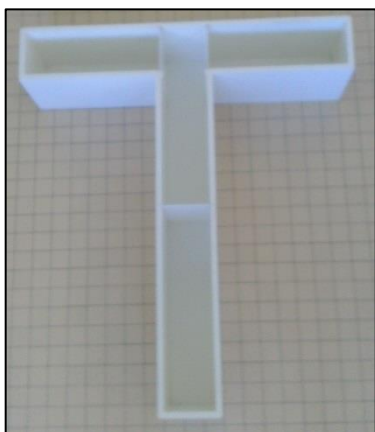


Figure 13 : Labyrinthe en T utilisé pour l'étude. Il est formé par 3 bras dont les parois ont une hauteur de 20 cm. En forme de T, il est constitué d'un bras central (80 cm de long, 10 cm de large) et de deux bras latéraux perpendiculaires (30 cm de long, 10 cm de large). A l'intersection du bras central et des deux bras perpendiculaires, un dispositif permet de fixer une paroi amovible permettant d'interdire l'entrée dans le bras.

Labyrinthe en croix surélevé (modèle LE 840 Letica, Bioseb, France) (Figure 14) : JC4

Indications :

Il s'agit d'un test utilisé afin d'évaluer l'anxiété et l'activité motrice de la souris. Un animal qui explore plus volontiers les bras ouverts sera qualifié de « peu anxieux » contrairement à un animal qui reste confiné dans les bras cloisonnés qui sera considéré comme « anxieux ».

Protocole :

La souris est introduite au niveau de la plateforme centrale. Le temps passé dans chacun des types de bras, ouverts et cloisonnés, ainsi que le nombre d'entrées dans ces zones sont mesurés. Si la souris chute durant l'essai, le chronomètre est arrêté le temps de réintroduire l'animal dans le labyrinthe à l'endroit même de sa chute. Chaque souris effectue un essai unique de cinq minutes. L'enceinte est nettoyée à l'eau entre chaque souris afin de minimiser les odeurs.



Figure 14 : Labyrinthe en croix surélevé utilisé dans l'étude. Ce labyrinthe est surélevé par rapport au sol de 68 cm et est constitué de deux bras ouverts (longueur : 45 cm, largeur : 10 cm) disposés perpendiculairement à deux bras cloisonnés dont les parois sont transparentes (longueur : 45 cm, largeur : 10 cm, hauteur : 9 cm). Les quatre bras sont reliés entre eux par une plateforme centrale (10 x 10 cm).

Le test d'émergence : JC5

Indications :

Ce test est également considéré comme un test d'anxiété, l'animal anxieux restant plus facilement dans un endroit confiné que sortant dans un espace plus large.

Protocole :

Les souris sont placées à l'intérieur de la petite enceinte (*Figure 15*). Les latences avant l'émergence de la souris dans la grande enceinte sont enregistrées pour les critères de deux pattes et quatre pattes. A la sortie de la petite enceinte, les souris sont autorisées à explorer la grande enceinte durant 10 secondes. Pour chaque souris, deux essais de 5 minutes sont réalisés avec un intervalle entre les deux essais de 60 minutes. L'enceinte est nettoyée à l'eau entre chaque souris afin de minimiser des odeurs.



Figure 15: Dispositif pour le test d'émergence. Une petite enceinte est fixée au centre d'une enceinte rectangulaire de taille 41 cm x 27 cm et d'une hauteur de 18 cm. La petite enceinte a la forme d'une chaussure de couleur orange perforée de trois trous de différents diamètres et l'ouverture supérieure qui permettent à la souris de sortir dans la grande enceinte.

Le test de la poutre (Figure 16) : JC6

Indications :

C'est un test permettant d'évaluer l'équilibre et la coordination motrice.

Protocole :

La souris est placée au centre de la poutre ronde et la distance parcourue (nombre de segments) est mesurée durant 1 minute. Le nombre de chutes et la latence avant la chute sont notés. Pour chaque souris, 4 essais sont réalisés avec un intervalle de 30 minutes entre chaque essai. La poutre est nettoyée à l'eau entre chaque souris afin de minimiser les odeurs.



Figure 16 : Dispositif du test de la poutre. Ce dispositif placé à 70 cm du sol, se compose d'une barre cylindrique de 110 cm de long gradué tous les 10 cm (11 segments) et de 2.5 cm de diamètre. Afin d'améliorer l'agrippement des souris, un ruban adhésif rugueux recouvre la poutre. Un tapis de protection est rajouté au sol pour prévenir les blessures lors d'une chute.

Le test du cintre (Figure 17) : JC7

Indications :

Le test du cintre est une version plus complexe du test de suspension, il expertise la tonicité musculaire, l'équilibre et la coordination motrice.

Protocole :

Dans ce test, la souris est placée au centre de la barre horizontale du cintre et lâchée par l'opérateur lorsque ses quatre pattes y sont agrippées. Plusieurs latences sont enregistrées (TM : temps du mouvement) pour atteindre : le premier segment situé à 10 cm du point de départ (TM-1), l'extrémité de la barre horizontale (TM-2) ; la barre diagonale avec deux pattes (TM-3) ; la barre diagonale avec trois pattes (TM-4) ; la barre diagonale avec quatre pattes (TM-5), le milieu de la barre diagonale (TM-6) et le sommet du cintre (TM-7). Chaque souris réalise quatre essais avec un intervalle de 30 minutes entre chaque essai.

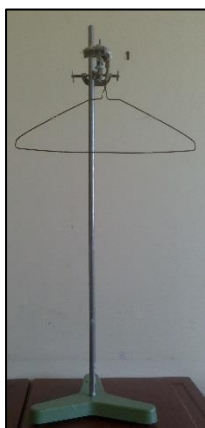


Figure 17 : Dispositif du test du cintre. Le cintre, disposé à 65 cm du sol, est constitué d'une barre métallique horizontale (diamètre : 2 mm, longueur 40 cm) et de deux barres angulées à 35° à chacune des extrémités du fil horizontal. Un tapis de protection est rajouté au sol pour prévenir les blessures lors d'une chute.

Rotarod (Rota-Rod/RS Letica, Bioseb, France) : de JC8 à J10

Indications :

Ce test permet d'expertiser la coordination motrice et d'évaluer les capacités d'apprentissage moteur de l'animal.

Protocole :

La souris est posée sur une barre en rotation dans une position précise (museau vers l'avant). Une fois l'appareil déclenché, le bât tourne à une vitesse croissante allant de 4 à 40 rpm en 2 minutes (Figure 18). L'animal doit se déplacer de façon coordonnée et adaptée à la vitesse de rotation pour éviter la chute. La latence avant la chute est mesurée de manière automatique. La chute de l'animal met fin à l'essai. Ce dernier est également stoppé lorsque la souris, s'agrippant à la poutre, effectue deux rotations complètes passivement. Chaque souris subit quotidiennement 8 essais de 2 minutes maximum avec un intervalle de 15 minutes entre chaque essai. Le même protocole est répété durant 3 jours consécutifs.



Figure 18 : Rotarod (Rota-Rod/RS Letica) utilisé dans l'étude. Cet appareil automatisé est formé d'une poutre rugueuse de 3 cm de diamètre actionnée par un rotor pour effectuer des rotations de vitesse déterminée. La poutre est cloisonnée de façon à permettre le travail de plusieurs souris dans un même temps. Lorsqu'elles chutent les souris tombent sur un levier qui arrête automatiquement le chronomètre individuel.

Test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris : de JC11 à JC16

Indications :

Ce dispositif permet d'évaluer les capacités d'apprentissage visuo-spatial et de mémorisation de la souris.

Protocole :

Il est constitué d'un bassin circulaire (diamètre : 86 cm, hauteur : 30 cm) rempli d'eau dans lequel se trouve une plateforme immergée à 1 cm en dessous de la surface de l'eau et rendue invisible par l'ajout de pastilles en plastique jaune flottant à la surface de l'eau. L'environnement du dispositif reste inchangé pendant toute la durée de l'évaluation. La plateforme, placée au centre du cadran Nord-Ouest, conserve cette position durant les 5 premiers jours du test. Le but de la souris est d'apprendre la position de cette plateforme d'échappement. Chaque souris effectue 4 essais d'une durée de 60 secondes par jour. Pour chaque essai, la souris est introduite dans le bassin par un des

quatre points cardinaux, le museau face à la paroi du bassin. L'ordre d'introduction de la souris dans le bassin est le suivant : Nord, Est, Sud et Ouest et ne diffère pas d'un jour à l'autre. Le nombre de cadrans parcourus (critère 4 pattes) et le temps écoulé pour atteindre la plateforme sont enregistrés en direct par l'observateur placé devant un moniteur relié à une caméra placée au-dessus du bassin. Si au terme des 60 secondes, la souris n'a pas embarqué sur la plateforme, elle est récupérée dans le bassin et placée sur la plateforme durant 5 secondes afin de susciter un repérage spatial.

Lors du sixième jour, la mémorisation de la tâche est évaluée par un test de rétention : la plateforme est retirée du bassin, la souris est introduite au Nord et le temps de nage passé dans le cadran Nord-Ouest, cadran où se situait la plateforme immergée durant les 5 jours précédents, est enregistré pendant un essai unique de 60 secondes. Le même jour, 90 minutes plus tard, un test de plateforme visible est réalisé : elle est déplacée dans le cadran Sud-Est, émergée et rendue visible par l'ajout d'un mât (*Figure 19*). La procédure est identique à celle des jours précédents (4 essais de 60 secondes avec introduction dans la piscine par les quatre points cardinaux). Le nombre de cadrans parcourus et le temps écoulé pour atteindre la plateforme sont comptabilisés. Si au terme des 60 secondes, la souris n'a pas embarqué sur la plateforme, elle est récupérée dans le bassin et placée sur la plateforme durant 5 secondes.



Figure 19 : Dispositif du test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris utilisé pour l'étude. Le bassin circulaire a une hauteur de 30 cm, un diamètre de 86 cm, et est rempli d'eau tempérée à 21-22°C. Ici, la photographie montre le test de la plateforme visible dans lequel la plateforme (diamètre 12 cm) est positionnée au Sud-Est. Une caméra surplombant la piscine permet à l'observateur resté à distance d'observer sans perturber le parcours de la souris.

13. Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel *Statview 4.1* pour Macintosh. Pour l'étude morphométrique, les mesures de densité optique suite au marquage de la COX et les résultats obtenus en qPCR, un test *t* de Student de comparaison des moyennes a été utilisé pour les comparaisons intergroupes. Etant donné le nombre important de mesures effectuées pour la cartographie du marquage de la COX, un test ANOVA à mesures répétées a tout d'abord été réalisé à l'échelle régionale ou à l'échelle des réseaux fonctionnels, puis pour les régions exprimant une différence significative, un test *t* de Student de comparaison des moyennes a été utilisé.

Pour le SHIRPA, des tests de Chi-carré ont été choisis pour l'ensemble des paramètres évalués à l'exception du nombre de carrés parcourus pour lequel un test *t* de Student a été appliqué. Des tests *t* de Student de comparaison des moyennes ont également été utilisés afin de comparer les résultats entre les deux groupes (contrôle et corticostérone) dans l'actimètre réalisé à J15 et J22, le labyrinthe en croix, l'émergence, la poutre et le cintre. Un test *U* de Mann-Whitney a été utilisé pour analyser les résultats obtenus dans le labyrinthe en T. Pour l'analyse des résultats du rotarod, de l'actimètre à 3 mois, et du test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris, des tests d'ANOVA à mesures répétées ont été appliqués. Le test de corrélation de Pearson a été utilisé pour évaluer un lien possible entre les résultats comportementaux et morphométriques. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$ pour tous les tests.

IV. RESULTATS

➤ PREMIER VOLET DE L'ETUDE

Deux lots de souris ont été traités par injections répétées de corticostérone pendant 8 jours (de J8 à J15 PN) pour le premier lot et par injection chronique pendant 22 jours (de J8 à J29 PN) pour le second lot. La mise à mort des souris a été respectivement effectuée à J15PN et J29PN. Les encéphales ont été prélevés afin 1) de réaliser des analyses histologiques (coloration au crésyl violet et marquage de la COX) et 2) d'évaluer par qPCR l'expression de gènes d'intérêt codant pour des hormones du stress telles que la CRH, son récepteur CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes NR3C1 ; des facteurs de croissance comme certaines protéines du cytosquelette MAP2 et NFL ou des neurotrophines comme le BDNF et son récepteur TrkB ; ainsi que le récepteur GluR δ 2 un récepteur du glutamate, principal neurotransmetteur exciteur du SNC. L'objectif de ces études était de déterminer l'impact direct et à court terme 1) d'injections répétées de corticostérone de J8PN à J15PN et 2) d'une administration chronique de J8PN à J29PN de corticostérone sur la mise en place et la maturation des structures cellulaires du cervelet durant la période postnatale.

1. Évaluation du poids des animaux

Le poids des deux groupes de souris a été évalué quotidiennement durant la période d'injection. Aucune différence intergroupe n'a été mise en évidence, le poids moyen des souris du groupe corticostérone et celui du groupe contrôle rapportés dans le tableau 12, étant quasi les mêmes.

Tableau 12: Évolution du poids des animaux, avant le début des injections, à J15 après 8 jours d'injection et à J29 après 22 jours d'injection (Test t de Student).

	J8	J15	J29
Contrôle	3,75 \pm 0,19	6,59 g \pm 0,26	11,25 \pm 0,54
Corticostérone	3,65 \pm 0,17	6,44 g \pm 0,34	11,72 \pm 0,71
p	0,5688	0,7326	0,0641

Seul un effet jour a été observé du fait de la croissance des animaux ($F(1,7)=213,6$; $p<0,0001$ à J15 PN et $F(1,20)= 273,44$; $p<0,0001$ à J29 PN).

2. Évaluation du taux de corticostérone sérique

Chez la souris âgée de 15 jours, le taux de corticostérone sérique était majoré de 59 % chez les souris traitées par rapport aux souris du groupe contrôle (respectivement, 169,7 ng/mL \pm 23,2 vs 106,7 ng/mL \pm 15,4 avec $t(26)=2,26$ et $p=0,03$).

Chez la souris âgée de 29J, le taux de corticostérone sérique était majoré de 42 % chez les souris traitées par rapport aux souris du groupe contrôle (respectivement, 310,5 ng/mL \pm 32,4 vs 218,2 ng/mL \pm 29,8 avec $t(20)=2,09$ et $p=0,049$).

3. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur la morphométrie cérébelleuse et hippocampique observée à J15 PN et à J29 PN

Le marquage au crésyl violet des coupes d'encéphale de souris de 15 jours et de 29 jours a permis d'évaluer 1) les épaisseurs des différentes couches granulaires interne et externe, et moléculaire, de plusieurs lobules du cervelet : vermis IV/V, simplex, crus I, crus II et paramédian (Figure 20); et 2) les épaisseurs des différentes couches constitutives de l'hippocampe, notamment des régions CA1 et DG. Les résultats sont présentés dans les tableaux 13 et 14.

Tableau 13 : Morphométrie de différents lobules cérébelleux chez la souris 15J et 29J.

Lobules	CERVELET 15J			CERVELET 29J	
	Granulaire externe	Moléculaire	Granulaire interne	Moléculaire	Granulaire interne
Simplex	+ 5,9 %	+ 1,2 %	+ 7,8 %*	+ 6,9 %*	+ 10 %**
Crus I	+ 39,3 %*	+ 7 %	+ 15,9 %	- 11,7 %*	- 1 %
Crus II	+ 2,4 %	- 3,3 %	+ 3,4 %	+ 0,3 %	- 3,3 %
Paramédian	-21,5 %**	- 7 %*	- 20 %**	+ 8 %*	+ 25,5 %**
Vermis IV/V	+ 38,4 %**	- 0,7 %	+ 12,9 %*	NM	NM

* p< 0,05 ; **p<0,01 ; NM : non mesurée, (Test t de Student).

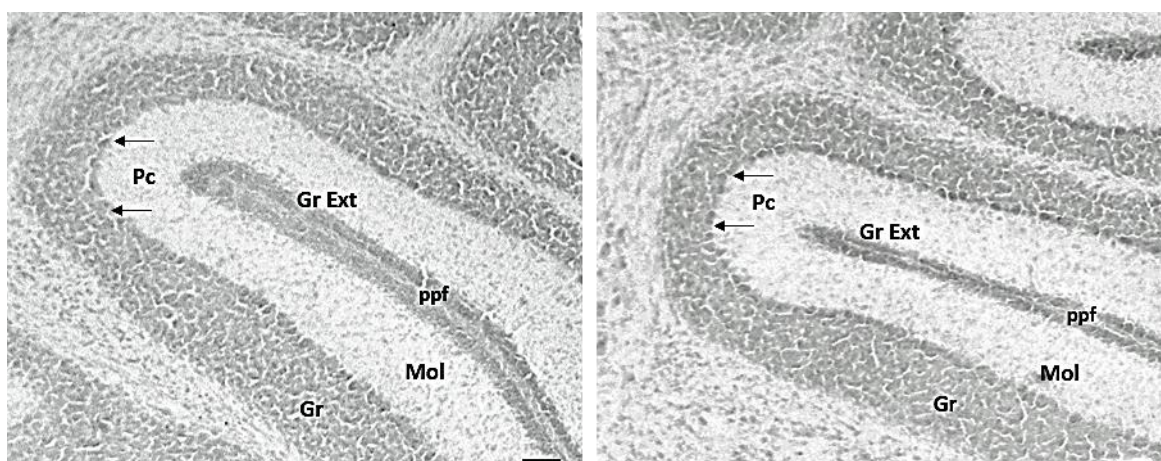


Figure 20 : Morphométrie du cervelet, coupe du lobule paramédian mettant en évidence la diminution d'épaisseur des trois couches cellulaires chez les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale (figure droite) par rapport aux souris du groupe « contrôle » (figure gauche). Mol : couche moléculaire ; Pc : cellule de Purkinje ; Gr : couche granulaire interne ; Gr : couche granulaire externe ; ppf : fissure pré-pyramidale. Barre d'échelle = 300 μ m.

La corticostérone a modifié l'architecture des lobules simplex et paramédian pour les deux durées de traitement. Toutefois, une hypertrophie caractérisait le lobule simplex alors que le lobule paramédian a montré une diminution d'épaisseur de ses trois couches cellulaires à J15 PN et une hypertrophie des couches granulaire et moléculaire après un traitement chronique à la corticostérone de 22 jours.

Tableau 14 : Morphométrie hippocampique chez la souris 15J et 29J.

		HIPPOCAMPE 15J	HIPPOCAMPE 29J
CA1	Oriens	+ 0,6 %	+ 0.9 %
	Pyramidale	+ 5,2 %*	+ 9,7 %*
	Moléculaire	+ 13,5 %*	+ 5 %*
DG	Moléculaire	- 2 %	- 8,7 %*
	Granulaire	- 12,3 %*	- 4,9 %**

* p< 0,05 ; **p<0,01 ; (Test t de Student).

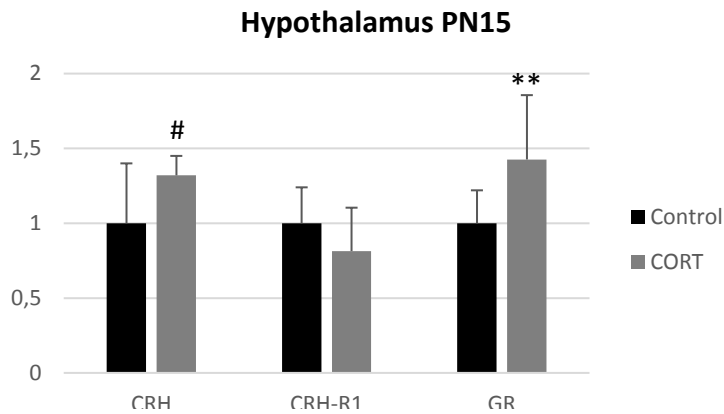
Le traitement à la corticostérone administré durant 8 jours ou 22 jours consécutifs, a induit une augmentation d'épaisseur des couches cellulaires de la corne d'Ammon (CA1) alors qu'une hypotrophie des couches moléculaire et granulaire a été observée dans le gyrus denté, structure immature bénéficiant de migration cellulaire lors du développement postnatal de l'animal.

4. Impact d'une administration de corticostérone de J8 à J15 PN sur l'expression de transcrits d'hormones du stress, de protéines du cytosquelette, de neurotrophines et du récepteur GluRδ2

La migration des futures cellules à grains de la couche granulaire externe à la couche granulaire interne, le développement de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje, la mise en place des fibres grimpantes et des synapses entre les fibres parallèles et la cellule de Purkinje impliquent plusieurs facteurs. L'objectif de la quantification d'expression des gènes d'intérêt (gènes codant pour CRH, CRH-R1, CRH-R2, GR, MAP2, NFL, BDNF, TrkB, GluRδ2) était de déterminer si l'administration de corticostérone pouvait modifier l'expression de ces facteurs impliqués dans les différentes étapes de développement du cervelet et de l'hippocampe.

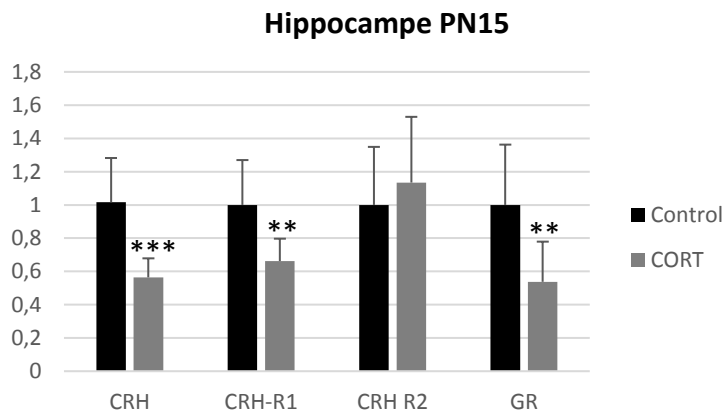
Hormones du stress à J15 PN

Dans l'hypothalamus (Figure 21), l'expression des gènes codant pour la CRH et le récepteur aux glucocorticoïdes était respectivement augmentée de 32,3% (p=0,0507) et de 42,6% (p=0,0394).



*Figure 21 : Variations d'expression des gènes codant pour la CRH, son récepteur CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes observées dans l'hypothalamus chez les souris J15, traitées par injections répétées de corticostérone de J8 à J15 PN. * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$; # $p = 0,05$, (Test t de Student).*

Dans l'hippocampe, les injections répétées de corticostérone de J8 à J15 PN ont induit une diminution significative de l'expression des gènes codant pour la CRH (-43,6 % ; $p = 0,0008$), le récepteur CRH-R1 (-33,8%, $p = 0,0068$) et le récepteur aux glucocorticoïdes (-46,2%, $p = 0,0095$) alors que l'expression de CRH-R2 était inchangée (Figure 22).



*Figure 22 : Variations d'expression des gènes codant pour la CRH, ses récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 et le récepteur aux glucocorticoïdes observées dans l'hippocampe chez les souris J15, traitées par injections répétées de corticostérone de J8 à J15 PN. ** $p = 0,01$; *** $p = 0,001$, (Test t de Student).*

Dans le cervelet, la figure 23 montre une diminution d'expression des gènes codant pour CRH-R1 (-51,1%, $p=0,0429$), CRH-R2 (-48%, $p=0,0422$), et pour le récepteur aux glucocorticoïdes (-48%, $p=0,0177$).

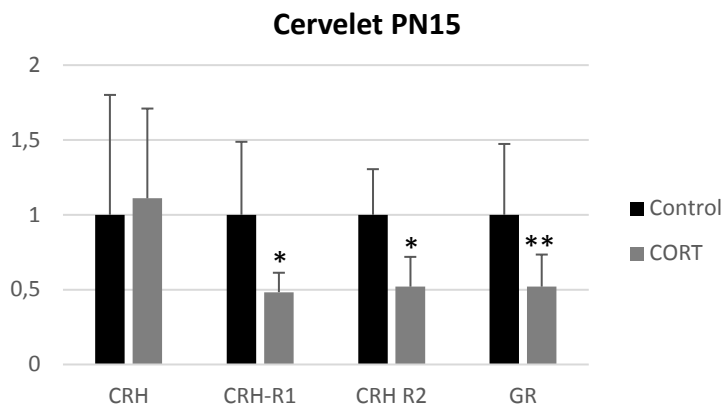


Figure 23 : Variations d'expression des gènes codant pour la CRH, ses récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 et le récepteur aux glucocorticoïdes observées dans le cervelet chez les souris J15, traitées par injections répétées de corticostérone de J8 à J15 PN. * $p<0,05$; ** $p=0,01$, (Test t de Student).

Protéines du cytosquelette à J15 PN

Dans l'hippocampe comme dans le cervelet, aucune modification d'expression des gènes codant pour MAP2 et NFL n'a été observée (Figure 24), suggérant que 8 jours de traitement à la corticostérone sont insuffisants pour moduler l'expression des gènes codant pour ces deux protéines du cytosquelette.

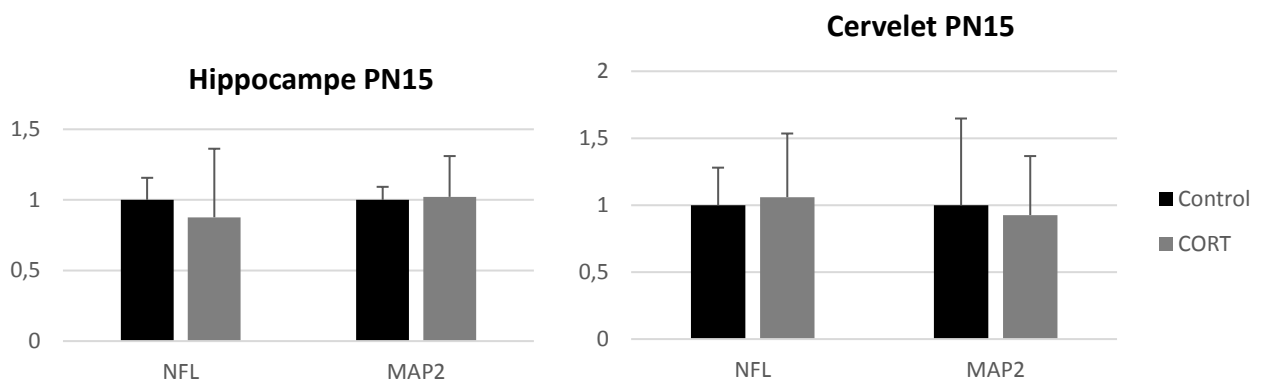


Figure 24 : Variations d'expression des gènes codant pour NFL et MAP2, deux protéines du cytosquelette, chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN et les souris du groupe contrôle, (Test t de Student).

Neurotrophines : BDNF et son récepteur TrkB à J15 PN

Dans l'hippocampe, les souris traitées à la corticostérone ont montré une diminution d'expression des gènes codant pour le BDNF (-38,7%, $p=0,0026$) et son récepteur TrkB (-50,1%, $p=0,0011$) (Figure 25).

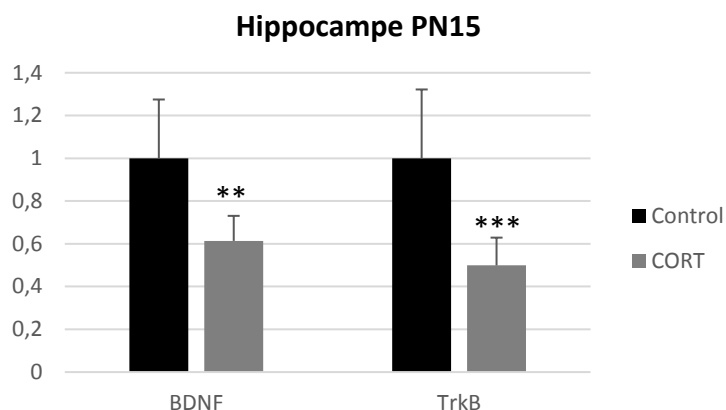


Figure 25 : Variations d'expression des gènes codant pour BDNF et son récepteur TrkB observées dans l'hippocampe chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN et les souris du groupe contrôle. ** $p=0,01$; *** $p=0,001$, (Test t de Student).

En revanche, l'expression de ces gènes n'était pas modifiée dans le cervelet (résultats non illustrés).

Récepteurs glutamatergiques à J15 PN

Dans notre étude, l'administration de corticostérone de J8 à J15 PN induit une diminution importante de l'expression du gène codant GluR δ 2 (-53,7%, $p=0,0153$) dans le cervelet.

Analyse en qPCR à J29 PN

Ces dernières n'ont malheureusement pas pu être réalisées.

5. Activité métabolique régionale à J15PN et à J29 PN

Un marquage de la cytochrome c oxydase a été réalisé sur une série de coupes de 20 μ m d'encéphale des souris appartenant aux deux groupes selon le protocole proposé par Wong-Riley (1979) modifié par Strazielle *et al.* (1998). Il a été démontré que l'activité de cette enzyme de la membrane interne mitochondriale, dernière enzyme de la phosphorylation oxydative, est corrélée à l'activité neuronale appréhendée par la densité du marquage histochimique (Wong-Riley, 1989).

Les mesures de densité optique pour les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN ont été effectuées pour 105 régions de l'encéphale. Des modifications d'activité métabolique, soit une hyperactivité soit une hypoactivité ont été observées dans plusieurs régions du SNC, notamment dans le cervelet (Figure 26). Les résultats significatifs sont résumés dans le tableau 13.

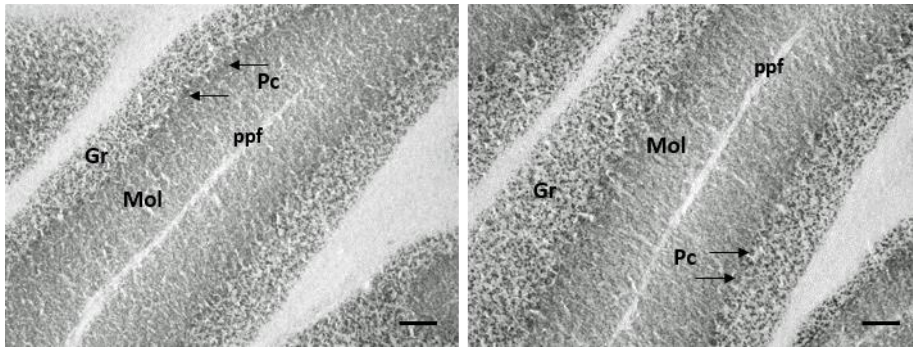


Figure 26 : Marquage de la COX à J29 PN, coupe du lobule paramédian mettant en évidence une augmentation de marquage donc une hyperactivité au sein des couches moléculaire (+21,6 %, $p < 0.0001$) et granulaire (+10,3 %, $p < 0.05$) chez les souris traitées à la corticostérone (figure de droite) par rapport aux souris du groupe contrôle (figure de gauche). On remarque également une augmentation d'épaisseur de la couche granulaire (+25,5 %, $p < 0.001$) chez les souris traitées à la corticostérone. Mol : couche moléculaire ; Pc : cellule de Purkinje ; Gr : couche granulaire ; ppf : fissure pré-pyramidale. Barre d'échelle = 300 μm .

A J15 PN, le traitement à la corticostérone a induit une modification de l'activité métabolique régionale de nombreuses structures du système nerveux central. Ces modifications se caractérisaient essentiellement par un hypermétabolisme sauf dans certaines régions du cervelet, dans le noyau dorsal du raphé et le noyau vestibulaire médiocaudal.

A J29 PN, les modifications sont plus variées. Les régions exprimant un hypométabolisme intéressaient la formation hippocampique, les noyaux hypothalamiques, le noyau fastigial du cervelet et une structure directement en lien avec ce dernier, le noyau vestibulaire latéral.

Tableau 15 : Résultats significatifs obtenus par mesure de densité optique du marquage de la COX chez les souris de 15J et 29J.

Structures	Souris	
	15J	29J
Cortex préfrontal	+8 %*	-
Cortex moteur primaire	-	+ 10,7%***
Cortex moteur secondaire antérieur	+11,6 %**	+ 17,8 %***
Cortex somato-sensitif primaire	-	+ 5,9 %*
Cortex piriforme	+10,8 %*	-
Cortex cingulaire	-	+ 17,2%***
CA1 postérieur de l'hippocampe	+6,8 %**	- 7,0 %**
CA2/3 postérieur de l'hippocampe	-	- 11,6 %**
Subiculum de l'hippocampe	+7,4%*	- 8,9 %*
DG postérieur de l'hippocampe	+6 %*	- 7,5 %*
Pallidum latéral	+15%**	-
Noyau thalamique antérieur	+15,7%*	-
Noyau thalamique ventro-latéral	+18,7 %**	-
Noyaux reuniens et rhomboïde	+17,8 %*	-
Habenula latérale	-	+ 18,2 %***
Habenula médiale	+12,3 %*	-
Noyau géniculé médial	+14%*	-
Noyau médial de l'hypothalamus	+19,5 %*	+ 6,5 %*
Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus	+15,5%*	- 11,9 %*
Noyau latéral de l'hypothalamus	-	- 14,9%**
Noyau arqué de l'hypothalamus	+8,1 %*	-
Noyau rouge parvocellulaire	+11,4 %*	+ 8,9 %*
Substance grise périaqueducale	-	- 6,9 %**
Noyau vestibulaire latéral	-	- 15,1%**
Noyau vestibulaire médiocaudal	-6,7 %*	-
Noyau prepositus	-	- 8,4 %*
Noyau dorsal du raphé	-16%*	-
Lobule paramédian Mol/P du cervelet	+11,8 %**	+ 21,6 %***
Lobule paramédian Gr du cervelet	+11,8 %*	+ 10,3 %*
Lobule vermien IV/V Mol du cervelet	- 11,4 %*	-
Lobule vermien IV/V Gr du cervelet	-10,8%***	-
Lobule Simplex Gr du cervelet	-7 %*	-
Lobule Crus I Gr du cervelet	-7,6%*	-
Lobule Crus II Gr du cervelet	-8,5 %*	-
Noyau fastigial du cervelet	-	- 8,1 %*
Olive bulbaire	+ 10 %*	-
Noyau réticulé latéral	+ 23,6 %***	-
Noyau moteur du nerf vague X	+ 12,8 %*	-
Noyau solitarius	+ 18,9 %*	-
Noyau réticulaire pontique	+ 18,6 %*	-
<i>Noyaux thalamiques CM/CL p=0.0535</i>	+9,5 %	-
<i>Noyaux thalamiques VPM/VPL p=0.0687</i>	+12,9 %	-
<i>Noyau réticulé du thalamus p=0.0591</i>	+11,2 %	-
<i>Noyau VDB p=0.054</i>	-15 %	-

*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; - non significatif, (Test t de Student). Les résultats en italique sont à la limite de la significativité.

P : cellule de Purkinje ; Gr : couche granulaire ; Mol : couche moléculaire ; CM/CL : Noyaux thalamiques centro-médiaux et centro-latéraux ; VPM/VPL : Noyaux thalamiques ventro-postéro-médians et ventro-postéro-latéraux ; VDB : Noyau du bras vertical de la bande diagonale de Broca.

➤ SECOND VOILET DE L'ETUDE

Dans ce second volet, l'objectif était de déterminer si l'injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN, période cruciale pour le développement du cervelet, pouvait avoir un impact à long terme sur l'architecture et donc sur la fonctionnalité de cette structure.

1. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur le poids de l'animal.

Les souris ont bien supporté le traitement administré. L'évaluation quotidienne du poids de l'animal durant la période d'injection n'a montré aucune différence intergroupe ($F(19,380) = 0,09$; $p > 0,05$) (Figure 27). Un effet jour évident a été constaté étant donnée la croissance de l'animal ($F(19,20) = 427,6$; $p < 0,0001$).

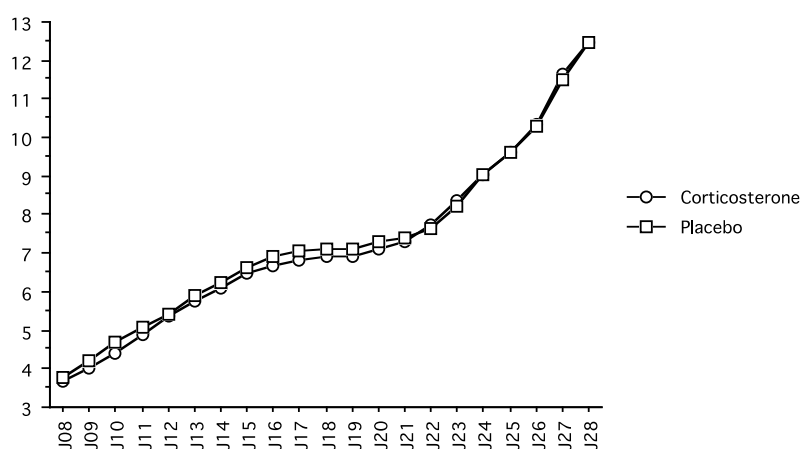


Figure 27 : Evaluation du poids de l'animal durant la période d'injection de corticostérone.

Les souris ont également été pesées avant et après la réalisation des tests comportementaux et aucune différence significative intergroupe n'a été observée. Au moment de la mise à mort, le poids moyen des souris des deux groupes était identique de $26,2 \text{ g} \pm 0,4$. Aucune différence de taille n'a été mise en évidence entre les souris des deux groupes ($p > 0,05$).

2. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur la fonctionnalité cérébelleuse.

Le cervelet étant une des principales structures impliquées dans le contrôle moteur (équilibre, posture, coordination motrice) mais aussi des fonctions cognitives (apprentissage visuo-spatial, mémorisation) et végétatives, nous avons dans un premier temps étudié les effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur les comportements moteurs de l'animal, son activité motrice, ses capacités d'exploration, ses fonctions vestibulaires et posturales, sa coordination motrice, ses facultés d'apprentissage et de mémorisation et son état d'anxiété

durant la période postnatale puis à l'âge adulte (3 mois) via une série de tests comportementaux adaptés aux âges respectifs.

2.1. Effets précoces

SHIRPA

A J15, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes de souris dans le SHIRPA qui regroupe une batterie de tests permettant d'expertiser globalement le phénotype moteur et l'apparition de différents réflexes qui signent le développement et la maturation du système nerveux central (SNC). En revanche à J22 PN, une nouvelle évaluation réalisée avec ce même test a permis de démontrer que les souris traitées à la corticostérone présentaient une activité motrice, correspondant à une activité d'exploration, majorée par rapport aux souris du groupe contrôle lorsque celles-ci étaient observées dans une enceinte close pendant 5 minutes (cylindre transparent de 15 cm de diamètre). Cette différence d'activité intergroupe n'était pas retrouvée lorsque la souris était évaluée dans un champ ouvert pendant une minute (nombres de cadrans parcourus à J15 PN : $2,9 \pm 0,6$ vs $3,5 \pm 0,7$; à J29 PN : $3,5 \pm 1,18$ vs $5,6 \pm 0,89$ pour respectivement les souris « contrôle » et les souris « corticostérone ») (*Tableau 16*). Le temps d'observation dans ce champ était peut-être trop court pour permettre d'observer une différence d'activité exploratrice entre les deux groupes de souris.

Tableau 16 : Résultats des paramètres du S.H.I.R.P.A. réalisé à J15 et J22 PN chez les souris « contrôle » et « corticostérone ». Lorsqu'elles sont observées dans un cylindre transparent pendant 5 minutes, les souris du groupe corticostérone exécutent des mouvements à vitesse modérée ou rapide ($\chi^2(2)=7,97$; $p=0,017$). Les autres paramètres ne sont pas modifiés de façon significative. Mvt : mouvements ; $p<0,05$.

Tests		J15				J22			
		Ctrl (n=10)	Cortico (n=11)	Ctrl %	Cortico %	Ctrl (n=10)	Cortico (n=11)	Ctrl %	Cortico %
Cylindre d'observation									
Position du corps	Assis et debout	6	5	60 %	45,5 %	9	9	90 %	82 %
	Redressement	4	6	40 %	54,5%	1	2	10 %	18 %
Activité motrice	Mvt lents	2	4	20 %	36,5 %	5	-	50 %	-
	Mvt de vitesse modérée	8	6	80 %	54,5 %	5	9	50 %	82 %*
	Mvt vigoureux	-	1	-	9 %	-	2	-	18 %*
Tremblement	Aucun	9	10	90 %	91 %	9	8	90 %	73 %
	Léger	1	1	10 %	9 %	1	3	10 %	27 %
Champ ouvert									
Réaction après un transfert	Nombre de cadrans	2,9	3,5	-	-	3,5	5,6	-	-
	Stupeur prolongée, mvt lents	2	-	20 %	-	1	1	10 %	9 %
	Stupeur prolongée, mvt modérés	-	-	-	-	2	-	20 %	- %
	Brève stupeur, mvt actifs	1	-	10 %	-	2	2	20 %	18,5 %
	Stupeur momentanée, mvt rapides	6	8	60 %	73 %	5	6	50 %	55 %
	Pas de stupeur, mvt immédiats	1	3	10 %	27 %	-	2	-	18,5 %
Réaction motrice après émission sonore	Aucun	3	3	30 %	27 %	3	-	30 %	-
	Réflexe de Preyer	7	8	70 %	73 %	4	6	40 %	55 %
	Saut < 1 cm	-	-	-	-	3	5	30 %	45 %
Réflexe d'évitement	Pas de réponse	10	10	100 %	91,7 %	5	4	50 %	36,4 %
	Léger	-	-	-	-	5	4	50 %	36,4 %
	Modéré	-	1	9 %	8,3 %	-	2	-	18,2 %
	Vigoureux	-	-	-	-	-	1	-	9 %
Suspension par la queue									
Lordose posturale	Absent	8	9	80 %	82 %	2	1	20 %	9 %
	Présent	2	2	20 %	18 %	8	10	80 %	91 %
Atterrissage sur la grille	Aucun	1	-	10 %	-	-	-	-	-
	Contact avec le nez	3	4	30 %	36,5 %	-	-	-	-
	Contact avec les vibrisses	6	6	60 %	54,5 %	1	3	10 %	27,3 %
	Avant le contact avec les vibrisses (18 mm)	-	1	-	9 %	9	7	90 %	63,7 %
	Extension rapide	-	-	-	-	-	1	1	9 %
Grille horizontale									
Force d'agrippement	Légère	8	10	80 %	91 %	7	6	70 %	54,5 %
	Modérée	2	1	20 %	9 %	3	4	30 %	36,5 %
	Active	-	-	-	-	-	1	-	9 %
Retrait lors d'un pincement de l'orteil	Aucun	-	-	-	-	1	-	10 %	-
	Léger	4	5	40 %	45,5 %	1	3	10 %	27 %
	Modéré	4	2	40 %	18 %	6	6	60 %	55 %
	Rapide	2	4	20 %	36,5 %	1	1	10 %	9 %
	Flexions et extensions répétées	-	-	-	-	1	1	10 %	9 %

Suspension sur la tige métallique	Tombe après x sec	7	9	70 %	82 %	9	9	90 %	82 %
	Tombe immédiatement	3	2	30 %	18 %	1	1	10 %	9 %
	Incapable avec les pattes post.	-	-	-	-	-	1	-	9 %
Tonus musculaire patte arrière	Aucun	-	1	-	9 %	-	-	-	-
	Léger	9	9	90 %	82 %	4	2	60 %	18 %
	Modéré	1	1	10 %	9 %	2	8	30 %	73 %
	Marqué	-	-	-	-	1	1	10 %	9 %
Negative geotaxis	Se retourne et grimpe	5	2	50 %	18 %	9	8	80 %	82 %
	Se retourne et s'immobilise	-	2	-	18 %	1	2	10 %	18 %
	Mvt sans se retourner	-	2	-	18 %	-	-	-	-
	Chute	5	5	50 %	46 %	-	-	-	-

Actimètre

Cette augmentation d'activité a également été observée à J29 PN dans le test de l'actimètre évaluant l'activité motrice spontanée durant 5 minutes. En effet, dans trois des six paramètres mesurés, les souris du groupe corticostérone exerçaient plus de déplacements horizontaux (+24 %, $t(19)=2,4$; $p<0,05$), de mouvements stéréotypés lents correspondant par exemple à des activités de toilettage (+17 %, $t(19)=2,13$; $p<0,05$) et de mouvements de redressement rapides participant à l'exploration (+55 %, $t(19)=2,34$; $p<0,05$). Aucune différence significative entre les deux groupes n'a été observée concernant les mouvements horizontaux rapides, les mouvements stéréotypés rapides et les redressements lents (*Figure 28*).

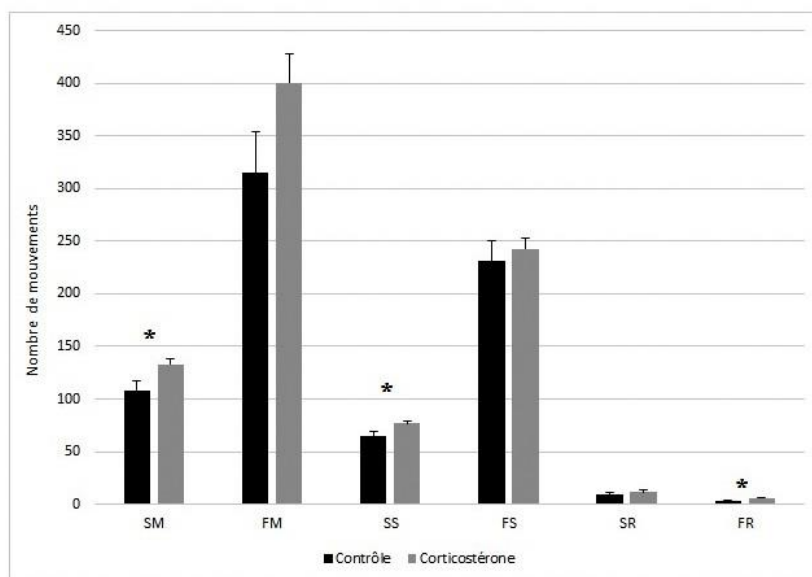


Figure 28 : Activité motrice (moyennes \pm écarts-types) mesurée dans l'actimètre pour 6 paramètres (mouvements horizontaux lents = Slow Movement (SM), mouvements horizontaux rapides = Fast Movement (FM), mouvements stéréotypés lents = Slow Stereotypy (SS), mouvements stéréotypés rapides = Fast Stereotypy (FS), redressements lents = Slow Rearing (SR) et redressements rapides = Fast Rearing (FR)) dans les deux groupes de souris « contrôle » et « corticostérone » à J 29. * $p < 0,05$, (Test t de Student).

2.2. Effets tardifs à l'âge adulte

Tests évaluant l'activité motrice et les capacités d'exploration

A 3 mois, à l'exception des mouvements stéréotypés lents pour lesquels la différence entre les deux groupes est à la limite de la significativité (SS : $F(1,19) = 4,34$; $p = 0,05$), les cinq autres paramètres enregistrés dans l'actimètre évaluant l'activité motrice spontanée sont significativement différents entre les deux groupes de souris (*Figure 29*). Les souris traitées à la corticostérone durant la période juvénile se caractérisent par une hyperactivité dans les mouvements horizontaux lents ($F(1,19) = 6,37$; $p = 0,02$) et rapides ($F(1,19) = 6,13$; $p = 0,02$), les mouvements verticaux de redressements lents ($F(1,19) = 6,03$; $p = 0,02$) et rapides ($F(1,19) = 6,61$; $p = 0,019$) et les mouvements stéréotypés rapides ($F(1,19) = 5,03$; $p < 0,04$). Pour les deux groupes testés, un effet jour est observé pour chacun des mouvements ($0.0001 < p < 0.0063$) témoignant d'un effet d'habituation au test.

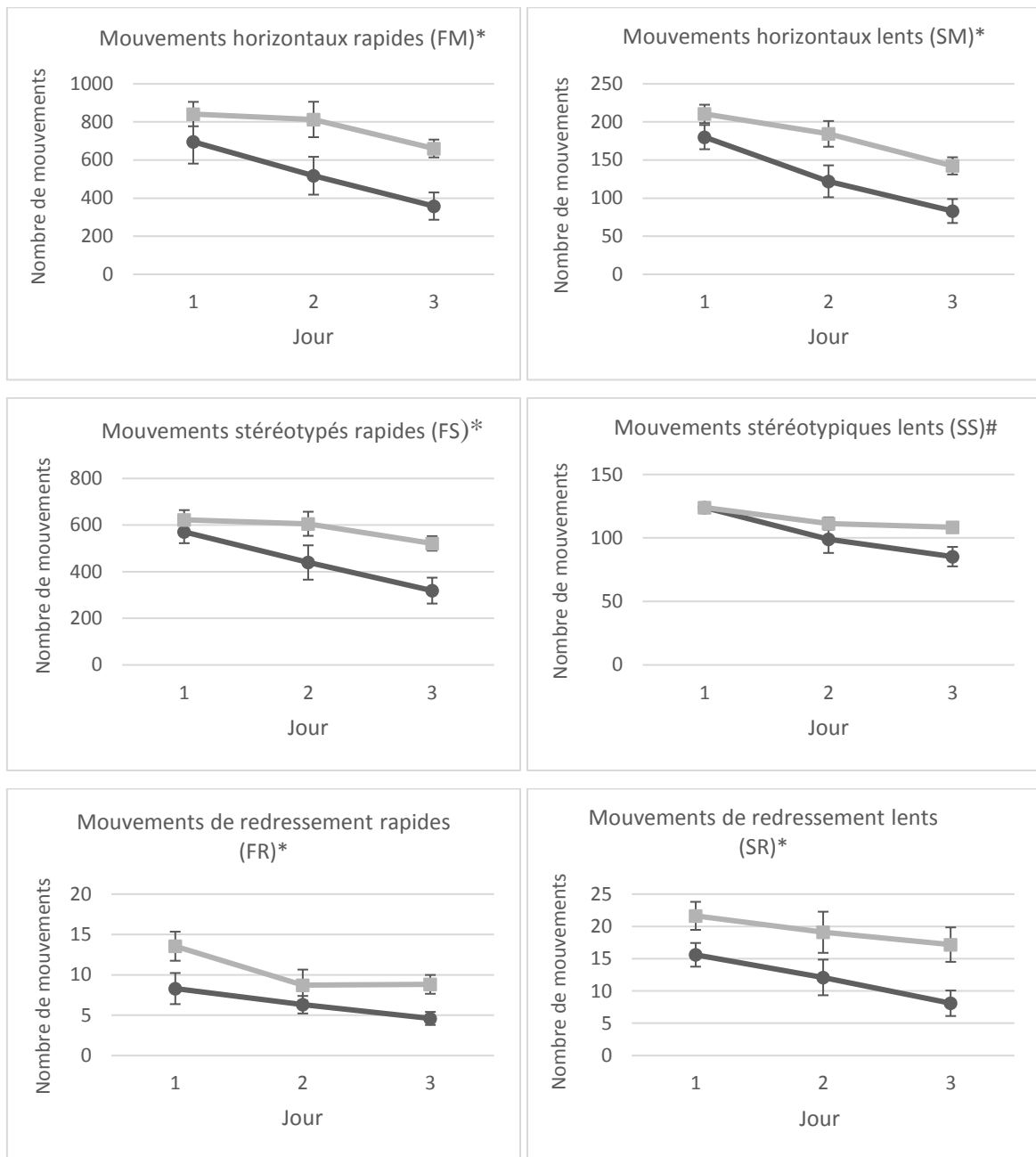


Figure 29 : Activité motrice (moyennes \pm écarts-types) mesurée dans l'actimètre par 6 paramètres (FM, SM, FS, SS, FR et SR) durant 3 jours consécutifs chez les souris âgées de 3 mois. * $p < 0,05$, (ANOVA à mesures répétées) et # $p = 0,05$.

Dans le labyrinthe en T, durant la totalité de la période de test (10 jours), la comparaison des résultats obtenus pour les deux groupes de souris à une valeur théorique de 50 % correspondant à un choix aléatoire montre que les souris du groupe corticostérone et du groupe contrôle alternaient bien c'est-à-dire qu'elles exploraient le bras du T qu'elles n'avaient pas exploré lors du choix forcé, (60 % \pm 5, $p < 0,05$ vs 74 % \pm 4, $p < 0,0001$, Mann-Whitney pour respectivement le groupe corticostérone et le groupe contrôle). Lorsque les résultats du test sont appréhendés sur deux périodes, de J1 à J5 et de J6 à J10, les souris du groupe contrôle alternaient, durant la totalité de la période d'évaluation (de J1 à J5 : 74% \pm 6 et de J6 à J10 74% \pm 4, $p < 0.001$). En revanche, les souris

traitées à la corticostérone n'alternaient que lors des cinq derniers jours du test (de J6 à J10) (de J1 à J5 : $52\% \pm 4\%$, $p > 0.05$ et de J6 à J10 : $68\% \pm 8\%$, $p = 0.053$). La latence avant le choix du bras à explorer a également été chronométrée à chacun des essais. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 17. Bien que les souris du groupe « corticostérone » aient une latence équivalente à la moitié de celle des souris du groupe « contrôle », la différence n'atteignait pas la significativité et ceci quelle que soit la période considérée.

Tableau 17 : Latences exprimées en secondes mesurées dans le labyrinthe en T lors du choix du bras à explorer par l'animal. (Test t de Student).

Latence (en sec)	J1 à J10	J1 à J5	J6 à J10
Contrôle (n=10)	214 ± 52	71 ± 24	143 ± 32
Corticostérone (n=11)	112 ± 19	37 ± 7	74,9 ± 16
p	0,0689	0,1636	0,0676

Tests d'anxiété

Dans le labyrinthe en croix surélevé, les souris effectuaient un nombre moyen d'exploration totale des bras de $6,8 \pm 1,3$ pour les souris du groupe contrôle et de $9,9 \pm 1,4$ pour les souris injectées à la corticostérone ($p=0,1207$).

Si on différencie le type de bras exploré, les souris du groupe corticostérone avaient tendance à explorer davantage les bras ouverts par rapport aux souris du groupe contrôle ($4,09 \pm 0,712$ versus $2,2 \pm 0,55$ respectivement) sans pourtant atteindre le seuil de significativité ($p = 0,0542$; $t(19) = 2,05$) (Tableau 18) mais cette différence était due au fait que les souris avaient augmenté leur activité motrice d'exploration et non au fait qu'elles pourraient montrer une certaine désinhibition ou un comportement de moindre anxiété.

Dans les deux essais du test de l'émergence (Tableau 18), une grande variabilité individuelle des résultats au sein de chaque groupe de souris a été constatée, tant pour le critère de sortie deux pattes que pour le critère de sortie quatre pattes ($p>0,05$). Toutefois, les souris des deux groupes augmentaient considérablement la latence de sortie lors du second essai en comparaison au premier essai ($F(1,19)= 15,9$; $p<0,001$).

Tableau 18 : Résultats obtenus chez les souris âgées de 3 mois dans le test du labyrinthe en croix surélevé (moyennes ± écarts types) et dans le test d'émergence (moyennes des latences ± écarts types mesurées avant la sortie de la petite enceinte lors des 2 essais) (Test t de Student).

	Contrôle (n=10)	Corticostérone (n=11)
Labyrinthe en croix surélevé		
Visites bras ouverts	2,2 ± 0,55	4,09 ± 0,72
Visites bras fermés	4,6 ± 0,83	5,82 ± 0,81
Temps passé dans les bras ouverts	69 ± 28	98 ± 24
Temps passé dans les bras fermés	221 ± 28	202 ± 24
Visites bras ouverts/visites totales	0,36 ± 0,08	0,45 ± 0,06
Temps passé dans bras ouverts/temps total	0,23 ± 0,09	0,33 ± 0,08
Nombre de chutes	1	0
Emergence (sec)		
Essai 1, sortie 2 pattes	93 ± 32	62 ± 19
Essai 1, sortie 4 pattes	138 ± 42	75 ± 20
Essai 2, sortie 2 pattes	173 ± 41	137 ± 30
Essai 2, sortie 4 pattes	174 ± 40	159 ± 34

Tests de coordination motrice

Dans le test du rotarod, les scores des 24 essais réalisés au cours des 3 jours de test ont été réunis deux par deux en douze mesures. Un test ANOVA avec mesures répétées, appliqué pour évaluer les effets d'apprentissage, a montré une interaction groupe/essai proche de la significativité ($F(1,209) = 1,69$; $p = 0,078$). Étant donnée, la faible sensibilité d'interaction, les données ont été analysées pour chacun des trois jours du test (*Figure 30*). Les résultats ne montrent un apprentissage effectif pour les deux groupes que lors du premier jour de test ($F(3,57) = 7,65$; $p < 0,001$). Concernant l'effet drogue, les souris injectées à la corticostérone démontraient une performance supérieure à celle des souris du groupe contrôle ($F(1,19) = 4,83$; $p = 0,041$), cette différence s'exprimant plus spécifiquement dans les essais du second jour de test ($F(1,19) = 5,55$; $p = 0,029$).

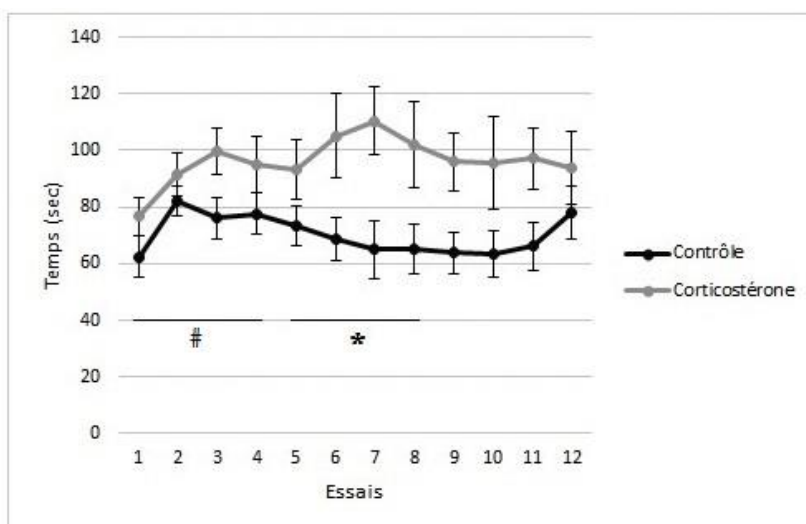


Figure 30 : Résultats obtenus pour les 12 mesures (24 essais) du test du rotarod (4 x2 essais par jour) chez les souris âgées de 3 mois. # Effet essai, $p < 0,05$ le premier jour du test ; *effet drogue, $p < 0,05$ le second jour du test (ANOVA à mesures répétées).

Dans le test de la poutre, aucune significativité n'est observée. Le nombre moyen de segments parcourus pour les 4 essais était de $84,9 \pm 6,7$ pour le groupe contrôle et de $75,8 \pm 8,9$ pour le groupe corticostérone ($p > 0,05$). Aucune chute n'a été enregistrée.

Des résultats similaires sont observés pour le cintre (Tableau 19) tant au niveau des temps obtenus pour les différents segments du cintre que pour le nombre de chutes et les latences avant la chute ($p > 0,05$).

Tableau 19 : Résultats obtenus dans le test du cintre chez les souris âgées de 3 mois (Test t de Student). Le score est établi sur un score maximal de 240 secondes (4 essais de 60 secondes).

Cintre (Latence en sec)	Contrôle (n=10)	Corticostérone (n=11)
MT-1	56 ± 9	44 ± 11
MT-2	94 ± 12	82 ± 13
MT-3 (2 pattes)	159 ± 13	125 ± 12
MT-4 (3 pattes)	205 ± 9	191 ± 13
MT-5 (4 pattes)	220 ± 5	207 ± 9
MT-6 (mi-parcours)	235 ± 3	228 ± 6
MT-7 (sommet)	236 ± 4	235 ± 3
Latence avant la chute	212 ± 14	210 ± 11
Nombre de chutes	$0,7 \pm 0,3$	$0,91 \pm 0,21$

Test d'apprentissage visuo-spatial et de mémorisation

Dans le test visuo-spatial de la piscine de Morris, un effet jour a été observé pour les deux groupes de souris tant dans la latence avant l'embarquement sur la plateforme invisible ($F(4,76)= 10,18$; $p<0,0001$) que dans le nombre de cadrans parcourus ($F(4,76)= 2,79$; $p=0,0024$). Ces résultats montrent que l'administration de corticostérone durant la période postnatale n'affecte pas les capacités d'apprentissage de l'animal (Figure 31).

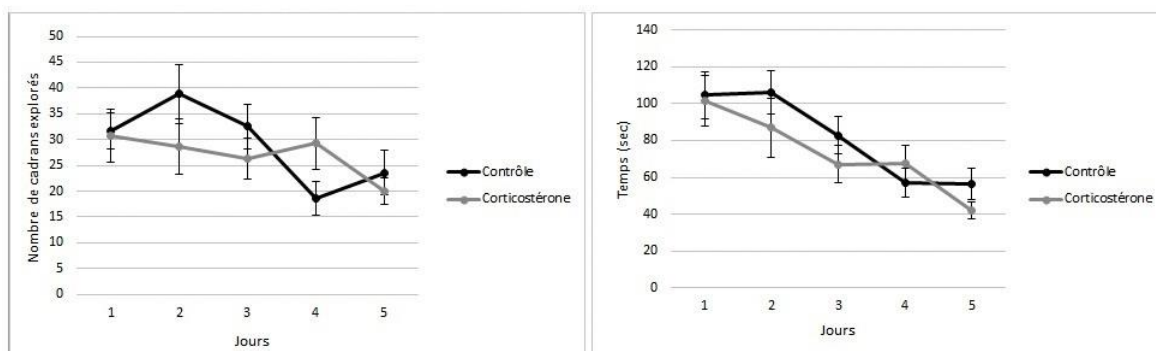


Figure 31 : Latences et nombres de cadrans parcourus (moyennes et écarts-types) pour les 5 jours d'apprentissage chez les souris âgées de 3 mois (ANOVA à mesures répétées).

Dans le test de rétention de 60 secondes qui évalue la mémorisation à long terme de la tâche, aucune différence intergroupe n'a été observée (Temps passé dans le bon cadran : $19,73 \pm 2,46$ secondes pour les souris du groupe corticostérone et $23,7 \pm 2,9$ secondes pour le groupe contrôle, $t(19)=1,05$; $p>0,05$).

Cependant les souris du groupe contrôle ont passé plus de temps dans le bon cadran en comparaison à un temps théorique de 15 secondes correspondant au temps passé dans le bon cadran de façon aléatoire ($p<0,05$). Ce n'était pas le cas pour les souris du groupe corticostérone ($p>0,05$).

Le test de la plateforme visible, a révélé que les souris des deux groupes n'avaient pas de déficit visuel puisque le nombre de cadrans parcourus et les latences étaient très bas. Toutefois, il est intéressant de noter que les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale étaient plus rapides à embarquer sur la plateforme visible que les souris du groupe « contrôle ». Cette rapidité ($\times 1,7$) s'observait dans la latence avant l'embarquement ($17,5 \pm 1,8$ sec pour les souris du groupe corticostérone versus $29,9 \pm 5$ sec pour les souris du groupe « contrôle » ; $t(19) = 2,38$; $p = 0,0276$). Les souris traitées à la corticostérone adoptaient également un trajet plus direct pour embarquer sur la plateforme visible ($8,18 \pm 0,44$ cadrans parcourus pour les souris du groupe corticostérone versus $11 \pm 1,14$; $t = 2,39$; $p = 0,028$ pour les souris du groupe contrôle) (Figure 32).

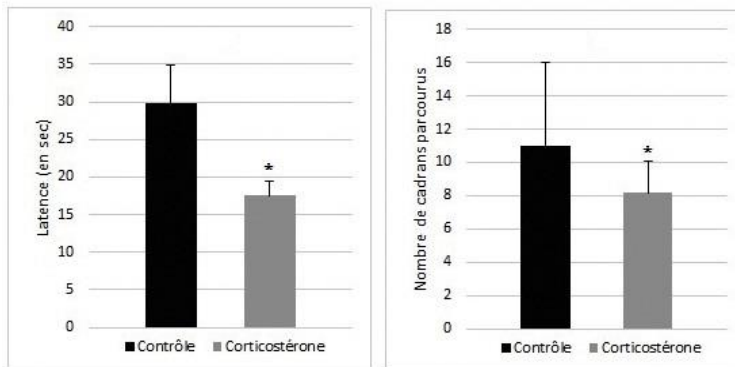


Figure 32 : Latences et nombre de cadrans (moyennes \pm écarts-types) obtenus chez les souris âgées de 3 mois lors de la tâche de la plateforme visible. * $p < 0,05$ (Test t de Student).

3. Évaluation du taux de corticostérone sérique à 3 mois.

Le sang prélevé a été centrifugé lors de la mise à mort de l'animal afin de récupérer le sérum qui fut congelé à -80°C . Le taux de corticostérone sérique a été déterminé par test ELISA selon les instructions du kit « DetectX corticosterone Enzyme Immunoassay » (Arbon assays, Euromedex, France). Les souris des deux groupes présentaient un taux similaire de corticostérone sérique ($42,8 \pm 15,2$ et $40,7 \pm 9,5$ respectivement pour les souris du groupe corticostérone et les souris du groupe contrôle).

4. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur la morphométrie du cervelet et de l'hippocampe.

4.1. Morphométrie cérébelleuse et hippocampique de la souris adulte (3 mois)

Pour chaque héli-encéphale, des coupes sériées ($20\mu\text{m}$) dans le plan frontal ont été réalisées au cryostat à -20°C puis une coloration au crésyl violet a été réalisée sur une série de coupes. Pour chaque souris, ont été mesurées 1) l'épaisseur des couches granulaire et moléculaire de plusieurs lobules du cervelet (simplex, crus I, crus II, paramédian, vermis IV/V), et 2) l'épaisseur des différentes couches des régions laminées hippocampiques (gyrus denté et la zone 1 de la corne d'Ammon), 3) l'épaisseur du cortex préfrontal et 4) la surface du néostriatum (noyau caudé-putamen).

Dans le cervelet, les différentes mesures ont permis de montrer chez les souris traitées à la corticostérone : 1) une diminution de volume du lobule paravermien simplex impliqué dans la régulation de la fonction motrice (Figure 33) et 2) une augmentation de volume du lobule hémisphérique crus II déterminant dans les fonctions motrices et non-motrices (résultats précis dans le tableau 20).

Tableau 20: Morphométrie de différents lobules cérébelleux chez la souris adulte (3 mois) traitées par injection chronique de corticostérone de PN8 à PN29.

Lobules	CERVELET				
	Simplex	Crus I	Crus II	Paramédian	Vermien IV/V
Moléculaire	- 8 %	- 10 %	+ 13,2 % *	- 6 %	- 12 %
Granulaire	- 21 % *	- 10 %	+ 12 % **	- 4 %	- 7,6 %

* p< 0,05 ; **p<0,01, (Test t de Student).

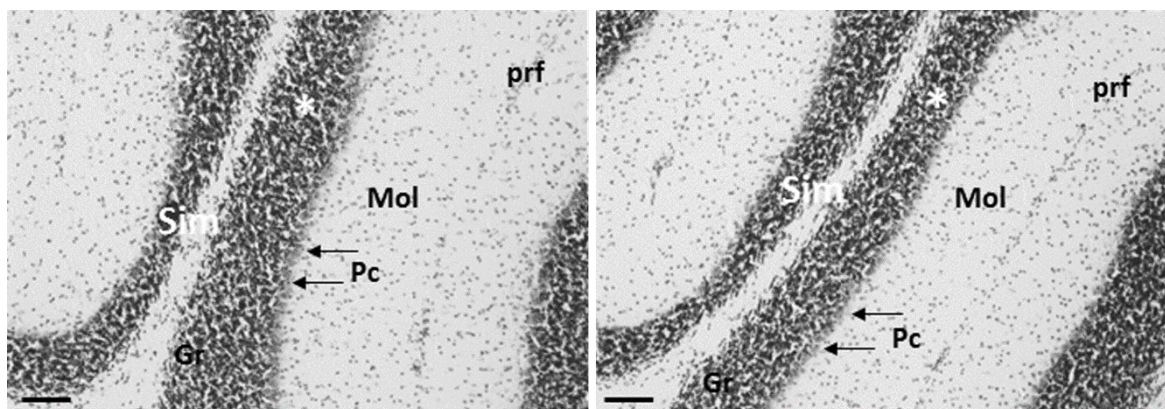


Figure 33 : Morphométrie du cervelet, coupe du lobule simplex mettant en évidence la diminution d'épaisseur de la couche granulaire chez les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale (figure de droite) par rapport aux souris du groupe « contrôle » (figure de gauche). Mol : couche moléculaire ; Pc : cellule de Purkinje ; Gr : couche granulaire ; prf : fissure primaire. Barre d'échelle = 300 μ m.

Dans l'hippocampe, une augmentation d'épaisseur a été observée pour toutes les couches de la zone 1 de la corne d'Ammon (CA1) et la couche granulaire du gyrus denté (DG – Tableau 21).

Tableau 21 : Morphométrie hippocampique chez la souris adulte (3 mois) traitée par injection chronique de corticostérone de PN8 à PN29.

HIPPOCAMPE		%
CA1	Oriens	+8,2 %**
	Pyramidale	+7,9 %*
	Moléculaire	+5,2 %*
DG	Moléculaire	- 0.3 %
	Granulaire	+5,9 %*

* p< 0,05 ; **p<0,01, (Test t de Student).

Pour le striatum aucune différence de surface n'a été relevée entre les 2 groupes de souris ($8,83 \text{ mm}^2 \pm 0,107$ vs $8,70 \text{ mm}^2 \pm 0,086$ pour respectivement le groupe « corticostérone » et le groupe « contrôle » ; $p= 0,3455$).

4.2. Corrélations entre la morphométrie du cervelet et les résultats comportementaux

Les différences d'épaisseur de la couche granulaire de simplex et des couches granulaire et moléculaire de crus II observées entre les souris des 2 groupes ont été corrélées aux résultats comportementaux qui étaient significativement différents pour les 2 groupes. Lorsque les 2

groupes de souris ont été considérés, une corrélation a été observée entre l'épaisseur de la couche granulaire du lobule simplex et les 5 paramètres modifiés dans l'actimètre (r compris entre -0,74 et -0,83 ; $p < 0,001$). Dans le groupe des souris traitées à la corticostérone, la diminution d'épaisseur de la couche granulaire du lobule simplex était corrélée négativement avec les mouvements horizontaux rapides ($r = -0,77$; $p < 0,05$), lents ($r = -0,74$; $p = 0,052$), les mouvements de redressements rapides ($r = -0,74$; $p = 0,052$) et lents ($r = -0,73$; $p = 0,06$) sans atteindre le seuil de significativité du fait de faible nombre d'animaux ($n=7$) indiquant ainsi que plus la souris était active, plus la couche granulaire du lobule simplex était fine.

L'augmentation de volume de la couche moléculaire de crus II était positivement corrélée aux mouvements de redressements rapides ($r = 0,86$; $p < 0,01$) et aux performances motrices dans le rotarod pour les deux groupes de souris ($r = 0,59$; $p < 0,05$) et pour le groupe corticostérone ($r = 0,82$; $p < 0,05$). Ces deux résultats indiquent que plus le volume du lobule crus II était augmenté plus la souris était active. En revanche, elle était négativement corrélée aux performances visuomotrices dans le test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris (test de la plateforme visible, $r = -0,586$; $p < 0,05$ pour le nombre de cadrans parcourus et $r = -0,776$; $p < 0,01$ pour la latence) montrant ainsi que plus l'épaisseur de la couche moléculaire du lobule crus II augmentait, plus les performances de l'animal étaient majorées.

5. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur l'activité métabolique régionale de l'encéphale à l'âge adulte.

Afin de compléter l'étude morphométrique, un marquage de la cytochrome c oxydase (COX) a été réalisé sur une autre série de coupes de 20 μm d'hémi-encéphale des souris appartenant aux deux groupes selon le protocole proposé par Wong-Riley (1979) modifié par Strazielle *et al.* (1998). L'objectif était d'évaluer l'activité métabolique régionale de certaines structures de l'encéphale dont le cervelet afin de déterminer si un changement d'activité métabolique d'une ou plusieurs régions pouvait expliquer le changement de phénotype moteur observé chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J29 PN.

5.1. Modifications de l'activité métabolique régionale de certaines régions du SNC

Parmi les 105 régions de l'encéphale évaluées, des modifications de l'activité métabolique ont été observées chez les souris traitées à la corticostérone dans des structures bien précises (*Tableau 22* pour l'ensemble des résultats significatifs). Toutes les régions modifiées présentaient un hypermétabolisme à l'exception de la couche granulaire du lobule simplex qui montrait une diminution de son activité métabolique neuronale.

Tableau 22: Résultats significatifs obtenus par mesure de densité optique du marquage de la COX chez la souris adulte.

Structures	%
Cortex	
Cortex visuel 1	+ 7,5 %*
Cortex visuel 2	+ 8,5 %**
Formation hippocampique	
Hippocampe CA1 ant	+ 7 %*
Hippocampe CA2/3 ant	+7,1 %*
Hippocampe DG ant	+ 10,6 %**
Hippocampe CA2/3 post	+ 11,5 %**
Hippocampe DG post	+ 8,2 %**
Subiculum	+ 10,5 %**
Amygdales	
Amygdale basale	+ 13,3 %**
Amygdale latérale	+ 15,3 %**
Amygdale centrale	+ 9,3 %*
Amygdale corticale	+ 12,1 %*
Cervelet	
N. dentelé	+ 9,2 %*
Vermis IV/V moléculaire	+ 15,7 %**
Simplex granulaire	- 8,9 %*
Tronc cérébral	
N. vestibulaire latéral	+ 19 %**
N. parabrachial latéral	+ 11,2 %*
N. parabrachial médial	+ 13,1 %*

		%	
Hippocampe	ANT	CA1 Oriens	+ 16 %***
		CA1 Radiatum	+ 11,3 %**
		CA2/3 Oriens	+ 7,7 %**
		CA2/3 Radiatum	+ 8,2 %**
		CA2/3 Lat Mol	+ 7 %***
		DG Polymorphe	+ 9,8 %***
	POST	CA1 Oriens	+ 15,8 %***
		CA2/3 Pyramidale	+ 8,9 %*
		DG Polymorphe	+ 10,6 %*
		DG Granulaire	+ 13,9 %**

* p< 0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001, (Test t de Student). N : noyau.

5.2. Corrélations entre l'activité métabolique régionale et les résultats comportementaux

Dans le groupe « corticostérone », plusieurs corrélations ont été observées entre les résultats comportementaux significatifs de la souris adulte et les modifications d'activité métabolique régionale. Le nombre de redressements lents comptabilisé dans l'actimètre étaient corrélé à une augmentation de l'activité métabolique de la couche granulaire du lobule simplex ($r= 0,732$; $p=0,039$). L'hypermétabolisme observé dans le gyrus denté de l'hippocampe postérieure et dans l'amygdale latérale était associé à l'augmentation des mouvements rapides sans atteindre le seuil de significativité (respectivement : $r= 0,627$; $p=0,0526$ et $r= 0,654$; $p=0,0562$).

L'amélioration des performances motrices dans le test du rotarod est associée à l'hypométabolisme de la couche granulaire du lobule simplex ($r= 0,758$; $p= 0,0294$), et à l'hypermétabolisme du gyrus denté de l'hippocampe postérieur ($r= 0,707$; $p=0,0223$) et de l'amygdale corticale ($r= 0,721$; $p= 0,0283$).

Dans le test visuo-spatial de la piscine de Morris, une corrélation négative entre les résultats obtenus dans le test de rétention et l'hypermétabolisme des amygdales basale ($r= -0,690$; $p= 0,0396$), latérale ($r= -0,665$; $p= 0,0306$) et corticale ($r= -0,680$; $p= 0,0439$) a été mise en évidence.

Enfin dans le test de la plateforme visible, le nombre de cadrans parcourus était corrélé avec l'augmentation d'activité métabolique observée dans la couche moléculaire du vermis IV/V ($r=0,891$; $p=0,0029$).

6. Evaluation de l'impact d'une administration chronique de corticostérone durant la période postnatale sur l'expression à long terme des transcrits d'hormones du stress, de protéines du cytosquelette, de neurotrophines et du récepteur GluR δ 2.

L'expression relative de gènes codant pour : 1) la CRH, son récepteur CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes NR3C1, 2) les protéines du cytosquelette MAP2 et NFL et le facteur neurotrophique BDNF et son récepteur TrkB, et 3) un récepteur du glutamate GluR δ 2 a été évaluée chez les souris appartenant aux deux groupes étudiés dans trois structures : le cervelet, l'hippocampe et l'hypothalamus.

6.1. Hormones du stress

Dans l'hypothalamus (*Figure 34*), les gènes codant pour la CRH, le CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes sont surexprimés respectivement de 93 % ($p=0,033$) ; 47 % ($p=0,01$) et 29 % ($p=0,026$) chez les souris ayant été traitées à la corticostérone pendant leur enfance.

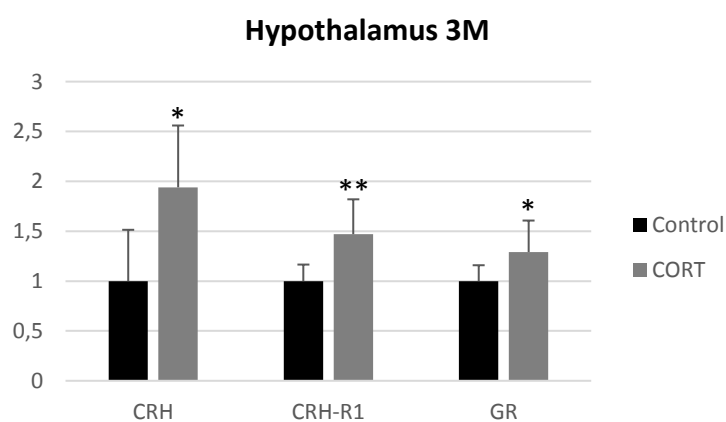


Figure 34 : Variations d'expression des gènes codant pour la CRH, son récepteur CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus chez les souris âgées de 3 mois, traitées par injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN. * $p<0,05$; ** $p=0,01$, (Test t de Student).

Parallèlement, dans l'hippocampe (*Figure 35*), chez les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale, l'expression des gènes codant pour la CRH, le CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) était diminuée respectivement de 30 % ($p=0,03$) ; 20 % ($p=0,04$) et 21 % ($p=0,012$).

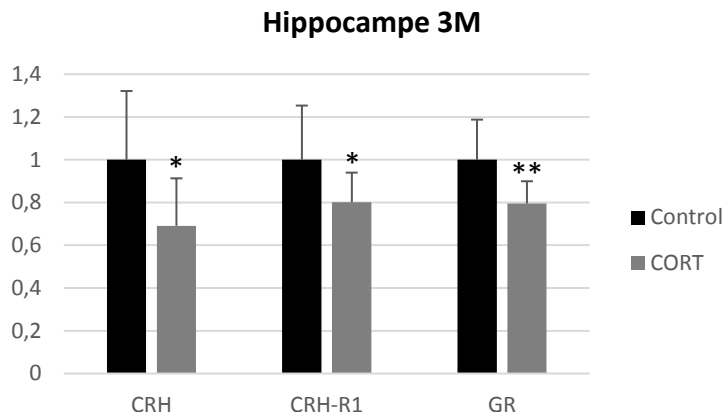


Figure 35 : Variations d'expression des gènes codant pour la CRH, son récepteur CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans l'hippocampe chez les souris âgées de 3 mois, traitées par injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN. * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$, (Test t de Student).

Dans le cervelet des souris traitées à la corticostérone (Figure 36), le gène codant pour la CRH était deux fois plus exprimé que chez les souris du groupe contrôle ($p = 0,04$). L'expression du gène codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes était quant à elle augmentée de 33 % ($p = 0,01$).

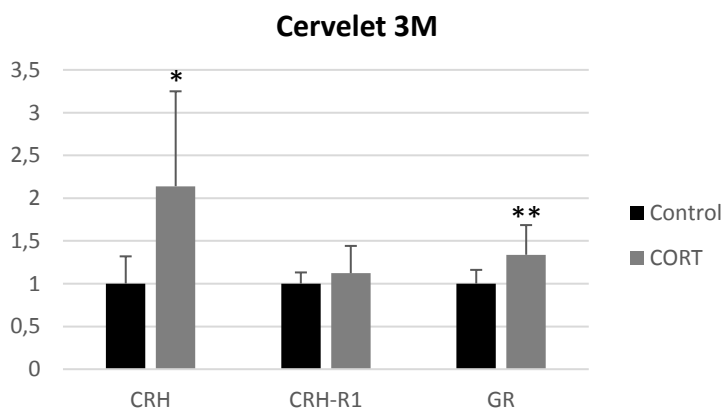


Figure 36 : Variations d'expression des gènes codant pour la CRH, son récepteur CRH-R1 et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans le cervelet chez les souris âgées de 3 mois, traitées par injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN. * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$, (Test t de Student).

6.2. Protéines du cytosquelette

L'évaluation du niveau d'expression des gènes codant pour MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*) et NFL (*NeuroFilament Light chain*) avait pour objectif de déterminer si les altérations observées dans la morphométrie du cervelet à l'âge adulte pouvaient être associées à des modifications des protéines du cytosquelette impliquées dans la croissance dendritique et axonale.

Dans notre étude, chez les souris traitées à la corticostérone, l'expression du gène codant pour NFL était significativement diminuée de 15 % ($p=0,044$) dans l'hippocampe (*Figure 37*). *A contrario*, l'expression du gène codant pour MPA2 restait inchangée.

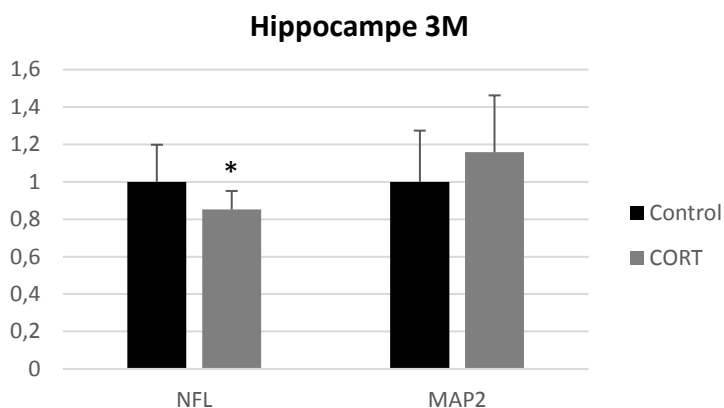


Figure 37 : Variations d'expression des gènes codant pour le NFL et MAP2, deux protéines constitutives du cytosquelette, observées dans l'hippocampe chez les souris âgées de 3 mois, traitées par injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN. * $p<0,05$, (Test t de Student).

Dans ce même de groupe de souris, une augmentation de 22 % du taux de transcrits de NFL ($p=0,039$) et une diminution de 15 % du taux de transcrits de MAP2 ($p=0,048$) a été mis en évidence dans le cervelet (*Figure 38*).

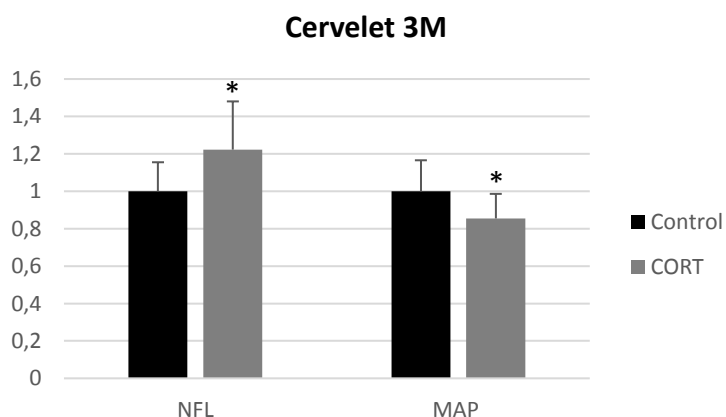


Figure 38 : Variations d'expression des gènes codant pour le NFL et MAP2, deux protéines constitutives du cytosquelette, observées dans le cervelet chez les souris âgées de 3 mois, traitées par injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN. * $p<0,05$, (Test t de Student).

6.3. Neurotrophines : BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)

Dans le cervelet et l'hippocampe, l'expression du gène codant pour le BDNF était inchangée alors que l'expression du gène codant pour son récepteur, TrkB était diminuée chez les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale (Figure 39).

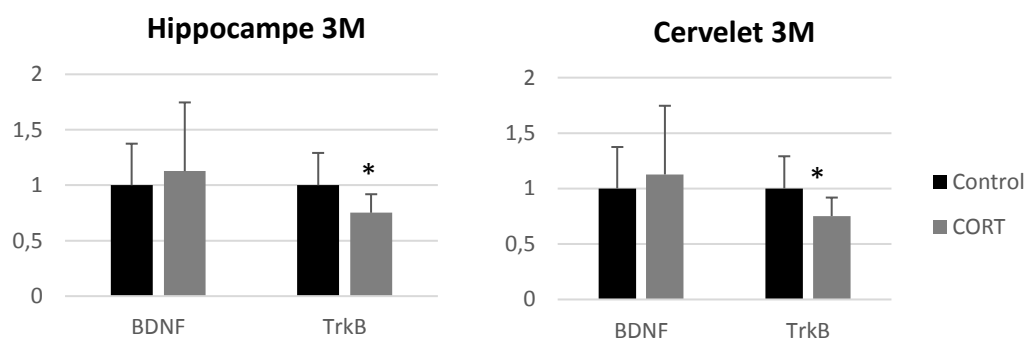


Figure 39 : Variations d'expression des gènes codant pour le BDNF et son récepteur TrkB observées dans l'hippocampe et le cervelet chez les souris âgées de 3 mois, traitées par injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN. * $p < 0,05$, (Test t de Student).

6.4. Récepteurs glutamatergiques

Certains récepteurs glutamatergiques comme les récepteurs NMDA ou GluR δ 2 sont sensibles aux glucocorticoïdes (Popoli *et al.*, 2012). Le dosage des transcrits du gène codant pour le récepteur GluR δ 2 a été réalisé afin de déterminer si l'administration chronique de corticostérone durant la période postnatale pourrait induire des altérations dans la biochimie du cervelet et plus particulièrement dans la neurotransmission entre la cellule de Purkinje et ses afférences excitatrices : les fibres grimpantes et les fibres parallèles.

Chez la souris devenue adulte, aucune modification d'expression du gène codant pour le GluR δ 2 n'a été observée dans le cervelet chez les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale.

IV. DISCUSSION

➤ PREMIER VOLET DE L'ETUDE

1. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur l'axe HPA

Chez les souris 15 jours

A cet âge, les analyses d'expression des gènes ont montré chez les souris traitées à la corticostérone que les gènes codant pour la CRH et le récepteur aux glucocorticoïdes étaient surexprimés dans l'hypothalamus. Cette augmentation des récepteurs aux glucocorticoïdes est à mettre en parallèle avec l'élévation du taux sérique de corticostérone endogène qui est le reflet direct des injections répétées de corticostérone. Il est important de noter que les injections et la mise à mort de l'animal ont été respectivement effectuées le matin entre 8 et 10 heures et dans l'après-midi (au moins 4 heures après l'injection). Ce laps de temps est décrit comme suffisant pour éliminer la corticostérone injectée au sein du compartiment sanguin. Le taux sérique obtenu ne peut donc correspondre à l'apport exogène du stéroïde mais plutôt au taux endogène sécrété par la glande surrénale.

A l'âge adulte, la régulation de l'axe HPA par les glucocorticoïdes s'exerce en deux temps : premièrement les glucocorticoïdes induisent une surexpression des récepteurs à la CRH et aux glucocorticoïdes puis, pour éviter l'emballement de la réponse au stress faisant suite à l'hyperactivation de l'axe, les glucocorticoïdes assurent un rétrocontrôle négatif notamment en diminuant l'expression des récepteurs à la CRH et aux glucocorticoïdes. A J15 PN, l'axe est immature et ses boucles de régulations ne sont pas encore effectives ; ainsi, la sécrétion de corticostérone endogène est diminuée, de même que la capacité des glandes surrénales à synthétiser cette hormone en réponse au stress (Schmidt *et al.*, 2002 ; Dakine *et al.*, 2000). Cette période qui s'étend normalement chez la souris de la naissance à J12 PN est qualifiée de « *stress hyporesponsive period* ». En effet, Schmidt *et al.* (2003) ont montré que le souriceau isolé pendant 30 minutes à J1, 2, 4, 6, 9, 12, 14 ou 16 PN présentait une augmentation du taux sérique de corticostérone à J12, 14 et 16 PN alors qu'à J1, 2, 4, 6 et 9 PN, le taux était identique aux souris du groupe contrôle. Les auteurs ont aussi montré chez la souris non exposée à un stress que le gène *Crh* au sein de l'hypothalamus était surexprimé entre J1 et J9 PN en comparaison à l'expression observée entre J12 et 16 PN indiquant un effondrement du taux de CRH à partir de J12 PN. Ces deux résultats indiquent chez la souris, une mise en activité de l'axe HPA et de ses boucles de régulation à partir de J12 PN.

Dans notre étude, l'augmentation de corticostérone sérique témoigne de la mise en activité de l'axe HPA. Cependant, la surexpression des gènes codant pour la CRH et les récepteurs aux

glucocorticoïdes dans l'hypothalamus des souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN pourrait indiquer un retard ou un défaut dans la mise en place des boucles de régulation de cet axe.

Chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN, le marquage de la cytochrome c oxydase a révélé une augmentation significative de l'activité métabolique du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, responsable de la sécrétion de CRH et du noyau du faisceau solitaire. Ce dernier, par le biais de la sécrétion d'un peptide, le *glucagon-like peptide 1*, favorise la sécrétion d'ACTH qui à son tour stimule la libération de glucocorticoïdes (Smith et Vale., 2006). Ces augmentations d'activité métabolique neuronale régionale pourraient expliquer le taux sérique élevé de glucocorticoïdes observé chez les souris du groupe « corticostérone ».

De plus, l'activité de l'axe HPA est normalement régulée négativement par l'hippocampe. Dans notre étude, des altérations morphométriques de cette structure ont été observées chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN. Elles pourraient contribuer sur le plan fonctionnel à un défaut de régulation de l'axe HPA, et ainsi à l'augmentation du taux sérique de corticostérone observée chez les souris du groupe « corticostérone ». Le rétrocontrôle exercé par les glucocorticoïdes sur l'hippocampe implique les récepteurs aux glucocorticoïdes exprimés par cette structure. Schmidt *et al.*, (2003) ont démontré que le taux de transcrits codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes de l'hippocampe augmentait progressivement à partir de J4 PN pour atteindre un pic à J12 PN et diminuait légèrement entre J14 et J16 PN. Or dans notre étude, les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN présentaient une diminution d'expression du gène codant pour ces récepteurs. Ces résultats différentiels suggèrent un défaut de la boucle de rétrocontrôle hippocampique, possiblement par un retard de maturation.

Chez les souris 29 jours

L'injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN induit une augmentation du taux sérique de corticostérone. Des résultats identiques ont été observés chez le rat (Johnson *et al.*, 2006) et la souris (Zhao *et al.*, 2009 ; Demuyser *et al.*, 2016) adultes ayant reçu une administration chronique (21 jours) de corticostérone à des concentrations respectives de 40 et 20 mg/kg. De plus, plusieurs études ont montré les effets délétères d'une exposition chronique à la corticostérone sur la morphologie et l'organisation neuronale de l'hippocampe (Magarinos *et al.*, 1995), de l'amygdale (Vyas *et al.*, 2002) et du cortex préfrontal (Wellma *et al.*, 2001). Or ces structures sont impliquées dans la régulation de l'axe HPA. Une altération structurale de ces régions pourrait induire une dérégulation de l'axe HPA et expliquer le taux sérique basal élevé chez les souris traitées chroniquement à la corticostérone.

2. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur le développement postnatal du SNC

Cervelet à J15 PN

Les résultats morphométriques du cervelet suggèrent que les effets de la corticostérone lors du développement postnatal du cervelet sont variables en fonction du lobule considéré, de la durée et de la fenêtre temporelle de traitement.

La grande variabilité des résultats obtenus lors des mesures d'épaisseur des couches cellulaires du cortex cérébelleux de différents lobules, indique que l'impact de la corticostérone sur le développement du cervelet dépend du lobule considéré. En effet, les 5 lobules étudiés présentent une temporalité de mise en place différente : la maturation étant plus précoce pour le lobule paramédian et plus tardive pour crus II, la période d'exposition à un taux supra-physiologique de corticostérone variant de 4 jours pour les lobules crus I, crus II à 8 jours pour les lobules paramédian et vermis IV/V.

De plus, cette différence de temporalité implique non seulement les lobules mais également les différentes couches cellulaires de chaque lobule (*Figure 40*). Durant la mise en place des couches granulaire et moléculaire, un schéma général de croissance en deux étapes est observé. Dans un premier temps, la migration des cellules, leur mise en place et l'établissement de contacts synaptiques induisent une augmentation d'épaisseur de la couche cellulaire. Puis s'exerce une sélection synaptique au cours de laquelle certaines synapses sont conservées et d'autres éliminées. Les neurones « non sélectionnés » subissent alors un processus d'apoptose. Ces deux derniers événements se traduisent par une diminution d'épaisseur de la couche cellulaire. Ce schéma est respecté dans chacune des couches cellulaires des différents lobules cérébelleux selon des fenêtres temporelles différentes. Ainsi, la couche granulaire externe disparaît pour chaque lobule à J21 PN sauf pour le lobule crus I qui voit disparaître sa couche granulaire externe plus précocement à J18 PN (Ehrmann *et al.*, 1984). Cependant les fenêtres temporelles de migration des précurseurs des futures cellules à grains constitutives de la couche granulaire interne diffèrent. Dans le vermis postérieur, la couche granulaire externe présente une augmentation d'épaisseur de J2 à J9 PN puis son épaisseur se réduit jusqu'à J21 PN. En parallèle, la couche granulaire interne se met en place de J9 à J21 PN (Altman, 1972). L'augmentation d'épaisseur de la couche granulaire interne du lobule crus I débute à J9 et s'achève à J12 PN (Ehrmann *et al.*, 1984). Dans le lobule crus II, la migration des précurseurs des futures cellules à grains est plus tardive, elle débute à J12 PN et se termine à J15 PN alors que la couche granulaire externe s'amointrit à partir de J12 PN (Jacquart *et al.*, 1986). Pour le lobule paramédian, l'épaisseur de la couche granulaire externe diminue à partir de J9 alors que l'épaisseur de la couche granulaire interne augmente de J9 à J15 PN puis diminue de J18 à J21

(Jacquart *et al.*, 1986). La couche moléculaire des lobules crus I et II se développe entre J9 et J18 PN alors que la couche moléculaire du lobule paramédian se met en place entre J9 et J15 PN (Ehrmann *et al.*, 1984 ; Jacquart *et al.*, 1986). Au sein du vermis, la couche moléculaire connaît une première phase de croissance lente de J2 à J10 PN puis une phase rapide jusqu'à J21 PN (Altman, 1972) (Figure 40). Pour le lobule simplex, à notre connaissance, aucune donnée concernant la fenêtre de développement n'a été retrouvée dans la littérature. Cependant, comme le lobule paramédian, ce lobule étant impliqué dans la régulation des fonctions sensori-motrices, nous pouvons supposer que ces deux lobules suivent le même schéma temporel de développement.

Des différences significatives d'épaisseurs entre les 2 groupes de souris ont été observées pour les lobules dont la fenêtre de développement correspondait à 7-8 jours de traitement par corticostérone.

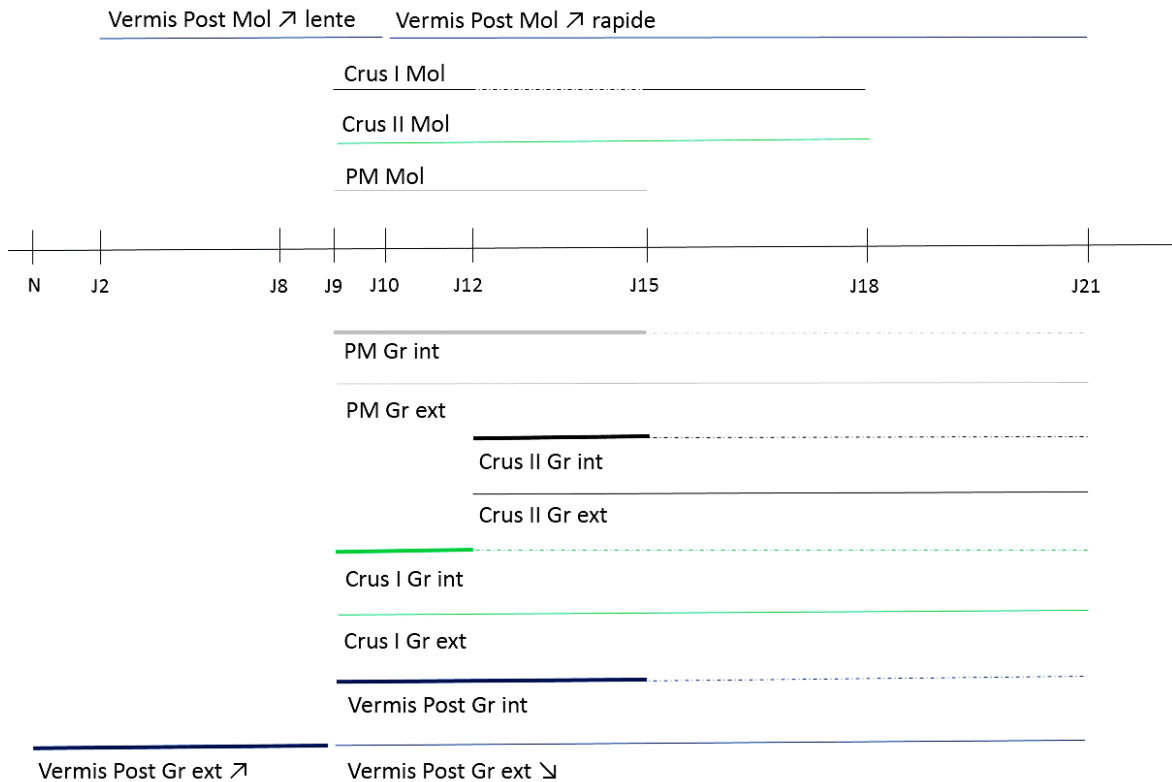


Figure 40 : Représentation schématique des fenêtres temporelles des lobules cérébelleux vermis postérieur, crus I, crus II et paramédian. Mol : couche moléculaire ; Gr int : couche granulaire interne ; Gr ext : couche granulaire externe ; PM : lobule paramédian. D'après : Haddara et Nooreddin, 1966 ; Altman, 1972 ; Ehrmann *et al.*, 1984 ; Jacquart *et al.*, 1986.

Cervelet à J29 PN

Chez la souris, le 29^{ème} jour marque la fin du développement postnatal en matière de migration cellulaire et d'organisation des couches du cervelet. L'augmentation des épaisseurs de la couche granulaire des lobules paramédian et simplex observée à J29 PN pourrait être le résultat d'un défaut d'apoptose post-migration qui n'est pas observée dans les lobules hémisphériques crus I et crus II. Il est intéressant de noter que ces augmentations s'accompagnent d'une augmentation significative de la couche moléculaire.

Dans le lobe paramédian, la diminution d'épaisseur des couches granulaires externe et interne à J15 et de l'augmentation des couches granulaire et moléculaire à J29 suggèrent un retard de croissance et de maturation du lobule. Dans un premier temps, le taux supra-physiologique de corticostérone semble avoir retardé la phase de multiplication cellulaire et de migration normalement à son pic à J15. A J29, par contre, les augmentations d'épaisseur des couches granulaire et moléculaire pourraient signer un retard de maturation caractérisée par une apoptose post-migratoire et une sélection synaptique.

Dans le lobe crus I, la mise en place de la couche moléculaire s'effectue en deux étapes, de J9 à J 12 PN puis de J15 à J18 PN. Notre étude a montré que l'injection chronique de corticostérone semble plutôt altérer la seconde phase de croissance de la couche moléculaire. En effet, à J15 PN aucune modification d'épaisseur de la couche moléculaire n'était observée chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN alors qu'à J29 PN, la couche moléculaire était réduite de -11,7 %.

Aucune modification morphométrique n'a été observée dans le lobule crus II. Ces résultats peuvent s'expliquer par une fenêtre de développement plus tardive pour ce lobule, de J12 à J 21 PN.

Les résultats morphométriques du cervelet suggèrent que la corticostérone a un effet certain sur le développement des différents lobules du cervelet mais ces effets sont variables en fonction du développement du lobule considéré d'une part et de la durée du traitement et de sa fenêtre temporelle d'action d'autre part. Le développement et la maturation de ces lobules se font concomitamment avec l'acquisition fonctionnelle de l'animal dont elle dépend (Ehrmann *et al.*, 1984). Il est à noter que les modifications morphologiques obtenues intéressent les lobules simplex et paramédian importants pour le contrôle des fonctions sensori-motrices qui s'acquièrent pendant le premier mois post-natal de la souris, période des injections de corticostérone. Les fonctions cognitives qui intéressent les lobules hémisphériques crus I et crus II se mettent en place plus tardivement dans la première moitié du second mois postnatal (période post-juvénile et adolescence). Ainsi, la maturation de ces lobules étant plus tardive, l'absence de modification morphologique au sein du lobule crus II et la faible altération observée dans le lobule crus I signerait

un effet moindre de la corticostérone qui n'a pas été injectée dans la période de vulnérabilité maximale pour ces lobules.

Dans le lobule paramédian, ces altérations sont transitoires puisqu'elles ne sont plus observées à l'âge adulte (second volet de l'étude). Dans le lobule simplex, cette altération mise en évidence à J15 et J29 est possiblement délétère pour l'organisation de la couche granulaire puisqu'une diminution d'épaisseur de 21 % est observée à l'âge adulte (second volet de l'étude).

Seule une quantification cellulaire précise de la couche aux différents âges pourrait nous apporter des informations quant à la fonctionnalité de ce lobule.

Hippocampe à J15 et J 29 PN

A J15 PN, la couche granulaire du gyrus denté présentait une épaisseur réduite alors qu'une augmentation d'épaisseur des couches moléculaire et pyramidale de la région CA1 a été mise en évidence. Les mêmes modifications d'épaisseurs des différentes couches hippocampiques ont été observées à J29 PN. A noter que la couche moléculaire du DG était aussi réduite à J29 PN alors qu'elle n'était pas modifiée à J15 PN. Les résultats obtenus dans le DG de la formation hippocampique sont similaires à ceux présentés par Gould *et al.*, (1991). Les auteurs avaient démontré qu'une administration journalière de corticostérone de J2 à J4 PN induisait une perte cellulaire significative au sein de la couche granulaire et aucune modification de la couche moléculaire à J6 PN. Dans notre modèle, la diminution d'épaisseur de la couche granulaire du gyrus denté pourrait être due à un défaut de migration cellulaire ou à une perte accrue des cellules après migration.

Les résultats différentiels observés entre CA1 et DG s'expliquent par le fait que le gyrus denté est la seule région à poursuivre son développement durant la période postnatale (Bayer et Altman, 1995). Le taux supraphysiologique de corticostérone administrée durant cette période semble avoir retardé la migration des cellules granulaires (DG Gr) à J15 et J29 PN et le développement de leur arborisation dendritique (DG Mol) à J29 PN.

Dans l'hippocampe, aucune modification d'expression des gènes codant pour MAP2 et NFL n'a été observée, suggérant que 8 jours de traitement à la corticostérone sont insuffisants pour moduler l'expression des gènes codant pour ces deux protéines du cytosquelette. La protéine MAP2 étant principalement retrouvée au sein des dendrites et la protéine NFL déterminant le diamètre axonal, certains auteurs (Zhao *et al.*, 2009 ; Cereseto *et al.*, 2006 ; Teng *et al.*, 2001) ont supposé qu'un excès de glucocorticoïdes pouvait avoir des effets délétères sur l'expression de MAP2 et NFL aboutissant ainsi à des défauts morphologiques des dendrites, eux même responsables d'une

atrophie de l'hippocampe. Dans notre étude, les altérations morphométriques observées dans l'hippocampe à J15 PN chez la souris traitée à la corticostérone de J8 à J15 PN ne peuvent être expliquées par une modification d'expression des gènes codant pour ces deux protéines du cytosquelette.

L'administration répétée de corticostérone de J8 à J15 PN a induit une diminution d'expression des gènes codant pour le BDNF et son récepteur TrkB. Ces résultats sont concordants avec ceux de Duman et Monteggia (2006, revue de littérature), Dwivedi *et al.*, (2006) ou encore Li *et al.*, (2019). Ces deux derniers auteurs ont respectivement montré une diminution du taux de transcrits du BDNF dans l'hippocampe chez le rat adulte traité par pastille de 100 mg corticostérone (relargage de 4.76 mg/j pendant 21 jours) et chez le rat âgé de 21 ou 22 jours (pré-pubertaire) traité par injection intra péritonéale de corticostérone pendant 21 jours.

3. Effets de l'administration répétée de corticostérone de J8 à J15 PN sur l'expression des gènes d'intérêt

Hormones du stress à J15 PN

Dans le cervelet, le récepteur CRH-R1 est présent dès la naissance et jusqu'à J8 PN en position supra nucléaire au sein des cellules de Purkinje. Puis de J9 à J14 PN, ce récepteur circonscrit le noyau des cellules de Purkinje pour enfin acquérir sa position définitive (comme observée à l'âge adulte) au niveau du soma et des dendrites primaires des cellules de Purkinje entre J16 et J21 PN (King et Bishop, 2002). Le CRH-R1 est également exprimé par les interneurons GABAergiques (les cellules étoilées et les cellules à panier) jusqu'à leur mise en place dans la couche moléculaire et par les cellules de Golgi durant la phase de développement postnatal et à l'âge adulte (King et Bishop, 2002). Le récepteur CRH-R2 est tout d'abord retrouvé au sein du soma des cellules de Purkinje de la naissance à J5 PN puis entre J12 et 14 PN, il acquiert sa position définitive au pôle basal pour sa forme complète et au niveau du segment initial de l'axone de la cellule de Purkinje pour sa forme tronquée. La forme tronquée de CRH-R2 est également retrouvée entre J3 et J14 PN au niveau synaptique entre les fibres parallèles d'une part et l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje d'autre part. Les cellules étoilées et à panier expriment le CRH-R2 respectivement entre J4 et J15 PN et entre J1 et J10 PN. Le CRH-R2 est aussi mis en évidence à partir de J8 PN au niveau des segments axonaux initiaux des cellules de Golgi (Lee K.H. *et al.*, 2004 et 2007).

La localisation des récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 varie donc au cours du développement postnatal suggérant un rôle potentiel du système CRH/CRH-R1/CRH-R2 dans le développement et la maturation du cervelet. Le système CRH-CRH-R1 semble notamment impliqué dans la croissance de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (Swinnny *et al.*, 2004) et la migration des

interneurones au sein de la couche moléculaire (King et Bishop, 2002). Les glucocorticoïdes endogènes jouent eux un rôle crucial dans la mise en place de la couche granulaire interne en orchestrant l'élimination par apoptose de la couche granulaire externe à l'issue des phases de prolifération et de migration des cellules progénitrices des cellules à grains (Noguchi *et al.*, 2011, 2008 ; Yehuda et Meyer, 1991). Dans notre étude, les souris traitées par injections répétées de corticostérone de J8 à J15 PN présentaient une diminution d'expression des gènes codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes et les récepteurs CRH-R1 et CHR-R2. Ces résultats suggèrent que l'injection répétée de glucocorticoïdes pourrait donc altérer les étapes de mise en place des différentes couches cellulaires du cervelet en modulant l'expression des gènes codant pour la CRH, ses récepteurs CRH-R1, CRH-R2 et les récepteurs aux glucocorticoïdes. Toutefois, cette modification d'expression des gènes pourrait refléter un retard de développement caractérisé par une diminution du nombre de cellules dans la couche granulaire interne et une diminution de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Cependant, il est difficile d'interpréter précisément ces résultats étant donné que les analyses en qPCR ont été effectuées sur le cervelet entier alors que l'analyse morphométrique a été détaillée sur plusieurs lobules.

Protéines du cytosquelette à J15 PN

Aucune modification d'expression des gènes codant pour MAP2 et NFL n'a été observée dans le cervelet suggérant que 8 jours de traitement à la corticostérone sont insuffisants pour moduler l'expression des gènes codant pour ces deux protéines du cytosquelette. Cette absence de modification peut s'expliquer par une immaturité tissulaire, plus particulièrement de l'arborisation dendritique des cellules constitutives du cervelet ou par une diminution du nombre de cellules dans certains lobules comme dans le lobule paramédian. Chez la souris adulte, une injection de 6 jours de corticostérone induit une augmentation de MAP2 et de NFL dans l'hippocampe (Zhao *et al.*, 2009). L'absence de modification dans notre étude à la fois dans le cervelet comme dans l'hippocampe signerait une immaturité cellulaire dans ces deux structures.

Neurotrophines : BDNF et son récepteur TrkB à J 15 PN

Au sein du cervelet, le BDNF est normalement retrouvé au niveau du soma des cellules de Purkinje, des dendrites des cellules à grains, des axones terminaux des fibres moussues et des cellules de Golgi (Chen *et al.*, 2016). Le TrkB a été mis en évidence au niveau du soma des cellules de Purkinje (Yan *et al.*, 1997), des cellules à grains et des cellules de Golgi (Rico *et al.*, 2002). Plusieurs auteurs ont montré que durant la période postnatale, le BDNF et son récepteur TrkB étaient impliqués dans l'expansion de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (Carter *et al.*, 2002, ; Minichiello

et Klein, 1996 ; Rico *et al.*, 2002) dont le pic de croissance se situe entre J8 et J15 PN (Manto et Habas, 2013). Dans notre étude, les taux de transcrits de BDNF et de TrkB étaient identiques dans les deux groupes de souris. L'expression du BDNF et de son récepteur n'étant pas perturbée, ceux-ci pouvaient donc jouer leur rôle trophique sur l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Parallèlement, le BDNF promeut la migration des futures cellules à grains de la couche granulaire externe à la couche granulaire interne. En effet, il existe un gradient de BDNF au sein des différentes couches cellulaires du cortex cérébelleux qui agit comme un facteur chimiotactique, fournissant ainsi un signal directionnel précis pour la migration des futures à grains (Zhou *et al.*, 2007). Dans notre étude, l'expression du gène codant pour le BDNF n'étant pas modifiée par l'administration de corticostérone, nous pouvons supposer que le rôle chimiotactique du BDNF n'était pas perturbé et donc que le signal directionnel de migration des futures cellules à grains était maintenu. Cependant, il est difficile d'interpréter précisément ces résultats étant donné que les analyses en qPCR ont été effectuées sur le cervelet entier alors que l'analyse morphométrique a été détaillée sur plusieurs lobules. Nous ne pouvons pas ignorer la possibilité que certains lobules puissent être atteints car exposés à la corticostérone au moment de leur fenêtre de vulnérabilité.

Récepteurs glutamatergiques GluR δ 2 à J15 PN

Normalement, le récepteur GluR δ 2 se distribue de J1 à J7 PN le long de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (Takayama *et al.*, 1996 ; Kurihara *et al.*, 1997). Puis dès J10 PN, ce récepteur n'est fortement exprimé qu'au sein des épines dendritiques localisées sur les dendrites distales de la cellule de Purkinje (Takayama *et al.*, 1996 ; Zhao *et al.*, 1998 ; Gounko *et al.*, 2005) intervenant directement dans la synaptogenèse entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles (Cesa *et al.*, 2003 ; Kurihara *et al.*, 1997). Parallèlement, il est impliqué dans le processus d'élimination des fibres grimpances non sélectionnées durant la phase de compétition fonctionnelle (Hashimoto *et al.*, 2001).

Dans notre étude, l'administration de corticostérone de J8 à J15 PN induit une diminution très importante de l'expression du gène codant pour GluR δ 2 suggérant ainsi une perturbation de la synaptogenèse. A noter également que cette étape du développement implique d'autres facteurs tels que la CRH ou le BDNF qui modulent la densité des épines dendritiques des cellules de Purkinje (Gounko *et al.*, 2013 ; Morrison et Mason, 1998 ; Shimada *et al.*, 1998). Or aucune modification d'expression des gènes codant pour ces deux neuromodulateurs n'a été observée dans notre étude. Des expérimentations complémentaires évaluant la densité des épines dendrites seraient nécessaires afin de déterminer si la diminution du transcrits de GluR δ 2 est liée à un défaut de synaptogenèse.

Par ailleurs, des mutations du gène codant pour GluR δ 2, induisent une persistance de la multi-innervation de la cellule de Purkinje par les fibres grimpantes. Celle-ci se traduit par un phénotype moteur altéré avec ataxie, perte de la coordination et des défauts d'apprentissage dans la piscine de Morris (Lalonde *et al.*, 2003). Or dans notre étude, aucune conséquence fonctionnelle apparente n'a été observée chez les souris du groupe « corticostérone ».

4. Effets de l'administration répétée et chronique de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur l'activité métabolique régionale à J15 et à J29 PN

Le marquage de la COX à 15J a permis de démontrer qu'une administration répétée de corticostérone durant la période postnatale de J8 à J15 modifiait l'activité métabolique de nombreuses régions de l'encéphale, particulièrement le cervelet, structure en cours de développement à cette période et plus spécifiquement la couche granulaire. Les variations d'activité observées entre les lobules sont le reflet des différences temporelles du développement. Le lobule paramédian ayant normalement une maturité fonctionnelle la plus précoce, l'augmentation d'activité mise en évidence témoigne d'une activité synaptique glutamatergique déjà efficiente. La densité de marquage de la COX reflète l'activité neuronale autrement dit l'activité synaptique (Mjaatvedt et Wong-Riley, 1988 ; Zhang et Wong-Riley, 1999). Chez les souris traitées à la corticostérone de J8 à J15 PN, l'hypométabolisme constaté dans les autres lobules cérébelleux (vermis moléculaire et granulaire, simplex granulaire, crus I et II granulaire) pourrait donc indiquer un retard de développement, plus précisément un retard dans l'établissement des connexions synaptiques entre les différentes cellules constitutives de ces lobules. Ce retard de développement a également été observé par l'analyse morphométrique du cervelet qui a mis en évidence une augmentation d'épaisseur des couches granulaires des lobules simplex et du vermis IV/V qui pourrait être le résultat d'un défaut d'apoptose post-migration impliquant un défaut fonctionnel de ces structures. Le lobule paramédian, seule structure atrophiée, présentait une augmentation d'activité métabolique. Cette dernière pourrait être une conséquence directe de l'atrophie ou traduire un phénomène fonctionnel compensatoire. Cette seconde hypothèse semble plus probable étant donné que le lobule paramédian présente un hypermétabolisme associé à une hypertrophie des couches granulaire et moléculaire à J29 PN.

Il est à noter que toutes les principales structures en connexion directe avec le cervelet sont affectées, les noyaux réticulaires latéral, pontique et paramédian, l'olive bulbaire, le noyau rouge parocellulaire, les noyaux vestibulaires, les noyaux thalamiques ventro-latéral et diffus (reunions rhomboïde) et ainsi que le cortex préfrontal, principale cible efférente dans le cortex cérébral (Ito, 1984).

L'administration répétée et chronique de corticostérone activait les cortex sensori-moteurs et les structures impliquées dans les fonctions sensori-motrices : un hypermétabolisme a été observé soit à J15 PN, soit à J29 PN, soit à J15 et 29 PN dans le cortex moteur primaire, le cortex moteur secondaire antérieur, le cortex sensori-moteur primaire, le pallidum latéral, les noyaux thalamiques ventro-latéraux, le noyau géniculé médial, le noyau rouge parvocellulaire, les noyaux vestibulaire latéral et médiocaudal, le noyau prépositus, l'olive bulbaire et le lobule paramédian du cervelet. En effet, le lobule paramédian est principalement impliqué dans des fonctions sensori-motrices (Stoodley et Schmahmann, 2010), l'hypermétabolisme de ce lobule et des autres régions citées précédemment pourrait être associé au développement sensori-moteur de l'animal notamment à ses activités d'exploration de l'environnement qui débutent après ouverture des yeux aux alentours de J12 PN. Cette augmentation d'activité métabolique régionale pourrait aussi expliquer l'augmentation des fonctions motrices d'exploration observée dans le test du SHIRPA à J22 PN et l'actimètre à J29 PN chez les souris traitées chroniquement à la corticostérone (résultats issus du second volet de l'étude).

Les circuits des **structures limbiques** impliquées dans la gestion des émotions ont également été affectés par l'administration répétée de corticostérone de J8 à J15 PN : un hypermétabolisme a été mis en évidence dans l'hippocampe postérieur, le noyau antérieur du thalamus, différents noyaux hypothalamiques dont le noyau paraventriculaire, des noyaux végétatifs du faisceau solitaire et du noyau moteur du nerf vague alors qu'un hypométabolisme a été observé dans le noyau raphé dorsal. A J29 PN, l'administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN a également engendré des modifications d'activité métabolique régionale dans l'hippocampe postérieur, le cortex cingulaire et les noyaux hypothalamiques.

Un hypométabolisme a été observé à J29 PN au sein de la **substance grise périaqueducale (PAG)**, structure de relais entre le système limbique et les centres de contrôle des comportements moteurs stéréotypiques (Clark *et al.*, 2005). La PAG reçoit des informations issues du noyau central de l'amygdale et émet des connexions neuronales vers l'hypothalamus régulant ainsi des fonctions impliquées dans la survie de l'espèce (rythme cardiaque, ventilation, comportement de défense, auto-toilettage, etc.).

L'activité métabolique des **habenula latérale et médiale** était également modifiée par l'administration de corticostérone : un hypermétabolisme de l'habenula médiale et latérale a respectivement été observé à J15 et à J19 PN. L'habenula latérale a pour rôle principal de réguler négativement la sécrétion des amines biogènes dans les noyaux du tronc cérébral, le raphé dorsal (sérotoninergique), la substance noire et la VTA (dopaminergique) et le locus coeruleus

(norépinéphrine) (Clark *et al.*, 2005). Dans notre étude, à J29 PN un hypométabolisme de deux afférences de l'habenula latérale a été observée : dans l'hypothalamus latéral et la PAG (Herkenham et Nauta, 1977). Aucune modification d'activité métabolique n'a été observée au sein des structures cibles de l'habenula latérale (le raphé médian et dorsal, la substance noire, le colliculus supérieur, le noyau reuniens, le pallidum ventral, le noyau parafasciculaire, l'aire tegmentale ventrale et les noyaux thalamiques centro-médian, médio-dorsal et ventro-médian) à J29 PN après un traitement chronique à la corticostérone administré de J8 à J29 PN. L'habenula médiale a présenté un hypermétabolisme à J15 PN chez les souris traitées à la corticostérone. Cette structure cholinergique reçoit des afférences en provenance de l'hippocampe et se projette sur les noyaux diffus du thalamus (noyau médio-dorsal, CM/CL, réticulée) (Clark *et al.*, 2005). Son hypermétabolisme observé à J15 PN chez les souris traitées à la corticostérone est à mettre en parallèle avec l'hypermétabolisme observé au sein des noyaux thalamiques CM/CL impliqués dans l'activation cérébrale et par conséquent l'éveil cortical (+9,5 %, $p=0,0535$).

Les injections répétées et chroniques de corticostérone ont également eu un impact 1) sur l'activité métabolique de l'**hippocampe postérieur** présentant un hypermétabolisme aux deux âges testés. L'hypermétabolisme observé à J15PN pourrait être mis en parallèle avec l'augmentation d'expression du gène codant pour la CRH qui joue un rôle de neuromodulateur dans l'hippocampe.

➤ SECOND VOILET DE L'ETUDE

1. Impact d'une injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur le taux sérique de corticostérone à l'âge adulte.

Le dosage de corticostérone sérique a démontré que le taux basal de corticostérone était identique entre les deux groupes de souris adultes suggérant que les réponses aux différents stress induits par les tests comportementaux et par la mise à mort de l'animal effectuée après le dernier test de la plateforme visible de la piscine de Morris n'ont pas été altérées. Toutefois, dans l'hypothalamus les gènes codant pour la CRH, le CRH-R1 et les GR étaient surexprimés dans le groupe des souris traitées à la corticostérone indiquant que rétrocontrôle normalement effectué par les glucocorticoïdes sur l'hypothalamus pourrait être inactif ou défectueux bien que la surexpression du gène codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes laisse plutôt envisager une diminution du seuil de réponse au stress (ou hypersensibilité).

Dans l'hippocampe, les transcrits codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes étaient diminués. De façon similaire, une étude clinique a révélé une diminution de l'expression du gène codant pour

les récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe d'adultes victimes d'abus durant l'enfance (Labonté et Turecki, 2012). Comme l'hippocampe a un rôle majeur dans la régulation de l'activité de l'axe HPA en réponse au stress, la baisse des transcrits suggère un défaut de la régulation hippocampique sur l'axe HPA. Toutefois, le taux sérique de corticostérone étant similaire dans les deux groupes de souris, les altérations seraient spécifiques permettant ainsi par le biais d'effets compensatoires une sécrétion normale de corticostérone endogène. Ces résultats sont également à mettre en parallèle avec l'activité neuronale augmentée observée dans l'hippocampe et l'amygdale, deux structures participant directement à la régulation de l'axe HPA par le biais de rétrocontrôles respectivement négatifs et positifs.

2. Impact d'une injection de corticostérone de J8 à J15 PN et de J8 à J29 PN sur l'évolution pondérale de l'animal

Le suivi du poids corporel des animaux du premier et du second volet de l'étude n'a montré aucune différence intergroupe quel que soit l'âge. Des études similaires d'injection de glucocorticoïdes lors du développement rapportent plus généralement une perte de poids significative lors du traitement, perte qui perdurait longtemps après l'arrêt des injections (Howard et Granoff, 1968 ; Brabham *et al.*, 2000). En effet, Shoener *et al.*, (2006) ont observé une perte de poids chez l'animal traité par glucocorticoïdes dès la période prénatale par le biais de la mère en gestation puis durant la période postnatale *via* la mère allaitante. Ces effets ont été précisés par Brabham *et al.*, (2000) : les auteurs ont montré que l'impact sur l'évolution pondérale était dépendant de la période de traitement, prénatale, postnatale ou pré- et postnatale. La diminution du poids corporel ne s'exprimait durablement que dans le cas où les injections débutaient au cours de la période prénatale. Dans notre étude, les injections répétées ou chroniques de corticostérone ont intéressé la période postnatale, les résultats observés concernant le poids des animaux sont donc concordants avec les effets décrits dans la littérature. Aucune différence de poids n'a été observée chez le rat adulte (3 mois) traité à la corticostérone (200 µg/mL dans l'eau de boisson) de J1 jusqu'au sevrage (Catalani *et al.*, 2002) ou chez la souris traitée par corticostérone (50 µg/mL dans l'eau de boisson) de J1 à J4 PN (De Filippis *et al.*, 2013). Cependant le poids des rats traités par dexaméthasone (J3 : 0,5 mg/kg, J4 : 0,25 mg/kg, J4 : 0,125 mg/kg et J6 : 0,05 mg/kg) de J3 à J6 PN est plus faible que celui des souris du groupe « contrôle » mesuré entre J4 et J8 PN et à J20 PN (Flagel *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été observés chez le rat adulte ayant reçu une injection unique de dexaméthasone (1,5 mg/kg) à J7 PN (Benesova et Pavlik, 1989 ; Ferguson et Holson, 1999 ; Ferguson *et al.*, 2001). Ces résultats démontrent que la dexaméthasone aurait un

impact délétère sur l'évolution pondérale de l'animal alors que la corticostérone n'aurait pas cet effet.

3. Impact d'une injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur le phénotype moteur de l'animal

Développement et maturation des fonctions sensori-motrices, des réflexes posturaux et vestibulaires.

Le test du SHIRPA permet d'expertiser globalement la souris en évaluant la mise en place des réflexes vestibulaires et posturaux, la tonicité musculaire, l'activité motrice, les fonctions sensorielles, l'anxiété et certains paramètres végétatifs. Ferguson *et al.*, (2001) ont montré qu'une injection de dexaméthasone à J7 PN induisait chez le rat une perturbation du réflexe géotaxique, l'animal se retournant plus lentement à J8 PN. De plus, les souris traitées à la dexaméthasone à J7, J9 et J11 PN chutent plus rapidement de la grille verticale lors de l'évaluation du réflexe géotaxique à J25 PN. Cependant, ce n'est plus le cas lors de l'évaluation de ce réflexe à J26 PN (Maloney *et al.*, 2011). Une autre étude a montré qu'un traitement par dexaméthasone de J3 à J6 PN altérait les réflexes posturaux à J7 et J14 PN (Flagel *et al.*, 2002). Dans notre étude, aucune différence intergroupe n'a été observée à J15 et J22 PN pour l'ensemble des paramètres évalués. L'injection de corticostérone durant la période postnatale n'induit donc pas d'altération majeure dans la mise en place des fonctions motrices dans le premier mois de la vie postnatale de l'animal contrairement à un traitement plus précoce. De plus, aucun signe évident d'anxiété ou de peur n'a été mis en évidence.

L'administration de corticostérone de J8 à J29 PN induit un changement du phénotype moteur qui s'inscrit et perdure à l'âge adulte.

A J22 PN, l'évaluation réalisée par le biais du SHIRPA a permis de démontrer que les souris traitées à la corticostérone présentaient une activité motrice majorée par rapport aux souris du groupe contrôle lorsque celles-ci étaient observées dans une enceinte close pendant 5 minutes (cylindre transparent de 15 cm de diamètre). Cette hyperactivité a également été observée à J29 PN dans le test de l'actimètre évaluant l'activité motrice spontanée. En effet dans trois des six paramètres mesurés, les souris du groupe corticostérone exerçaient significativement plus de déplacements horizontaux, de mouvements stéréotypés lents correspondant par exemple à des activités de toilettage et de mouvements de redressement rapides participant à l'exploration. Des résultats similaires ont été mis en évidence par Howard et Granoff (1968). Ils ont démontré que des souris traitées par corticostérone entre J2 et J14 PN *via* un implant sous-cutané présentaient une

augmentation d'activité motrice mesurée quotidiennement par la distance parcourue dans une roue. Cette activité motrice augmentée s'observait dès le début du test démarré à J13 PN et perdurait après le traitement puisqu'elle s'exprimait à J26 PN.

A 3 mois, les souris du groupe corticostérone se caractérisaient par une hyperactivité dans cinq des six paramètres enregistrés par l'actimètre. Un effet analogue à cette augmentation d'activité motrice a également été retrouvé dans le test de la plateforme visible de la piscine de Morris où les souris du groupe « corticostérone » étaient plus rapides à embarquer sur la plateforme visible et effectuaient un trajet plus court pour atteindre la plateforme visible que les souris du groupe « contrôle ». L'augmentation d'activité motrice observée au cours du développement postnatal à J22 et J29 PN s'inscrit donc durablement puisque celle-ci persistait à l'âge adulte. Des résultats similaires ont été mis en évidence chez les souris devenues adultes traitées par corticostérone dès la troisième semaine embryonnaire jusqu'au sevrage (Pechnick *et al.*, 2006). De plus, une injection unique de dexaméthasone (1,5 mg/kg) à J7 PN induit chez le rat une augmentation d'activité motrice évaluée dans un champ ouvert de J18 à J21 PN (Ferguson et Holson, 1999) et à 8 mois (Benesova et Pavlik, 1989). Cet effet ergogène durable est classiquement attribuée à une stimulation dopaminergique que nous n'avons pas mis en évidence dans les structures dopaminergiques du mésencéphale lors du marquage de la cytochrome c oxydase. Il est possible que les altérations cérébelleuses observées participent à cette modification comportementale, puisqu'une telle hyperactivité dans ce même test a été observée chez des souris ataxiques présentant une dégénérescence cérébelleuse (Lalonde et Strazielle, 2007).

Cependant, deux études ont montré que le nombre de déplacements et de redressements dans un champ ouvert était réduit chez le rat adulte ayant reçu des injections de dexaméthasone (1µg/g) à J1, J3 et J5 PN (Felszeghy *et al.*, 1993) et chez la souris adulte traitées par corticostérone de J2 à J14 PN (Howard et Granoff, 1968). Par ailleurs, une injection de dexaméthasone (3 mg/kg) à J7, J9 et J11 PN ou de J3 à J6 PN (selon le protocole suivant : J3, 0,5 mg/kg ; J4, 0,25 mg/kg ; J5, 0,125 mg/kg et J6, 0,05 mg/kg) n'a pas d'effet sur les performances motrices de la souris ou du rat évaluées dans un champ ouvert à J21 PN (Maloney *et al.*, 2011 ; Flagel *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus suite à un traitement par corticostérone (50 µg/mL dans l'eau de boisson) de J1 à J7 PN lorsque la souris évaluée dans un champ ouvert à l'âge adulte (De Filippis *et al.*, 2013). Ces différents résultats démontrent que les effets des glucocorticoïdes sur l'activité motrice dépendent de la période d'administration, de la dose et de la durée d'administration. L'absence de modification du phénotype moteur observée dans ces études pourrait s'expliquer par la période de traitement choisie. En effet l'animal ne débute ses activités d'exploration de l'environnement qu'après ouverture des yeux aux alentours de J12 PN.

L'administration de corticostérone de J8 à J29 PN n'induit pas de comportement anxieux évident à l'âge adulte.

Dans les 2 tests utilisés pour évaluer l'anxiété, le labyrinthe en croix surélevé et l'émergence, les souris du groupe « corticostérone » ont présenté des résultats similaires aux souris du groupe « contrôle », indiquant que l'administration de corticostérone durant la période de développement postnatale n'induit pas de comportement anxieux évident à l'âge adulte. Des résultats similaires ont été rapportés chez le rat adulte (à J57 PN) traité par injection unique de dexaméthasone (1,5 mg/kg) à J7 PN (Ferguson *et al.*, 2001) et chez le rat (à J28 PN) traité par injection répétée de dexaméthasone de J3 à J6 PN (J3, 0,5 mg/kg ; J4, 0,25 mg/kg ; J5, 0,125 mg/kg et J6, 0,05 mg/kg) (Flagel *et al.*, 2002) dans le test de l'émergence. De même, les souris soumises à un traitement par corticostérone (50 µg/mL dans l'eau de boisson) de J1 à J7 PN n'ont montré aucune différence significative avec le groupe contrôle dans le test du labyrinthe en croix surélevé effectué à l'âge adulte (De Filippis *et al.*, 2013). Par ailleurs, lorsque le rat est traité à la corticostérone (200 µg/mL dans l'eau de boisson soit $13,5 \pm 1,5$ mg/rat/jour) de J1 PN jusqu'au sevrage, il passe plus de temps à explorer les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé que le rat du groupe « contrôle » (Catalani *et al.*, 2000, 2002). En revanche, si la corticostérone (33,3 mg/L dans l'eau de boisson) est administrée durant la période embryonnaire de E14 à E21, les souris devenues adultes (à J80 PN) passent moins de temps dans les bras ouverts (Ceci *et al.*, 2014). Ces différentes études montrent qu'un phénotype anxieux n'est observé chez l'animal que lorsque l'administration de glucocorticoïdes survient avant J2 PN. De plus, Radulovic *et al.*, (1999, cités par Lalonde et Strazielle, 2017) ont démontré que chez la souris Balb/c, une injection dans l'hippocampe de CRH n'avait aucun effet sur l'exploration des bras ouverts dans le test de labyrinthe en croix surélevé. Dans notre étude, une diminution d'expression des gènes codant pour la CRH et les récepteurs aux glucocorticoïdes a été observée chez les souris traitées à la corticostérone sans pour autant modifier les performances de l'animal dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Ces résultats montrent que le taux de ces transcrits dans l'hippocampe n'ont pas d'impact dans ce test. Des résultats similaires ont été rapportés par Bitran *et al.*, (1998, cités par Lalonde et Strazielle, 2017) qui n'ont observé aucune modification de l'exploration des bras ouverts chez l'animal après injection de mifepristone, un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes.

L'injection de corticostérone durant la période postnatale ne semble pas affecter les performances de l'animal dans le labyrinthe en T évaluées sur une période de dix jours. Cependant, la division du test en deux périodes de 5 jours a montré que les souris traitées à la corticostérone n'alternaient que dans la seconde période (J6 à J10). Ce résultat différentiel suggère une néophobie ou de subtiles déficiences dans la mémoire spatiale qui disparaîtraient à la répétition de la tâche. Des

études ont démontré que l'alternance spontanée découle de processus développementaux de l'encéphale qui se mettent en place entre la seconde et la quatrième semaine postnatale (Lalonde, 2002), période d'administration de corticostérone dans notre étude.

Il est intéressant de noter que la latence de décision des souris traitées à la corticostérone était réduite de 50 % par rapport au groupe contrôle sans pour autant atteindre la significativité, du fait de la variabilité intragroupe. Ceci pourrait traduire une prise de décision plus rapide, une impulsivité sans que les capacités d'exploration soient désordonnées suggérant à nouveau des modifications du système dopaminergique (Clark *et al.*, 2005).

Effets de l'administration de corticostérone de J8 à J29 PN sur la coordination motrice des souris à l'âge adulte.

La coordination motrice ne semblait pas affectée puisqu'aucun des tests n'a montré une altération dans ce sens. Au contraire, les souris du groupe corticostérone présentaient des performances motrices supérieures à celles du groupe contrôle dans le test du rotarod. En revanche, les performances motrices évaluées sur une barre en rotation constante (2,5 rpm) étaient minorées dans l'étude Howard et Granoff (1968) chez les souris adultes traitées à la corticostérone de J2 à J14 PN et chez le rat adulte ayant reçu une injection de dexaméthasone (0,2, 1 ou 3 mg/kg) à J7 PN (Benesova et Pavlik, 1989). D'autres études ont montré qu'un traitement à la dexaméthasone (3 mg/kg) plus tardif à J7, J9 et J11 PN n'affectait pas les performances dans le test du rotarod chez la souris évaluée à J28 et J29 PN (Maloney *et al.*, 2011). Ces résultats montrent que les effets à long terme des glucocorticoïdes dépendent de la période d'administration durant le développement, de la molécule (corticostérone ou dexaméthasone) et de la dose.

Un traitement à corticostérone à l'âge adulte (souris 3 mois) a montré des résultats semblables, sans modification dans le test du cintre et de la poutre et une altération dans le rotarod. Cependant, les souris traitées présentaient une diminution des performances en lien avec une augmentation de la transcription des gènes codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes et une diminution de la transcription des gènes codant pour le CRH-R1 (Harlé *et al.*, 2017). Parallèlement Bishop et King (2013) ont montré qu'une injection d'astressine, un antagoniste de la CRH engendrait un déficit des performances motrices dans ce même test. Ces différents résultats montrent l'intérêt du test du rotarod pour les études qui évaluent l'impact de l'activation de l'axe HPA par un traitement aux glucocorticoïdes ou l'application d'un stress.

Le rôle du cervelet dans le contrôle de l'aspect temporel de la coordination motrice pourrait peut-être expliquer en partie les résultats différentiels obtenus dans les trois tests.

Effets de l'administration de corticostérone de J8 à J29 PN sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation des souris à l'âge adulte.

Le test d'apprentissage visuo-spatial dans la piscine de Morris a montré que l'administration chronique de corticostérone en période postnatale n'affectait pas les capacités d'apprentissage des souris (5 premiers jours du test). Les résultats sont très variables dans la littérature. Brabham *et al.*, (2000) ont rapporté un résultat similaire chez des rats adultes ayant subi une exposition à la dexaméthasone au cours du développement pré et postnatal *via* une administration sous-cutanée de la drogue chez la mère. *A contrario*, des rats traités par dexaméthasone à J4 PN (DeKosky *et al.*, 1982 ; Vicedomini *et al.*, 1986) ou à J7 PN (Ferguson *et al.*, 2001) présentaient un retard d'apprentissage de la localisation de la plateforme immergée à l'âge adulte. En revanche, les rats ayant subi une administration chronique de corticostérone (200 µg/mL dans l'eau de boisson) durant la période postnatale (de J1 à J21 PN), étaient plus rapides à embarquer sur la plateforme immergée lors de la réalisation du test à l'âge d'un mois, deux mois ou trois mois. A noter qu'aucune différence n'était observée dans le test de la plateforme visible (Catalani *et al.*, 1993 ; 2002). Il semblerait donc que les variations soient dépendantes du type de molécule et des modalités d'administration.

De plus, dans notre étude, les souris du groupe « corticostérone » étaient plus rapides à embarquer sur la plateforme visible et effectuaient un trajet plus court pour atteindre cette plateforme que les souris du groupe « contrôle ». Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat traité par corticostérone (250 µg/mL dans l'eau de boisson) de J5 à J9 PN ou de J13 à J17 PN lors du test de la plateforme visible réalisé à J21 PN (McCormick *et al.*, 2001). En parallèle dans notre étude, les aires primaire et secondaire du cortex visuel, essentielles à cette tâche, présentaient une augmentation d'activité métabolique chez les souris du groupe « corticostérone » par rapport à celle du groupe « contrôle ».

Dans le test de rétention qui évalue la mémorisation à long terme de la tâche, les souris du groupe contrôle ont passé plus de temps dans le bon cadran en comparaison à un temps théorique correspondant au temps passé dans le bon cadran de façon aléatoire. Ce n'était pas le cas pour les souris du groupe corticostérone. Ces résultats suggèrent que l'administration chronique de corticostérone durant la période postnatale n'altère pas les capacités d'apprentissage mais qu'elle aurait un impact sur la mémorisation spatiale d'une tâche.

L'absence de significativité intergroupe au niveau de la mémorisation indique que les capacités de mémorisation sont faiblement altérées. Il serait intéressant d'évaluer les souris à des âges plus tardifs afin de vérifier l'évolution de ce trouble et l'impact durable sur les facultés de mémorisation de la souris.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude comportementale montre que l'administration de corticostérone durant la période postnatale induit un changement de phénotype moteur qui s'inscrit et perdure à l'âge adulte suggérant des modifications morphologiques et neurochimiques du système nerveux central et plus précisément des structures de contrôle impliquées dans les différents tests évalués.

4. Impact d'une injection chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur la morphométrie cérébelleuse et hippocampique à l'âge adulte.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de la morphométrie cérébelleuse et hippocampique montrent que l'administration de corticostérone durant la période postnatale engendrerait des modifications dans le développement et l'organisation architectonique du cervelet et de l'hippocampe. Toutefois, on ne peut nier l'effet du comportement et plus particulièrement des deux derniers tests qui sont basés sur un apprentissage de plusieurs jours. En effet, une activité motrice peut induire des modifications morphologiques du cervelet ou du striatum. Par exemple, chez le rat, une tâche sensori-motrice augmente la synaptogénèse (Kleim *et al.*, 1998) et induit une hypertrophie des astrocytes dans le cortex cérébelleux (Kleim *et al.*, 2007). Une tâche sensori-motrice répétée peut aussi induire une augmentation du volume du cervelet chez le sujet sain (Ben-Soussan *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les corrélations entre les résultats morphométriques du cervelet et les résultats comportementaux ont permis de préciser l'implication de lobules spécifiques du cervelet dans des comportements moteurs et certaines fonctions cognitives requises pour des tests comportementaux. Des auteurs ont démontré qu'une augmentation du volume cérébelleux était positivement corrélée avec de meilleures performances sensori-motrices chez les patients présentant une atrophie spinocérébelleuse (Hernandez-Castillo *et al.*, 2016, 2017 ; Richter *et al.*, 2005 ; Selvadurai *et al.*, 2016) et chez les patients sains (Dimitrova *et al.*, 2008). Dans notre étude, l'augmentation de volume de crus II était corrélée à une augmentation des performances motrices dans le test du rotarod. Lors de ce test, la souris doit constamment adapter la vitesse d'exécution du mouvement à l'accélération progressive de la barre en rotation. Cette tâche pourrait donc requérir entre autres, certaines fonctions cognitives comme l'attention (capacité à être en alerte à son environnement), ou certaines fonctions exécutives (capacité à s'adapter au changement). Or Stoodley et Schmahmann (2010) ont montré que le lobe postérieur du cervelet et notamment le lobule crus II était activé durant l'exécution de tâches impliquant la mémoire de travail, les fonctions exécutives ou des tâches spatiales. Dans le test du rotarod, les performances des souris

traitées chroniquement à la corticostérone durant la période postnatale pourraient être liées à l'augmentation d'épaisseur de la couche moléculaire de crus II.

Ainsi, ces résultats démontrent que le phénotype moteur observé chez la souris traitée à la corticostérone pourrait refléter, au moins en partie, des modifications structurales et/ou biochimiques au sein du cervelet.

Par ailleurs, la diminution d'épaisseur de la couche granulaire du lobule simplex était corrélée négativement avec le nombre de mouvements horizontaux rapides mesuré dans l'actimètre réalisée à 3 mois. Des résultats similaires ont été rapportés chez les mutants cérébelleux ataxiques (Lalonde et Strazielle, 2017) et chez les rats présentant des diminutions du cortex cérébelleux induites par une exposition aux rayons-X de J8 à J15 PN ou de J12 à J15 PN (Pellegrino et Altman, 1979).

5. Effets d'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 PN sur l'activité métabolique régionale de l'encéphale à l'âge adulte.

Parmi les 105 régions de l'encéphale évaluées, des modifications de l'activité métabolique ont été observées chez les souris traitées à la corticostérone dans des structures bien précises. Une augmentation du métabolisme régional intéressait certaines régions en lien direct avec les tâches comportementales imposées aux animaux : l'hippocampe antérieur, les cortex visuels, le noyau vestibulaire latéral et aussi le noyau dentelé du cervelet sont des structures impliquées dans les apprentissages visuo-spatiaux et par conséquent, normalement activées dans les tests du rotarod et de la piscine de Morris. Les corrélations observées entre les performances sensori-motrices dans le test du rotarod et l'hypermétabolisme du gyrus denté de l'hippocampe postérieur et l'hypométabolisme de la couche granulaire du lobule simplex confirment l'implication de ces structures dans le test du rotarod. De plus, plusieurs études ont démontré l'implication du cervelet dans le test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris (Kennard *et al.*, 2011). En effet, la souris présentant un déficit dans la transmission nerveuse au niveau des cellules de Purkinje (knockout du gène codant pour les canaux sodiques) a des capacités d'apprentissage spatial moindres (Woodruff-Pak *et al.*, 2006). En revanche, les performances obtenues dans la plateforme visible n'étaient pas altérées suggérant que les défauts d'acquisition et de rétention de la mémoire spatiale sont indépendantes des déficits moteurs. Les mutants cérébelleux présentent aussi des déficits dans l'apprentissage (Lalonde et Strazielle, 2003a). Hilber *et al.* (1998) suggèrent que le cervelet n'était pas nécessaire à l'apprentissage d'une tâche spatiale mais avait un rôle crucial dans la rétention de la mémoire spatiale (mémoire à court terme). Les résultats obtenus dans notre étude sont donc concordants avec les données de la littérature.

Une hyperactivité était également observée au sein du système limbique, plus précisément de l'hippocampe (entre +7 et 12% en fonction de la région considérée) et de l'amygdale (entre +9 et +15%), deux régions impliquées dans les apprentissages, les émotions et l'anxiété, fonctions intervenant notamment dans le test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris (McGaugh *et al.*, 1996). Dans notre étude, les tests comportementaux ont été réalisés en fonction du degré d'anxiété qu'ils peuvent générer, un ordre croissant a été respecté. Le dernier test effectué, la piscine de Morris, était le test le plus anxiogène. L'hyperactivité neuronale des amygdales basale, latérale, centrale et corticale observée dans le groupe « corticostérone » suggère une hypersensibilité de ces structures à l'âge adulte lorsque l'animal est soumis à un test comportemental anxiogène.

L'intensité du marquage de la COX était également majorée au niveau des noyaux parabrachiaux impliqués dans les fonctions végétatives se projetant sur l'hippocampe et l'amygdale (Clark *et al.*, 2005).

Concernant le cortex cérébelleux, les mesures de densité de marquage effectuées dans plusieurs lobules : vermis IV/V, simplex, crus I, crus II et paramédian ont mis en évidence une augmentation de l'activité neuronale dans la couche moléculaire du lobule vermien IV/V alors que la couche granulaire du lobule simplex présentait une diminution de l'activité métabolique neuronale en lien possible avec l'épaisseur réduite de cette couche cellulaire mesurée préalablement sur les coupes colorées au crésyl violet. Les corrélations établies entre l'activité métabolique de ces deux lobules cérébelleux et les résultats comportementaux obtenus dans l'actimètre, le test du rotarod et la plateforme visible de la piscine de Morris témoignent du lien fonctionnel entre ces lobules cérébelleux et ces différents tests. Par ailleurs, ces résultats confirment l'implication du cervelet dans les fonctions motrices.

L'activité métabolique est principalement déterminée par l'activité synaptique afférente et efférente sur les régions-cibles, les synapses activatrices (de type glutamatergique) nécessitant une activité métabolique plus importante que les cellules inhibitrices (Wong-Riley, 1989). Les glucocorticoïdes agissent sur les synapses glutamatergiques, à la fois sur les récepteurs, la libération et l'élimination du glutamate (Popoli *et al.*, 2012). Notre étude a permis de démontrer que l'administration de corticostérone durant la période juvénile a un impact à long terme sur l'activité métabolique neuronale observée à l'âge adulte au sein de certaines régions de l'encéphale. Cet hypermétabolisme pourrait être la traduction de modifications pérennes de la transmission glutamatergique mise en place au cours du développement postnatal.

6. Evaluation de l'impact d'une administration chronique de corticostérone durant la période postnatale sur l'expression à long terme des gènes d'intérêt

Hormones du stress

Le dosage de corticostérone sérique a démontré que le taux basal de ce stéroïde était identique entre les deux groupes de souris adultes suggérant que les réponses aux différents stress induits par les tests comportementaux et par la mise à mort de l'animal effectuée après le dernier test de la plateforme visible de la piscine de Morris n'ont pas été altérées. Toutefois, dans l'hypothalamus les gènes codant pour la CRH, le CRH-R1 et les GR étaient surexprimés dans le groupe des souris traitées à la corticostérone indiquant que rétrocontrôle normalement effectué par les glucocorticoïdes sur l'hypothalamus pourrait être inactif ou défectueux bien que la surexpression du gène codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes laisse plutôt envisager une diminution du seuil de réponse au stress (ou hypersensibilité).

Dans l'hippocampe, les transcrits codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes étaient diminués. De façon similaire, une étude clinique a révélé une diminution de l'expression du gène codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe d'adultes victimes d'abus durant l'enfance (Labonté et Turecki, 2012). Comme l'hippocampe a un rôle majeur dans la régulation de l'activité de l'axe HPA en réponse au stress, la baisse des transcrits suggère un défaut de la régulation hippocampique sur l'axe HPA. Toutefois, le taux sérique de corticostérone étant similaire dans les deux groupes de souris, les altérations seraient spécifiques permettant ainsi par le biais d'effets compensatoires une sécrétion normale de corticostérone endogène. Ces résultats sont également à mettre en parallèle avec l'activité neuronale augmentée observée dans l'hippocampe et l'amygdale, deux structures participant directement à la régulation de l'axe HPA par le biais de rétrocontrôles respectivement négatifs et positifs.

La CRH jouant un rôle dans la plasticité synaptique et la potentialisation à long terme, une diminution de l'expression des gènes codant pour la CRH et son récepteur CRH-R1 dans l'hippocampe pourrait expliquer les résultats obtenus dans la rétention du test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine. A noter que les effets d'une injection de corticostérone durant la période postnatale s'inscrivent durablement puisque des modifications d'expression du gène codant pour CRH-R1 avaient déjà été observées chez les souris traitées à la corticostérone âgées de 15 jours.

Dans le cervelet des souris traitées, les gènes codant pour la CRH et les GR étaient surexprimés. Ces modifications témoigneraient de la vulnérabilité du cervelet à l'exposition d'un stress dans l'enfance. Dans cette structure, la CRH augmenterait l'excitabilité des cellules de Purkinje via trois mécanismes, 1) en potentialisant l'effet des neurotransmetteurs endogènes excitateurs comme le glutamate, 2) en bloquant l'effet des acides aminés inhibiteurs des cellules GABAergiques et 3) en

réduisant l'amplitude de la phase d'hyperpolarisation post-transmission (Ito, 2009 ; Bishop *et al.*, 2000). De plus, certaines études ont montré qu'une injection de CRH augmentait l'activité motrice (Howard et Granoff, 1968) tout comme l'injection d'un antagoniste non spécifique à la CRH, l'astressine, altérait la coordination locomotrice dans le test du rotarod (Bishop et King, 2013) suggérant ainsi le rôle de la CRH et de ses récepteurs dans la régulation de la coordination motrice. Harlé *et al.* (2017) ont obtenus des résultats similaires après injection de corticostérone. L'ensemble de ces études pourrait donc expliquer le phénotype moteur et plus précisément l'amélioration des performances motrices dans le test du rotarod chez nos souris traitées.

Par ailleurs, une surexpression de la CRH conduisait à une atrophie du cortex cérébelleux (Goebel *et al.*, (2010). La surexpression du gène codant pour la CRH chez nos souris traitées à la corticostérone pourrait être mise en parallèle avec la diminution d'épaisseur de 21% observée dans la couche granulaire du lobule simplex.

Protéines du cytosquelette

Dans l'hippocampe des souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale, l'expression du gène codant pour MAP2 n'était pas altérée alors que les transcrits NFL étaient diminués. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Zhao *et al.*, (2009). Ces auteurs avaient démontré qu'une injection chronique de corticostérone durant 16 jours induisait une diminution d'expression du gène codant pour NFL sans modification d'expression du gène codant pour MAP2, suggérant ainsi une sensibilité plus marquée de la protéine NFL aux glucocorticoïdes. De plus, Cereseto *et al.*, (2006) ont démontré qu'une atrophie des dendrites des cellules pyramidales de l'hippocampe était associée à une diminution de la transcription du gène codant pour MAP2. Dans notre étude, l'expression du gène de MAP2 n'est pas altérée, de même qu'aucune atrophie des régions hippocampiques CA1 et DG n'a été mise en évidence chez les souris du groupe corticostérone.

MAP2 intervient principalement dans la croissance en longueur (Teng *et al.*, 2001), la stabilité et la forme des dendrites (Derksen *et al.*, 2007). La protéine NFL, quant à elle, participe au maintien et à la régulation de la plasticité du cytosquelette en modulant la croissance du diamètre axonal et ainsi le transport axonal (Zhao *et al.*, 2009). Ces protéines étant impliquées dans la plasticité neuronale activée dans l'apprentissage et la mémorisation, la diminution d'expression de NFL pourrait expliquer le faible défaut de mémorisation à long terme observé dans le test de la piscine malgré la préservation des capacités d'apprentissage.

Plusieurs études (Zhao *et al.*, 2009 ; Cereseto *et al.*, 2006 ; Teng *et al.*, 2001) ont montré qu'un excès de glucocorticoïdes pouvait avoir des effets délétères sur l'expression des protéines du

cytosquelette aboutissant ainsi à une atteinte morphologique des dendrites, eux même responsables de l'atrophie et des altérations fonctionnelles de l'hippocampe. Le cervelet étant également une structure vulnérable aux glucocorticoïdes, les variations différentielles d'expression des gènes codant pour ces 2 protéines, MAP2 et NFL (augmentation du taux de transcrits de NFL et la diminution du taux de transcrits de MAP2) supposent des modifications architectoniques au sein du cervelet probablement induites par l'administration chronique de corticostérone durant la période de développement postnatale du cervelet.

Toutefois, il convient également de prendre en considération les effets des tests comportementaux moteurs et plus particulièrement des deux derniers tests, le rotarod et le test d'apprentissage visuo-spatial de la piscine de Morris, basés sur un apprentissage de plusieurs jours. Cet apprentissage moteur et visuo-spatial faisant appel à la plasticité neuronale, devrait donc modifier l'expression des protéines du cytosquelette.

Neurotrophines : BDNF et son récepteur TrkB

Les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale n'ont présenté dans l'hippocampe et le cervelet aucune modification d'expression du gène codant pour le BDNF suggérant ainsi que l'administration de corticostérone de J8 à J29 PN n'a pas d'effet délétère à long terme sur son expression.

Par ailleurs, cette absence intergroupe de modification dans l'expression de BDNF est à mettre en parallèle avec l'absence de comportement anxieux évident observée à l'âge adulte chez les souris du groupe « corticostérone ». En effet, plusieurs études ont montré par analyse *post mortem* que le taux de transcrits du BDNF dans l'hippocampe était diminué chez les patients dépressifs suicidaires (Karege *et al.*, 2005 ; Dwivedi *et al.*, 2006).

Récepteurs glutamatergiques : GluR δ 2

Chez la souris devenue adulte, aucune modification d'expression du gène codant pour le GluR δ 2 n'a été observée dans le cervelet chez les souris traitées à la corticostérone durant la période postnatale. Pourtant des études ont montré que ce récepteur était vulnérable à une exposition chronique de corticostérone (Popoli *et al.*, 2012).

Ce récepteur est normalement impliqué dans la transmission synaptique entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje. Dans notre étude, l'absence de modification d'expression du gène codant pour le GluR δ 2 suggère que la transmission synaptique entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje n'est pas perturbée comme en témoigne les performances motrices des souris dans les

tests comportementaux expertisant la coordination motrice et les capacités d'apprentissage de l'animal.

➤ CONCLUSION et PRESCRIPTIVES

L'administration de corticostérone est une méthode qui permet de mimer les effets d'une exposition à un stress en augmentant artificiellement le taux de glucocorticoïdes. Chez l'animal adulte, des taux supraphysiologiques de corticostérone ou un stress chronique sont souvent associés à un phénotype dépressif avec atteinte du système limbique, des troubles de la mémoire et un effondrement des marqueurs de la neuroplasticité. Chez l'animal en cours de développement, les glucocorticoïdes étant impliqués dans plusieurs phases de la mise en place tissulaire, des taux supraphysiologiques de corticostérone ou un stress chronique induisent des effets directs sur l'organisation architectonique du SNC mais aussi la maturation de l'axe HPA pouvant induire à long terme des troubles psychomoteurs (Pascual *et al.*, 2006 ; Noguchi *et al.*, 2011 ; Maloney *et al.*, 2011 ; Schmidt *et al.*, 2002).

Notre étude s'est intéressée à une fenêtre peu exploitée dans la littérature, notre but était plus particulièrement d'évaluer le développement du cervelet et de structures n'ayant pas terminé leur organisation tissulaire à la naissance. Ainsi notre fenêtre d'injection correspond à la période où l'acquisition sensori-motrice est prépondérante et les tests comportementaux utilisés ciblent tout particulièrement ces fonctions. Le volet émotionnel et dépressif n'a pas été spécifiquement évalué à l'âge adulte. Les tests comportementaux pour évaluer ce volet sont très anxiogènes et il aurait été très difficile de les associer à nos tests comportementaux moteurs sur une même population de souris sans induire de biais.

Afin d'être plus proche des études cliniques, nous aurions pu utiliser un modèle de stress différent, l'exposition à une odeur de prédateur, la séparation maternelle, ou encore l'isolement de l'animal. Le choix de la drogue est déterminé en fonction du but recherché (Demuyser *et al.*, 2016). La dexaméthasone est généralement utilisée en traitement aigu pour mimer la situation clinique d'injection de glucocorticoïdes lors d'une souffrance néonatale. Notre objectif était de créer un modèle de stress chronique d'intensité moyenne tel qu'il peut être constaté lors d'une maltraitance dans la petite enfance. Zhao *et al.* (2009) ont montré que 6 jours d'injection de corticostérone (20 mg/kg) avaient plutôt un effet antidépresseur alors qu'une administration chronique entre 18 et 36 jours induisait un comportement dépressif chez l'animal. Une autre étude menée chez le rat adulte, a montré que des symptômes dépressifs n'apparaissaient que pour des doses importantes

supérieures à 20 mg/kg (Gregus *et al.*, 2005). Notre choix de concentration de 20 mg/kg a été dicté par ces études, mais aussi par des expérimentations effectuées au laboratoire sur les effets de l'administration de corticostérone à cette concentration chez l'adulte en aigu, répétée pendant 6 jours (Harlé *et al.*, 2017) et en chronique pendant 21 jours (travaux non publiés).

Nous avons administré la corticostérone en sous-cutané au niveau cervical. Les études proposent différents modes d'administration, l'injection intrapéritonéale est réservée à des traitements aigus. Pour un traitement chronique, trois méthodes d'administration sont rapportées : l'injection quotidienne en sous-cutanée, l'apport de la drogue par l'eau de boisson, ou la pose d'un implant à libération prolongée. Une étude comparative entre ces différentes méthodes a démontré que par la méthode d'injection en sous-cutané, les animaux adultes ont présenté un taux sérique élevés de glucocorticoïdes durant toute la période de traitement alors que les animaux ayant été implantés avec une pastille de corticostérone ou ayant consommé une eau de boisson contenant de la corticostérone ont montré respectivement ou une augmentation transitoire ou aucune modification du taux sérique de glucocorticoïdes (Demuyser *et al.*, 2016 ; Kott *et al.*, 2016). De plus, seuls les injections de corticostérone ont induit un comportement dépressif chez l'animal (Kott *et al.*, 2016). C'est pourquoi dans notre étude, les injections de corticostérone de manière répétée et chronique ont été préférées aux deux autres méthodes d'administration. De plus, seule l'injection permet de connaître précisément la quantité de corticostérone délivrée pour chaque animal.

Des auteurs ont émis l'hypothèse qu'une expérience stressante durant l'enfance ou l'adolescence pourrait avoir des répercussions à l'âge adulte si elle survient durant une fenêtre temporelle de vulnérabilité autrement dit une période critique durant laquelle certaines structures du système nerveux central sont en développement ou en phase de maturation (Heim et Binder, 2012). La fenêtre temporelle utilisée pour notre traitement est peu exploitée dans la littérature et nous a permis de mettre en évidence des résultats importants :

1) Une dérégulation de l'axe HPA a été observée durant la phase d'administration, à l'identique des résultats obtenus chez l'adulte sous traitement chronique, sans effet persistant évident à l'âge adulte. Notre période d'injection correspond à un âge juvénile pour la souris. Dans la littérature, des études ont montré que des périodes plus précoces ou plus tardives durant l'adolescence et la puberté sont plus vulnérables aux effets de la corticostérone et plus à risque de développer un état dépressif à l'âge adulte (Lupien *et al.*, 2009 ; Patchev *et al.*, 2014).

2) Le traitement à la corticostérone a eu des effets directs sur l'organisation tissulaire, à l'échelle cellulaire, moléculaire et métabolique dans le cervelet et l'hippocampe, caractérisant un retard

de maturation qui n'évolue pas vers la normalité puisque certains effets perdurent à l'âge adulte.

Des variations de l'expression des gènes à cet âge suggèrent des modifications épigénétiques. Il est à noter que nous avons obtenu des variabilités interlobules dans l'étude morphométrique et neurochimique. Il serait judicieux d'analyser l'expression des différents gènes étudiés non plus sur le cervelet entier mais après microdissection sur les différents lobules cérébelleux impliqués dans les fonctions cognitives et motrices du cervelet.

Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer l'expression du gène codant pour la 11 β -hydroxysteroid déshydrogénase de type II dans le cervelet à J15 PN. Cette enzyme modère les effets pro-apoptotiques des glucocorticoïdes sur les précurseurs des futures cellules à grains et favorise leur survie (Heine *et al.*, 2011). A l'issue de leur migration, l'expression de la 11 β -HSD2 diminue, levant ainsi les effets inhibiteurs exercés sur les glucocorticoïdes endogènes. Ces derniers contribuent alors à l'élimination de la couche granulaire externe par des mécanismes d'apoptose. Des variations d'expression du gène codant pour cette protéine pourraient expliquer les variations d'épaisseurs des couches granulaires externe et interne observées dans les lobules simplex, paramédian et vermis IV/V à J15 et J29 PN chez la souris traitée à la corticostérone.

3) Une activité motrice augmentée apparaît en phase de traitement et persiste à l'âge adulte. Elle est associée à une augmentation des performances dans la coordination motrice. Notre fenêtre d'injection est donc favorable à la maturation des lobules moteurs dont la mise en place est concomitante à l'acquisition des fonctions motrices de base. Dans notre étude, concernant le phénotype moteur, aucun effet délétère n'a été mis en évidence. L'augmentation de l'activité motrice obtenue contribuerait plutôt à améliorer les performances motrices. Des études futures sont nécessaires pour préciser la nature neurochimique et neuroanatomique de cette hyperactivité.

Un aspect cognitif accompagne aussi les fonctions motrices plus élaborées comme la piscine de Morris. Notre fenêtre d'injection pourrait être défavorable à la maturation des lobules impliqués dans les fonctions cognitives du cervelet puisqu'une subtile diminution des performances cognitives a été observée. Toutefois, l'implication du cervelet ne peut être clairement identifiée étant données les modifications également observées dans la formation hippocampique. Une expertise à un âge plus avancé serait intéressante afin de suivre l'évolution de ces effets avec le vieillissement.

Plusieurs études cliniques et modèles animaux ont suggéré qu'une expérience traumatisante vécue précocement durant l'enfance ou l'adolescence représenterait un facteur de risque de développer une pathologie psychiatrique telle que des troubles de l'humeur, des troubles affectifs ou cognitifs (Tsankova *et al.*, 2007, Lupien *et al.*, 2009), ou un syndrome dépressif majeur (Heim et Binder, 2012). Cependant, certaines études cliniques ont montré que les effets d'une exposition précoce à un stress sont variables et certains patients font preuve de résilience même lorsqu'ils sont exposés à un nouveau stress à l'âge adulte. L'ensemble des résultats obtenus dans notre étude corroborent cette hypothèse selon laquelle un évènement stressant survenant durant le développement peut avoir des répercussions à l'âge adulte.

Le cervelet étant également impliqué dans la régulation des émotions, il aurait été judicieux d'inclure dans le protocole expérimental des tests comportementaux qui permettent d'évaluer ces fonctions, comme par exemple, des tests d'interactions sociales mais qui ne sont pas dans l'expertise du laboratoire. La région vermienne postérieure est principalement impliquée dans la modulation des émotions (Tavano *et al.*, 2007 ; Richter *et al.*, 2005 ; Aarsen *et al.*, 2004). Dans notre étude, la division en deux selon le plan sagittal médian de l'encéphale des souris adultes n'a malheureusement pas permis d'évaluer avec précision la morphométrie et l'activité métabolique régionale de cette région cérébelleuse qualifiée de cervelet limbique (Stoodley et Schmahmann, 2010). Des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer cet aspect du cervelet.

BIBLIOGRAPHIE

A

AARSEN F, DONGEN HV, PAQUIER P, MOURIK MV, CATSMAN-BERREVOETS C.

Long-term sequelae in children after cerebellar astrocytoma surgery.

Neurology 2004; 62: 1311–1316.

ACKERMANN H, MATHIAK K, RIECKER A.

The contribution of the cerebellum to speech production and speech perception: clinical and functional imaging data. Invited review.

Cerebellum. 2007; 6: 202–13.

ALALADE E, DENNY K, POTTER G, STEFFENS D, WANG L.

Altered cerebellar-cerebral functional connectivity in geriatric depression.

PLoS One. 2011; 6(5): 200-35.

ALEMAN A, HIJMAN R, DE HAAN EH, KAHN RS.

Memory impairment in schizophrenia: a meta-analysis.

Am J Psychiatry. 1999; 156(9): 1358–66.

ALTMAN J.

Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. III. The external granular layer and the transitional molecular layer.

J. Comp. Neur. 1972; 145:399-464.

ALTSHULER LL, ABULSEUD OA, FOLAND-ROSS L, BARTZOKIS G, CHANG S, MINTZ J, HELLEMANN G, VINTERS HV.

Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder.

Bipolar. Disord. 2010; 12: 541–549 (2010).

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION

Diagnostic and Statistical Manual of Medical Disorders.

5th Ed Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.

AN L, CAO QJ, SUI MQ, SUN L, ZOU QH, ZANG YF.

Local synchronization and amplitude of the fluctuation of spontaneous brain activity in attention deficit/hyperactivity disorder: a resting-state fMRI study.

Neurosci Bull. 2013; 29(5): 603–13.

ANDERSEN BB, PAKKENBERG B.

Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia.

Br J Psychiatry. 2003; 182: 354–61.

ANDREASEN NC, PIERSON R.

The role of the cerebellum in schizophrenia.

Biol Psychiatry. 2008; 64(2): 81–8.

ANDREASEN NC, CALARGE CA, O'LEARY DS.

Theory of mind and schizophrenia: a positron emission tomography study of medication-free patients.

Schizophr Bull. 2008; 34(4): 708–19.

ANDREASEN NC, O'LEARY DS, CIZADLO T, ARNDT S, REZAI K, PONTO LL.

Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry.
Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(18): 9985–90.

ARNOLD SE, LEE VM, GUR RE, TROJANOWSKI JQ.
Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 10850–10854.

B

BAILLIEUX H, DeSMET H, PAQUIER P, DeDEYN P, MARIEN P.
Cerebellar neurocognition: insights from the bottom of the brain.
Clinical Neurol NeuroSurg. 2008; 110: 763-773.

BALDACARA L, NERY-FERNANDES F, ROCHA M, QUARANTINI LC, ROCHA GG, GUIMARAES JL.
Is cerebellar volume related to bipolar disorder?
J Affect Disord. 2011; 135(13): 305–9.

BANASR M, VALENTINE GW, LI XY, GOURLEY SL, TAYLOR JR, DUMAN RS.
Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat.
Biol. Psychiatry. 2007; 62: 496–504.

BAO S, CHEN L, QIAO X, THOMPSON RF.
Transgenic brain-derived neurotrophic factor modulates a developing cerebellar inhibitory synapse.
Learn Mem. 1999; 6:276–283

BAQUET ZC, GORSKI JA, JONES KR.
Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor.
J Neurosci. 2004; 24(17): 4250–8.

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 Lond B Biol Sci. 2009; 364(1522): 1377–83.

BATH KG et PIMENTEL T.
Effect of early postnatal exposure to valproate on neurobehavioral development and regional BDNF expression in two strains of mice.
Epilepsy Behav. 2017; 70: 110-117.

BAUMAN ML et KEMPER TL.
Neuroanatomic observations of the brain in autism: A review and future directions.
Int. J. Dev. Neurosci. 2005; 23: 183–187.

BAYER SA et ALTMAN J.
Neurogenesis and neuronal migration.
In: Paxinos G. The rat nervous system, Academic Press San Diego, 1995; p1041-1077.

BEAUREGARD M, LEROUX JM, BERGMAN S, ARZOUMANIAN Y, BEAUDOIN G, BOURGOUIN P, STIP E.

The functional neuroanatomy of major depression: An fMRI study using an emotional activation paradigm.

Neuroreport 1998; 9: 3253–3258.

BEART PM et O'SHEA RD.

Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement.

Br. J. Pharmacol. 2007; 150: 5–17.

BECERRA LR, BREITER HC, STOJANOVIC M, FISHMAN S, EDWARDS A, COMITE AR, GONZALEZ RG, BORSOOK D.

Human brain activation under controlled thermal stimulation and habituation to noxious heat: An fMRI study.

Magnetic Resonance Med 1999; 41: 1044–1057.

BENESOVA O, PAVLIK A.

Brain glucocorticoid receptors and their role in behavioral teratogenicity of synthetic glucocorticoids.

Arch Toxicol Suppl. 1985; 8: 73-76.

BENESOVA O, PAVLIK A.

Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain.

Neuropharmacology. 1989; 28(1): 89-97.

BEN-SOUSSAN TD, PIERVINCENZI C, VENDITTI S, VERDONE L, CASERTA M, CARDUCCI F.

Increased cerebellar volume and BDNF level following quadrato motor training.

Synapse. 2015; 69: 1-6.

BISAGNO V, FERRINI M, RIOS H, ZIEHER LM, WIKINSKI SI.

Chronic corticosterone impairs inhibitory avoidance in rats: possible link with atrophy of hippocampal CA3 neurons.

Pharmacol Biochem Behav. 2000; 66: 235–240.

BISHOP GA et KING JS.

Modulatory role of neuropeptides in the cerebellum.

In MANTO M, GRUOL DL, SCHMAHMANN JD, KOIBUCHI N, ROSSI F Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders, Springer Science+Business Media Dordrecht 2013.

BISHOP GA, SEELANDT CM, KING JS.

Cellular localization of corticotropin releasing factor receptors in the adult mouse cerebellum.

Neuroscience. 2000; 101 (4): 1083-92.

BLANPIED TA, EHLERS MD.

Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease.

Biol. Psychiatry. 2004; 55: 1121–1127.

- BLEDSON JC, SEMRUD-CLIKEMAN M, PLISZKA SR.
Neuroanatomical and neuropsychological correlates of the cerebellum in children with attention deficit/hyperactivity disorder – combined type.
J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2011; 50(6): 593–601.
- BOLAM JP.
Experimental Neuroanatomy. A practical approach.
In The Practical Approach series. Rickwood D and Hames D, eds. Oxford University Press 1992.
- BOHN MC et LAUDER JM.
Cerebellar granule cell genesis in the hydrocortisone-treated rats.
Dev Neurosci. 1980; 3: 81-89.
- BORGHESANI PR, PEYRIN JM, KLEIN R, RUBIN J, CARTER AR, SCHWARTZ PM, LUSTER A, CORFAS G, SEGAL RA.
BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells.
Development. 2002; 129: 1435–1442.
- BORSOOK D, MOULTON EA, SCHMIDT KF, BECERRA LR.
Neuroimaging revolutionizes therapeutic approaches to chronic pain.
Mol Pain. 2007; 3:25.
- BOSMAN LW, HARTMANN J, BARSKI JJ, LEPIER A, NOLL-HUSSONG M, REICHARDT LF, KONNERTH A.
Requirement of TrkB for synapse elimination in developing cerebellar Purkinje cells.
Brain Cell Biol. 2006; 35(1): 87-101.
- BRABHAM T, PHELKA A, ZILLER C, NASH A, LOPEZ JF, VASQUEZ DM.
Effects of prenatal dexamethasone on spatial learning and response to stress is influenced by maternal by maternal factors.
Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol. 2000; 279: R1899-R1909.
- BRAMBILLA P, BARALE F, CAVERZASI E, SOARES JC.
Anatomical MRI findings in mood and anxiety disorders.
Epidemiol Psichiatr Soc. 2002; 11(2): 88–99.
- BRIDGES N, SLAIS K, SYKOVA E.
The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers: a comparison of male and female Wistar rats.
Acta Neurobiol. Exp. 2008 ; 68 : 131–138.
- BROADBELT K, BYNE W, JONES LB.
Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex.
Schizophr. Res. 2002; 58: 75–81.
- BUGALHO P, CORREA B, VIANA-BAPTISTA M.
Role of the cerebellum in cognitive and behavioural control: scientific basis and investigation models.
Acta Med Port. 2006; 19(3): 257–67.

C

CAMPBELL S. et MACQUEEN G.

The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression.

J. Psychiat. Neurosci. 2004; 29: 417–426.

CAMPBELL S, MARRIOTT M, NAHMIAS C, MACQUEEN GM.

Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis.

Am J Psychiatry. 2004; 161: 598-607.

CARTER AR, CHEN C, SCHWARTZ PM, SEGAL RA.

Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure.

J Neurosci. 2002; 22(4): 1316-1327.

CASTELLANOS FX, LEE PP, SHARP W, JEFFRIES NO, GREENSTEIN DK, CLASEN LS.

Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder.

JAMA. 2002; 288(14): 1740–8.

CASTREN E

Is mood chemistry?

Nat. Rev. Neurosci. 2005 ; 6: 241–246.

CATALANI A, MARINELLI M, SCACCIANOCE S, NICOLAI R, MUSCOLO LA, KORANYI L, PIAZZA PV, ANGELUCCI L.

Progeny of mothers drinking corticosterone during lactation has lower stress-induced corticosterone secretion and better cognitive performance.

Brain Res. 1993; 624: 209-215.

CATALANI A, CASOLINI P, SCACCIANOCE S, PATACCHIOLO FR, SPINOZZI P, ANGELUCCI L.

Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny.

Neuroscience. 2000; 100(2): 319-325.

CATALANI A, CASOLINI P, CIGLIANA G, SCACCIANOCE S, CONSOLI C, CINQUE C, ZUENA AR, ANGELUCCI L.

Maternal corticosterone influences behavior, stress response and corticosteroid receptors in the female rat.

Pharmacol Biochem Behav. 2002; 73(1): 105-114.

CATANIA MV, BELLOMO M, GIORGI-GEREVINI V, SEMINARA G, GIUFFRIDA R, ROMEO R, DE BLASI A, NICOLETTI F.

Endogenous activation of group-I metabotropic glutamate receptors is required for differentiation and survival of cerebellar Purkinje cells.

J Neurosci. 2001; 21: 7664-7673.

CECI C, MELA V, MACRI S, MARCO EM, VIVEROS MP, LAVIOLA G.

Prenatal corticosterone and adolescent URB597 administration modulate emotionality and CB1 receptor expression in mice.

Psychopharmacology. 2014; 231(10): 2131-2144.

CELLERINO A, MAFFEI L, DOMENICI L.

The distribution of brain-derived neurotrophic factor and its receptor *trkB* in parvalbumin-containing neurons of the rat visual cortex.

Eur. J. Neurosci. 1996; 8, 1190-1197.

CERESETO M, REINES A, FERRERO A, SIFONIOS L, RUBIO M, WIKINSKI S.

Chronic treatment with high doses of corticosterone decreased cytoskeletal proteins in the rat hippocampus.

Eur J Neurosci. 2006; 24: 3354-3364.

CERQUEIRA JJ, PEGO JM, TAIPA R, BESSA JM, ALMEIDA OF, SOUSA N.

Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors.

J Neurosci. 2005; 25: 7792-7800.

CESA R, MORANDO L, STRATA P.

Glutamate receptor $\delta 2$ subunit in activity-dependent heterologous synaptic competition.

J Neurosci. 2003; 23: 2363-2370.

CHAO MV.

Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways.

Nat Rev Neurosci. 2003; 4(4): 299-309.

CHAO MV, RAJAGOPAL R, LEE FS.

Neurotrophin signalling in health and disease.

Clinical Sci. 2006; 110: 167-173.

CHEN AL, ZANG K, MASLIAH E, REICHARDT LF.

Glutamatergic axon-derived BDNF controls GABAergic synaptic differentiation in the cerebellum.

Sci Rep. 2016; 6: 1-13.

CHEN YL, TU PC, LEE YC, CHEN YS, LI CT, SU TP.

Resting-state fMRI mapping of cerebellar functional disconnections involving multiple large-scale networks in patients with schizophrenia.

Schizophr Res. 2013; 149(1-3): 26-34.

CHEN AI, NGUYEN CN, COPENHAGEN DR, BADUREK S, MINICHELLO L, RANSCHT B, REICHARDT LF.

TrkB (tropomyosin-related kinase B) controls the assembly and maintenance of GABAergic synapses in the cerebellar cortex.

J Neurosci. 2011; 31: 2769-2780.

CHOO M, MIYAZAKI T, YAMAZAKI M, KAWAMURA M, NAKAZAWA T, ZHANG J, TANIMURA A, UESAKA N, WATANABE M, SAKIMURA K, KANO M.

Retrograde BDNF to *TrkB* signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum.

Nat Commun. 2017; 8(1): 195.

CLARK DL, BOUTROS NN et MENDEZ MF.

The brain and behavior: an introduction to behavioral neuroanatomy.
Cambridge University Press, New-York, 2005.

CONTARINO A, DELLU F, KOOB GF, SMITH GW, u K, VALE WW, GOLD LH.

Dissociation of locomotor activation and suppression of food intake induced by CRF in CRFR1-deficient mice.
Endocrinology. 2000; 141(7): 2698-2702.

COPPELL A, PEI Q, ZETTERSTRON TSC.

Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment.
Neuropharmacology. 2003 ; 44:903–910.

COURCHESNE E, YEUNG-COURCHESNE R, PRESS G, HESSELINK J, JERNIGAN T.

Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism.
New Eng. J. Med. 1988; 318: 1349–1354.

CRESPO-FACORRO B, BARBADILLO L, PELAYO-TERAN JM, RODRIGUEZ-SANCHEZ JM.

Neuropsychological functioning and brain structure in schizophrenia.
Int Rev Psychiatry. 2007; 19(4): 325–36.

D

DAKINE N, OLIVIER C, GRINO M.

Effects of experimental hypothyroidism on the development of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rat.
Life Sci. 2000; 67: 2827-2844.

DARCET F, MENDEZ-DAVID I, TRITSCHLER L, GARDIER AM, GUILLOUX JP, DAVID DJ.

Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression.
Front Behav Neurosci. 2014; 8: 136.

DE FILIPPIS B, RICCIERI L, FUSO A, LAVIOLA G.

Neonatal exposure to low dose corticosterone persistently modulates hippocampal mineralocorticoid receptor expression and improves locomotor/exploratory behavior in a mouse model of Rett syndrome.
Neuropharmacology. 2013; 68: 174-183.

DEAN C, LIU H, DUNNING FM, CHANG PY, JACKSON MB, CHAPMAN ER.

Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release.
Nat Neurosci. 2009; 12: 767–776.

DEHMELT, L et HALPAIN, S.

The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins.
Genome Biol. 2005; 6: 204.

DEKOSKY ST, NONNEMAN AJ, SCHEFF SW.

Morphologic and behavioral effects of perinatal glucocorticoid administration.
Physiol Behav. 1982; 29: 895-900.

DEMUYSER T, DENEYER L, BENTE A, ALBERTINI G, VAN LIEFFERINGE J, MERCKX E, De PRINS A, De BUNDEL D, MASSIE A, SMOLDERS I.

In-depth behavioral characterization of the corticosterone mouse model and the critical involvement of housing conditions.

Physiol Behav. 2016; 156: 199-207.

DERKSEN MJ, WARD NL, HARTLE KD, IVANCO L.

MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis.

NeuroBiol Learn Mem. 2007; 87: 404-415.

DIAS B, BANERJEE SB, DUMAN RS, VAIDYA VA.

Differentiation regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain.

Neuropharmacology. 2003 ; 45: 553–563.

DIMITROVA A, GERWIG M, BROL B, GIZEWSKI ER, FORSTING M, BECK A, AURICH V, KOLB FP, TIMMANN D.

Correlation of cerebellar volume with eyeblink conditioning in healthy subjects and in patients with cerebellar cortical degeneration.

Brain Res. 2008; 1198: 73-84.

DI STEFANO G, CASOLI T, FATTORETTI P, BALIETTI M, GROSSI Y, GIORGETTI B, BERTONI-FREDDARI C.

Level and distribution of microtubule-associated protein 2 (MAP2) as an index of dendritic structural dynamics.

Rejuven. Res. 2006; 9: 94–98.

DOYA K.

Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control.

Curr Opin Neurobiol. 2000; 10(6):732–9.

DREVETS WC.

Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression.

Prog Brain Res. 2000; 126: 413–31.

DUMAN R.

Depression: A case of neuronal life and death?

Biol Psychiatry. 2004; 56: 140 –145.

DUMAN EA et CANLI T.

Influence of life stress, 5-HTTLPR genotype, and SLC6A4 methylation on gene expression and stress response in healthy Caucasian males.

Biol Mood Anxiety Disord. 2015; 5: 2.

DUMAN RS et MONTEGGIA LM.

A neurotrophic model for stress-related mood disorders.

Biol Psychiatry. 2006; 59(12): 1116-1127.

DUNN HG et MACLEOD PM.
Rett syndrome: review of biological abnormalities.
Can J Neurol Sci. 2001; 28(1): 16–29.

DUVERNOY HM.
The human brainstem and cerebellum.
New-York: Springer-Verlag; 1995.

DWIVEDI Y, RIZAVI HS et PANDEY GN.
Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone.
Neuroscience. 2006; 139 (3): 1017-1029.

E

EHRMANN O, MANSOUR R et JACQUART G.
A micrometric and cytophometric study of the simultaneous development of the cerebellar cortex and dental function in the rat during the early postnatal period.
Arch. Oral Biol. 1984; 29(6): 407-411

F

FATEMI SH, FOLSOM TD, ROONEY RJ, THURAS PD.
Expression of GABAA alpha2-, beta1- and epsilon-receptors are altered significantly in the lateral cerebellum of subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder.
Transl Psychiatry. 2013; 3: 303.

FELSZEGHY K, SASVÁRI M, NYAKAS C.
Behavioral depression: opposite effects of neonatal dexamethasone and ACTH-(4-9) analogue (ORG 2766) treatments in the rat.
Horm Behav. 1993; 27(3): 380-396.

FERGUSON SA, PAULE MG, HOLSON RR.
Neonatal dexamethasone on day 7 in rats causes behavioral alterations reflective of hippocampal, but not cerebellar, deficits.
Neurotoxicol Teratol. 2001; 23(1): 57-69.

FERGUSON SA et HOLSON RR.
Neonatal dexamethasone on day 7 causes mild hyperactivity and cerebellar stunting.
Neurotoxicol Teratol. 1999; 21(1): 71-76.

FLAGEL SB, VAZQUEZ DM, WATSON SJ Jr, NEAL CR Jr.
Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 282: 55-63.

FLÜGGE G, SCHNIEWIND A, FUCHS E.
The corticosterone receptive system in the brain of *Tupaia belangeri* visualized in vivo autoradiography.
Exp Brain Res. 1988, 72: 417-24.

FUCHS, E.

Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder.

CNS Spectr. 2005; **10** : 182–190.

G

GARZA A, HA TG, CHEN MJ, RUSSO-NEUSTADT AA.

Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain.

Pharmacol Biochem Behav. 2004; 77:209 –220.

GERVASONI N, AUBRY JM, BONDOLFI G, OSIEK C, SCHWALD M, BERTSCHY G, KAREGE F.

Partial normalization of serum brain derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode.

Neuropsychobiology. 2005; 51: 234-238.

GILAD GM, GILAD VH, WYATT RJ, TIZABI Y.

Region-selective stress-induced increase of glutamate uptake and release in rat forebrain.

Brain. Res. 1990; 525 : 335–338.

GOEBEL M, FLEMING SM, MILLION M, STENGEL A, TACHE Y, WANG L.

Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions.

J Neurosci. 2010, 473: 11-5.

GONZALEZ MI.

Brain-derived neurotrophic factor promotes gephyrin protein expression and GABA receptor clustering in immature cultured hippocampal cells.

Neurochem Int. 2014; 72: 14–21.

GONZALES-LIMA F et JONES D.

Quantitative mapping of cytochrome oxidase activity in the central auditory system of the gerbil: a study with calibrate activity standards and metal-intensified histochemistry.

Brain Res. 1994; 660: 34-39.

GOULD E, WOOLLEY CS, McEWEN BS.

Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I Effects of glucocorticoids on cell death.

J Comp Neurol. 1991; 313(3): 486-93.

GOUNKO NV, SWINNY JD, KALICHARAN D, JAFARI S, CORTEEN N, SEIFI M, BAKELS R, VAN DER WANT JJ.

Corticotrophin-releasing factor and urocortin regulate spine and synapse formation: structural basis for stress-induced neuronal remodeling and pathology.

Mol Psychiatry. 2013, 18 (1): 86-92.

GOUNKO NV, KALICHARAN D, RYBAKIN V, GRAAMSBERGEN A, Van der WANT JLL.

The dynamic developmental localization of the full-length corticotropin-releasing factor receptor type 2 in rat cerebellum.

Eur J Neurosci. 2006; 23: 3217-3224.

GOUNKO NV, RYBAKIN V, KALICHARAN D, SISKOVA Z, GRAMSBERGEN A, VAN DER WANT JJ.
CRF and urocortin differentially modulate GluRdelta2 expression and distribution in parallel fiber-
Purkinje cell synapses.
Mol Cell Neurosci. 2005; 30(4): 513-22.

GOTOW T.
Neurofilaments in health and disease.
Med. Electron. Microsc. 2000; 33: 173–199.

GOTTWALD B, MIHAJLOVIC Z, WILDE B, MEHDORN HM.
Does the cerebellum contribute to specific aspects of attention?
Neuropsychologia. 2003; 41(11): 1452–60.

GRAEFF FG.
Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.
Rev Bras Psychiatr. 2007; 29(1):S3–6.

GREGUS A, WINTINK AJ, DAVIS AC, KALYNCHUK LE.
Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like
behavior in male rats.
Behavior. Brain Res. 2005; 156:105-114.

GUNDEL H, O'CONNOR MF, LITTRELL L, FORT C, LANE RD.
Functional neuroanatomy of grief: An fMRI study.
Am J Psychiatry 2003; 160: 1946–1953.

GUO W, LIU F, XUE Z, GAO K, LIU Z, XIAO C.
Abnormal resting-state cerebellar-cerebral functional connectivity in treatment-resistant
depression and treatment sensitive depression.
Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013; 44: 51–7.

GUO WB, LIU F, CHEN JD, GAO K, XUE ZM, XU XJ.
Abnormal neural activity of brain regions in treatment-resistant and treatment-sensitive major
depressive disorder: a resting-state fMRI study.
J Psychiatr Res. 2012; 46(10): 1366–73.

H

HADDARA MA et NOOREDDIN MA.
A quantitative study on the postnatal development of the cerebellar vermis of mouse.
J. Compar. Neurol. 1966; 128(2).

HANSSON AC, SOMMER W, RIMONDINI R, ANDBJER B, STRÖMBERG I, FUXE K.
c-fos reduces corticosterone-mediated effects on neurotrophic factor expression in the rat
hippocampal CA1 region.
J Neurosci. 2003; 23: 6013-6022.

HARLE G, LALONDE R, FONTE C, ROPARS A, FRIPPIAT JP, STRAZIELLE C.
Repeated corticosterone injections in adult mice alter stress hormonal receptor expression in the
cerebellum and motor coordination without affecting spatial learning.
Behav Brain Res. 2017; 326: 121-131.

HASHIMOTO K, ISCHIKAWA R, KITAMURA K, WATANABE M, KANO M.
Translocation of a “winner” climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of “losers” from the soma in developing cerebellum.
Neuron. 2009; 63(1): 106-18.

HASHIMOTO K, YOSHIDA T, SAKIMURA K, MISHINA M, WATANABE M, KANO M.
Influence of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber-Purkinje cell synapses in the cerebellum.
Neuroscience. 2009; 162(3): 601-11.

HASHIMOTO K et KANO M.
Synapse elimination in the developing cerebellum.
Cell Mol Life Sci. 2013; 70(24): 4667-80.

HASHIMOTO K, ICHIKAWA R, TAKECHI H, INOUE Y, AIBA A, SAKIMURA K, MISHINA M, HASHIKAWA T, KONNERTH A, WATANABE M, KANO M.
Roles of glutamate receptor δ 2 subunit (GluR δ 2) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fibre synapse elimination during postnatal cerebellar development.
J Neurosci. 2001; 21: 9701–9712.

HEIM C and BINDER EB.
Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics.
Exp Neurol. 2012; 233: 102–111.

HEINE VM, GRIVEAU A, CHAPIN C, BALLARD PL, CHEN JK, ROWITCH DH.
A small-molecule smoothed agonist prevents glucocorticoid-induced neonatal cerebellar injury.
Sci Transl Med. 2011; 3(105): 105.

HERKENHAM M et NAUTA WJ.
Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem.
J. Comp. Neurol. 1977; 173, 123–146.

HERNANDEZ-CASTILLO CR, DIAZ R, CAMPOS-ROMO A, FERNANDEZ-RUIZ J.
Neural correlates of ataxia severity in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease.
Cerebellum & Ataxias. 2017; 4: 7.

HERNANDEZ-CASTILLO CR, GALVEZ V, DIAZ R, FERNANDEZ-RUIZ J.
Specific cerebellar and cortical degeneration correlates with ataxia severity in spinocerebellar ataxia type 7.
Brain Imaging Behav. 2016; 10: 252-257.

HILBER P, JOUEN F, DELHAYE-BOUCHAUD N, MARIANI J, CASTON J.
Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in learning and retention of a spatial task: studies in intact and cerebellectomized Lurcher mutant mice.
Behav. Genet. 1998 ; 28 : 299–308.

HOLMES MC, SANGRA M, FRENCH KL, WHITTLE IR, PATERSON J, MULLINS JJ, SECKL JR.
11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 protects the neonatal cerebellum from deleterious effects of glucocorticoids.
Neuroscience. 2006; 137: 865-873.

HOLSBOER F et ISING M.
Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy.
Annu Rev Psychol. 2010; 61: 81–109, C1–11.

HOLSBOER F.
The corticosteroid receptor hypothesis of depression.
Neuropsychopharmacology, 2000 ; 23 : 477–501.

HOWARD E et GRANOFF DM
Increased voluntary running and decreased motor coordination in mice after neonatal corticosterone implantation.
Exp Neurol. 1968; 22: 661-673.

HUANG EJ. et REICHARDT LF.
Trk receptors: roles in neuronal signal transduction.
Annu. Rev. Biochem. 2003; 72 : 609-642.

I

ICHIKAWA R, HASHIMOTO K, MIYAZAKI T, UCHIGASHIMA M, YAMASAKI M, AIBA A, KANO M, WATANABE M.
Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination.
Proc Natl Acad Sci USA. 2016; 113(8): 2282-7.

ICHIKAWA R, SAKIMURA K, WATANABE M.
Glud2 endows parallel fiber-Purkinje cell synapses with a high regenerative capacity.
J Neurosci. 2016; 36(17): 4846-58.

ICHIKAWA R, MIYAZAKI T, KANO M, HASHIKAWA T, TATSUMI H, SAKIMURA K, MISHINA M, INOUE Y, WATANABE M.
Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor $\delta 2$.
J Neurosci. 2002; 22, 8487–8503.

ILG W, GIESE MA, GIZEWSKI ER, SCHOCH B, TIMMANN D.
The influence of focal cerebellar lesions on the control and adaptation of gait.
Brain. 2008; 131: 2913–2927.

ITO M.
Functional roles of neuropeptides in cerebellar circuits.
Neuroscience. 2009, 162: 666-72.

ITO M.
A new physiological concept on cerebellum.
Rev Neurol. 1990; 146: 564-9.

ITO M.

The cerebellum and neural control.
Parven Press, New-York, 1984.

J

JACQUART C, MAHLER P, KACHANI-MANSOUR R.

Growth of trigemino-cerebellar areas in infant rat studied by micrometric and cytophotometric methods.
Arch. Oral Biol. 1986; 31(9): 573-576.

JALEWA J, WONG-LIN K, MCGINNITY TM, PRASAD G, HÖLSCHER C.

Increased number of orexin/hypocretin neurons with high and prolonged external stress-induced depression.
Behav Brain Res. 2014; 272: 196-204.

JEONG YG, CHUNG SH, KIM CT, HAN SY, HYUN BH, LEE NS, SAWADA K, WON MH, FUKUINY.

Corticotropin-releasing factor immunoreactivity increases in the cerebellar climbing fibers in the novel ataxic mutant mouse, pogo.
Anat. Histol. Embryol. 2006; 35: 111–116.

JOHNSON EM, CRAIG ET, et YEH HH.

TrkB is necessary for pruning at the climbing fibre-Prukinje cell synapse in the developing murine cerebellum.
J Physiol. 2007; 582(2): 629-646.

JOHNSON SA, FOURNIER NM, KALYNCHUK LE.

Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor.
Behav Brain Res. 2006; 168(2): 280-8.

JULIEN JP.

Neurofilament functions in health and disease.
Curr. Opin. Neurobiol. 1999; 9: 554–560.

JURJUS GJ, WEISS KM, JASKIW GE.

Schizophrenia-like psychosis and cerebellar degeneration.
Schizophr Res. 1994; 12(2): 183–4.

K

KAKIZAWA S, YAMASAKI M, WATANABE M, KANO M.

Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum.
J Neurosci. 2000; 20(13): 4954-61.

KANG H et SCHUMAN EM.

Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus.
Science. 1995; 267: 1658-1662.

KAUFMANN WE, MACDONALD SM, ALTAMURA CR.

Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: an immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome.

Cereb. Cortex. 2000; 10: 992–1004.

KAREGE F, VAUDAN G, SCHWALD M, PERROUD N, LA HARPE R.

Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of ante mortem diagnosis and psychotropic drugs.

Brain Res Mol Brain Res. 2005; 136: 29-37.

KASHIWABUCHI N, IKEDA K, ARAKI K, HIRANO T, SHIBUKI K, TAKAYAMA C, INOUE Y, KUTSUWADA T, YAGI T, KANG Y, AIZAWA S, MISHINA M.

Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluRdelta2 mutant mice.

Cell. 1995; 81: 245–252.

KENNARD JA et WOODRUFF-PAK D.

Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice.

Front. Aging Neurosci. 2011; 3:9.

KETTER TA, KIMBRELL TA, GEORGE MS, DUNN RT, SPEER AM, BENSON BE.

Effects of mood and subtype on cerebral glucose metabolism in treatment-resistant bipolar disorder.

Biol Psychiatry. 2001; 49(2): 97–109.

KIM D, CHO HB, DAGER SR, YURGELUN-TODD DA, YOON S, LEE JH.

Posterior cerebellar vermal deficits in bipolar disorder.

J Affect Disord. 2013; 150(2): 499–506.

KIM K, LEE SG, KEGELMAN TP, SU ZZ, DAS SK, DASH R, DASGUPTA S, BARRAL PM, HEDVAT M, DIAZ P, REED JC, STEBBINS JL, PELLECCIA M, SARKAR D, FISHER PB.

Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics.

J. Cell. Physiol. 2011; 226: 2484–2493.

KIMBRELL TA, KETTER TA, GEORGE MS, LITTLE JT, BENSON BE, WILLIS MW.

Regional cerebral glucose utilization in patients with a range of severities of unipolar depression.

Biol Psychiatry. 2002; 51(3): 237–52.

KING JS and BISHOP GA.

The distribution and cellular localization of CRF-R1 in the vermis of postnatal mouse cerebellum.

Experimental Neurology. 2002, 178: 175-185.

KING JS, MADTES JRP, BISHOP GA, OVERBECK TL.

The distribution of corticotropin-releasing factor (CRF), CRF binding sites and CRF1 receptor mRNA in the mouse cerebellum.

Prog Brain Res. 1997; 114, 55–66.

- KLEIM JA, MARKHAM JA, VIJ K, FREESE JL, BALLARD DH, GREENOUGH WT.
Motor learning induces astrocytic hypertrophy in the cerebellar cortex.
Behav Brain Res. 2007; 178: 244-249.
- KLEIM JA, SWAIN RA, ARMSTRONG KA, NAPPER RM, JONES TA, GREENOUGH WT.
Selective synaptic plasticity within the cerebellar cortex following complex motor skill learning.
Neurobiol Learn Mem. 1998 69: 274-289.
- KLEIN R, SMEYNE RJ, WURST W, LONG LK, AUERBACH BA, JOYNER AL, BARBACID M.
Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death.
Cell. 1993; 75: 113–122.
- KNABLE MB, BARCI BM, WEBSTER MJ, MEADOR-WOODRUFF J, TORREY EF.
Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium.
Mol Psychiatry. 2004; 9: 609-620.
- KONARSKI JZ, MCINTYRE RS, GRUPP LA, KENNEDY SH.
Is the cerebellum relevant in the circuitry of neuropsychiatric disorders?
J Psychiatry Neurosci. 2006; 30(3): 178–86.
- KONCZAK J, SCHOCH B, DIMITROVA A, GIZEWSKI E, TIMMANN D.
Functional recovery of children and adolescents after cerebellar tumor resection.
Brain. 2005; 128: 1428–1441.
- KORTE M, GRIESBECK O, GRAVEL C, CARROLL P, STAIGER V, THOENEN H, BONHOEFFER T.
Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 12547-12552.
- KUMAMARU E, NUMAKAWA T, ADACHI N, YAGASAKI Y, IZUMI A, NIYAZ M, KUDO M, KUNUGI H.
Glucocorticoid prevents brain derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase.
Mol. Endocrinol. 2008; 22: 546-558.
- KURIHARA H, HASHIMOTO K, KANO M, TAKAYAMA C, SAKIMURA K, MISHINA M, INOUE Y, WATANABE M.
Impaired parallel fiber-Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta2 subunit.
J Neurosci. 1997; 17: 9613–9623.
- KWONG WH, CHAN WY, LEE KK FAN M, YEW DT.
Neurotransmitters, neuropeptides and calcium binding proteins in developing human cerebellum: a review.
Histochem J. 2000; 32: 521-534.

L

LABONTE B et TURECKI G.

Epigenetic: a link between environment and genome.

Rev Santé Mental Québec. 2012; 37(2): 31-44.

LAI DI C, D'ALBIS MA, WESSA M, LINKE J, PHILLIPS ML, DELAVEST M.

Cerebellar volume in schizophrenia and bipolar I disorder with and without psychotic features.

Acta Psychiatr Scand. 2015; 131(3): 223–33.

LALONDE R et STRAZIELLE C.

Neuroanatomical pathways underlying the effects of hypothalamo-hypophysial-adrenal hormones on exploratory activity.

Rev. Neurosci. 2017; 28(6): 617-648.

LALONDE R et STRAZIELLE C.

Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry.

Brain Res. 2007; 1140: 51-74.

LALONDE R et STRAZIELLE C.

PS1 knockin mice the Japanese I213T mutation: effects on exploratory activity, motor coordination and spatial learning.

Behav. Brain. Res. 2005; 162(2): 182-90.

LALONDE R, HAYZOUN K, SELIMI F, MARIANI J, STRAZIELLE C.

Motor coordination in mice with hotfoot, Lurcher, and double mutations of the Grid2 gene encoding the delta-2 excitatory amino acid receptor.

Physiol Behav. 2003; 80(2-3): 333-9.

LALONDE R.

The neurobiological basis of spontaneous alternation.

Neuroscience Biobehav. Rev. 2002; 26(1): 91-104.

LANDGREBE M, MARIENHAGEN J, LANGGUTH B, SAND P, EICHHAMMER P, HAJAK G.

Cerebellar and thalamic metabolic changes visualized by [18]-FDG-PET in olanzapine-induced acute akathisia.

Neuro Endocrinol Lett. 2006; 27(6): 737–9.

LANE RD, REIMAN EM, BRADLEY MM, LANG PJ, AHERN GL, DAVIDSON RJ, SCHWARTZ GE.

Neuroanatomical correlates of pleasant and unpleasant emotion.

Neuropsychologia 1997; 35: 1437–1444.

LANDSEND AS, AMIRY-MOGHADDAM M, MATSUBARA A, BERGERSEN L, USAMI S, WENTHOLD RJ, OTTERSEN OP.

Differential localization of delta glutamate receptors in the rat cerebellum: coexpression with AMPA receptors in parallel fiber-spine synapses and absence from climbing fiber-spine synapses.

J Neurosci. 1997; 17: 834–842.

LARSELL O et JANSEN J.

The comparative anatomy and histology of the cerebellum: The human cerebellum, cerebellar connections and cerebellar cortex.

Minneapolis: The University of Minnesota Press; 1972.

LEE R, KERMANI P, TENG KK, HEMPSTEAD B.L.

Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.

Science. 2001; 294: 1945-1948.

LEE B, SUR B, SHIM I, LEE H, HAHM DH.

Baicalin improves chronic corticosterone-induced learning and memory deficits via the enhancement of impaired hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression in the rat.

J Nat Med. 2014; 68: 132-143.

LEE KH, BISHOP GA, TIAN JB, JANG YJ, BUI BC, Le XUAN NGUYEN T, AHN JY KING JS.

Cellular localization of the full-length isoform of the type 2 corticotropin releasing factor receptor in the postnatal mouse cerebellar cortex.

J Neurosci Res. 2007; 85: 1996-2005.

LEE KH, BISHOP GA, TIAN JB, KING JS.

Evidence for an axonal localization of the type 2 corticotrophin-releasing factor receptor during postnatal development of the mouse cerebellum.

Experimental Neurology. 2004; 187: 11-22.

LEVISOHN L, CRONIN-GOLOMB A, SCHMAHMANN J.

Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: Cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population.

Brain. 2000; 123: 1041–1050.

LEVITT JJ, MCCARLEY RW, NESTOR PG, PETRESCU C, DONNINO R, HIRAYASU Y.

Quantitative volumetric MRI study of the cerebellum and vermis in schizophrenia: clinical and cognitive correlates.

Am J Psychiatry. 1999; 156(7): 1105–7.

LIANG MJ, ZHOU Q, YANG KR, YANG XL, FANG J, CHEN WL.

Identify changes of brain regional homogeneity in bipolar disorder and unipolar depression using resting state FMRI.

PLoS One. 2013; 8(12): 799-99.

LI J, LI Y, SUN Y, WANG H, ZHAO Y, WANG H, SU Y, SI T.

Chronic mild corticosterone exposure during adolescence enhances behaviors and upregulates neuroplasticity-related proteins in rat hippocampus.

Progress in Neuropsychopharmacol. Biol. Psy. 2019; 89: 400-411.

LIOTTI M, MAYBERG HS, MCGINNIS S, BRANNAN SL, JERABEK P.

Unmasking disease-specific cerebral blood flow abnormalities: mood challenge in patients with remitted unipolar depression.

Am J Psychiatry. 2002; 159(11): 1830–40.

LINDHOLM, D, HAMNÉR S, ZIRRGIEBEL U.
Neurotrophins and cerebellar development.
Persp. Dev. Neurol. 1997; 5: 83–94.

LISTON C, MILLER MM, GOLDWATER DS, RADLEY JJ, ROCHER AB, HOF PR, MORRISON JH, McEWEN BS.
Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting.
J Neurosci. 2006; 26: 7870–7874.

LIU L, ZENG LL, LI Y, MA Q, LI B, SHEN H.
Altered cerebellar functional connectivity with intrinsic connectivity networks in adults with major depressive disorder.
PLoS One. 2012; 7(6): 395-16.

LIU W, YUEN EY, YAN Z.
The stress hormone corticosterone increases synaptic alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors via serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulation of the GDI-Rab4 complex.
J Biol Chem. 2010; 285(9): 6101-8.

LORENZETTI V, ALLEN NB, FORNITO A, YUCEL M.
Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies.
J Affect Disord. 2009; 117: 1-17.

LUPIEN SJ, McEWEN BS, GUNNAR MR and HEIM C.
Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition.
Nat Rev Neurosci. 2009; 10: 434–445.

M

MA Q, ZENG LL, SHEN H, LIU L, HU D.
Altered cerebellar-cerebral resting-state functional connectivity reliably identifies major depressive disorder.
Brain Res. 2013; 1495: 86–94.

MACKIE S, SHAW P, LENROOT R, PIERSON R, GREENSTEIN DK, NUGENT TF.
Cerebellar development and clinical outcome in attention deficit hyperactivity disorder.
Am J Psychiatry. 2007; 164(4): 647–55.

MAGARINOS AM et McEWEN BS.
Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors.
Neuroscience. 1995; 69: 89–98.

MALBERG J et DUMAN RS.
Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: Reversal by fluoxetine treatment.
Neuropsychopharmacology. 2003; 28: 1562–1571.

MALONEY SE, NOGUCHI KK, WOZNIAK DF, FOWLER SC, FARBER NB.
Long-term effects of multiple glucocorticoid exposures in neonatal mice.
Behav Sci. 2011; 1(1): 4-30.

MANDOLESI G, CESA R, AUTUORI E, STRATA P.
An orphan ionotropic glutamate receptor: the $\delta 2$ subunit.
Neuroscience. 2009; 158: 67-77.

MANTO M et HABAS C.
Le cervelet De l'anatomie et la physiologie à la clinique humaine.
Springer-Verlag, Paris 2013, pp 13-45.

MANTO M, OULAD BEN TAIB N.
The contributions of the cerebellum in sensorimotor control: what are the prevailing opinions which will guide forthcoming studies?
Cerebellum. 2013 ; 12(3): 313–5.

MARCHISELLA F, COFFER ET et HOLLOS P.
Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease.
Cytoskeleton. 2016; 73(10): 596-611.

MARKO MK, CROCKETT D, HULST T, DONCHIN O, SHADMEHR R, MOSTOFSKY SH.
Behavioural and neural basis of anomalous motor learning in children with autism.
Brain. 2015; 138(3): 784–97.

MARTINEZ A, ALCANTARA S, BORRELL V, DEL RIO JA, BLASI J, OTAL R, CAMPOS N, BORONAT A, BARBACID M, SILOS-SANTIAGO I, SORIANO E.
TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections.
J. Neurosci. 1998; 18: 7336–7350.

MATSUMOTO T, NUMAKAWA T, YOKOMAKU D, ADACHI N, YAMAGISHI S, NUMAKAWA Y, KUNUGI H, TAGUCHI T.
Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity.
Mol. Cell. Neurosci. 2006; 31, 70-84.

McCORMICK CM, RIOUX T, FISHER R, LANG K, MacLAURY K, TEILLON SM.
Effects of neonatal corticosterone treatment on maze performance and HPA axis in juvenile rats.
Physiol Behav. 2001; 74(3): 371-379.

McEWEN BS.
Stress and hippocampal plasticity.
Annu Rev Neurosci. 1999; 22: 105–122.

McEWEN BS, BOWLES NP, GRAY JD, HILL MN, HUNTER RG, KARATSOREOS IN, NASCA C.
Mechanisms of stress in the brain.
Nat Neurosci. 2015; 18(10): 1353–1363.

- McGAUGH JL, CAHILL L, ROOZENDAAL B.
Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93(24): 13508-14.
- MCKITTRICK CR, MAGARINOS AM, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, McEWEN BS, SAKAI RR.
Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreased binding to serotonin transporter sites.
Synapse. 2000; 36: 85-94.
- MEANEY MJ.
Epigenetics and the biological definition of gene 9 environment interactions.
Child Dev. 2010; 81: 41–79.
- MEYER JS.
Early adrenalectomy stimulates subsequent growth and development of the rat brain.
Exp Neurol. 1983; 82: 432-446.
- MIGUEL-HIDALGO JJ, WALTZER R, WHITTON AA, AUSTIN MC, RAJKOWSKA G, STOCKMEIER CA.
Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity.
J. Affect. Disord. 2010; 127: 230–240.
- MIGUEL-HIDALGO JJ, BAUCOM C, DILLEY G, OVERHOLSER JC, MELTZER HY, STOCKMEIER CA, RAJKOWSKA G.
Fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder.
Biol. Psychiatry. 2000; 48: 861–873.
- MILLS NP, DELBELLO MP, ADLER CM, STRAKOWSKI SM.
MRI analysis of cerebellar vermal abnormalities in bipolar disorder.
Am J Psychiatry. 2005; 162(8): 1530–2.
- MINICHIELLO L et KLEIN R.
TrkB and TrkC neurotrophine receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons.
Genes Dev. 1996; 10(22): 2849-58.
- MJAATVEDT AE, WONG-RILEY MT.
Relationship between synaptogenesis and cytochrome oxidase activity in Purkinje cells of the developing rat cerebellum.
J. Comp. Neurol. 1988; 277: 155–82.
- MOGHADDAM, B.
Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia.
Neuron. 2003; 40: 881–884.
- MOLINARI M et LEGGIO MG.
Cerebellar information processing and visuospatial functions.
Cerebellum. 2007; 6(3): 214-20.

MONKUL ES, HATCH JP, SASSI RB, AXELSON D, BRAMBILLA P, NICOLETTI MA.
MRI study of the cerebellum in young bipolar patients.
Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2008; 32(3):613–9.

MONTI B, CONTESTABILE A.
Blockade of NMDA receptor increased developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum.
Eur J Neurosci. 2000; 12: 3117-3123.

MONTI B, MARRI L, CONTESTABILE A.
NMDA receptor-dependent CREB activation in survival of cerebellar granule cells during in vivo and in vitro development.
Eur J Neurosci. 2002; 16: 1490-1498.

MORANDO L, CESA R, RASETTI R, HARVEY R, STRATA P.
Role of glutamate delta2 receptors in activity-dependent competition between heterologous afferent fibers.
Proc Natl Acad Sci USA. 2001 98: 9954–9959.

MORIMOTO M, MORIT, N, OZAWA H, YOKOYAMA K, KAWATA M.
Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study.
Neurosci Res. 1996; 26: 235-269.

MORRISON ME et MASON CA.
Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling.
J Neurosci. 1998; 18: 3563–3573.

MOUSSARD C avec la contribution de MOUGIN C.
Les hormones stéroïdes : les glucocorticoïdes In Biologie moléculaire, biochimie des communications cellulaires ; p233-235.
Editions De Boeck, 2006, 2^{ème} tirage.

MOUSTAFA AA, WUFONG E, SERVATIUS RJ, PANG KC, GLUCK MA, MYERS CE.
Why trace and delay conditioning are sometimes (but not always) hippocampal dependent: a computational model.
Brain Res. 2013; 1493: 48–67.

MUELLER BR, et BALE TL.
Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy.
J Neurosci. 2008; 28(36): 9055-9065.

MURGATROYD C, PATCHEV AV, WU Y, MICALÉ V, BOCKMEUHL Y, FISCHER D, HOLSBOER F, WOTJAK CT, ALMEIDA OFX, SPENGLER D.
Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress.
Nat Neurosci. 2009; 12: 1559–1566.

N

NAKAO T, SANEMATSU H, YOSHIURA T, TOGAO O, MURAYAMA K, TOMITA M.
fMRI of patients with social anxiety disorder during a social situation task.
Neurosci Res. 2011; 69(1): 67–72.

NAKAYAMA H, MIYAZAKI T, KITAMURA K, HASHIMOTO K, YANAGAWA Y, OBATA K, SAKIMURA K, WANATABE M, KANO M.
GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum.
Neuron. 2012; 74: 384–396.

NICHOLS NR, OSTERBURG HH, MASTERS JN, MILLAR SL, FINCH CE.
Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment.
Brain Res. Mol. Brain Res. 1990 ; 7 : 1–7.

NICOLAIDES NC, KYRATZI E, LAMPROKOSTOPOULOU A, CHROUSOS GP, CHARMANDARI E.
Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids.
Neuroimmunomodulation. 2015; 22: 6–19.

NIEUWENHUYNS R, VOOGD J, VAN HUIJZEN C.
The human central nervous system. A synopsis and atlas, third revised edition.
Berlin: Springer-Verlag; 1988.

NOGUCHI K
Glucocorticoid induced cerebellar toxicity in the developing neonate: implications for glucocorticoid therapy during bronchopulmonary dysplasia.
Cells. 2014; 3(1): 36-52.

NOGUCHI K, LAU K, SMITH DJ, SWINEY BS, FABER NB.
Glucocorticoid receptor stimulation and the regulation neonatal cerebellar neural progenitor cell apoptosis.
Neurobiol Dis. 2011; 43(2): 356-63.

NOGUCHI K, WALLS KC, WOZNIAK DF, OLNEY JW, ROTH KA, FARBER NB.
Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death.
Cell Death Differ. 2008, 15(10): 1582-92.

NOPOULOS PC, CEILLEY JW, GAILIS EA, ANDREASEN NC.
An MRI study of cerebellar vermis morphology in patients with schizophrenia: evidence in support of the cognitive dysmetria concept.
Biol Psychiatry. 1999; 46(5): 703–11.

NORGREN N, ROSENGREN L, STIGBRAND T.
Elevated neurofilament levels in neurological diseases.
Brain. Res. 2003; 987: 25–31.

NUMAKAWA T, SUZUKI S, KUMAMARU E, ADACHI N, RICHARDS M, KUNUGI H.
BDNF function and intracellular signaling in neurons.
Histol Histopathol. 2010; 25: 237-285.

NUMAKAWA T, ISHIMOTO T, SUZUKI S, NUMAKAWA Y, ADACHI N, MATSUMOTO T, YOKOMAKU D, KOSHIMIZU H, FUJIMORI KE, HASHIMOTO R, TAGUCHI T, KUNUGI H.
Neuronal roles of the integrin-associated protein (IAP/CD47) in developing cortical neurons.
J. Biol. Chem. 2004; 279: 43245-43253.

O

O'CALLAGHAN JP, BRINTON RE, MCEWEN BS.
Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury.
J. Neurochem. 1991 ; 57 : 860–869.

ONAT F ET CAVDAR S.
Cerebellar connections: hypothalamus.
Cerebellum. 2003; 2: 263–269.

O'SHEA RD.
Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2002 ; 29 : 1018–1023.

P

PATTERSON SL, ABEL T, DEUEL TA, MARTIN KC, ROSE JC, KANDEL ER.
Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice.
Neuron 1996; 16: 1137-1145.

PARK H et POO MM.
Neurotrophine regulation of neural circuit development and function.
Nat Rev Neurosci. 2013; 14(1): 7-23.

PASCUAL R, EBNER D, ARANEDA R, URQUETA MJ, BUSTAMANTE C.
Maternal stress induces long-lasting Purkinje cell developmental impairments in mouse offspring.
Eur J Pediatr. 2010, 169: 1517–22.

PASSAFARO M, NAKAGAWA T, SALA C, SHENG M.
Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2.
Nature. 2003; 424: 677–681.

PATCHEV V, RODRIGUES A J, SOUSA N, SPENGLER D AND ALMEIDA OFX.
The future is now: early life events preset adult behavior.
Acta Physiol. 2014; 210: 46–57.

PAUS T.
Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface.
Nat Rev Neurosci. 2001; 2(6): 417-24.

PAVLIK A, BURESOVA M.
The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain.
Brain Res. 1984; 341: 13-20.

PAYSAN, J, CONROY WG., COGGAN JS.

The neurofilament infrastructure of a developing presynaptic calyx.
J. Comp. Neurol. 2000; 425, 284–294.

PECHNICK RN, KARIAGINA A, HARTVIG E, BRESEE CJ, POLAND RE, CHESNOKOVA VM.

Developmental exposure to corticosterone: behavioral changes and differential effects on leukemia inhibitory factor (LIF) and corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the mouse.
Psychopharmacology. 2006; 185: 76-83.

PELLEGRINO LJ ET ALTMAN J

Effects of differential interference with postnatal cerebellar neurogenesis on motor performance, activity level, and maze learning of rats: a developmental study. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 1979; 93: 1-33.

PENG J, LIU J, NIE B, LI Y, SHAN B, WANG G.

Cerebral and cerebellar gray matter reduction in first-episode patients with major depressive disorder: voxel based morphometry study.
Eur J Radiol. 2011; 80(2): 395–9.

PENN H.

Neurobiological correlates of autism: A review of recent research.
Child Neuropsychol. 2006; 12: 57–79.

PFAFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C, NEUVIANS TP.

Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations.
Biotechnol. Lett. 2004; 26: 509-515.

PHILLIPS JR, HEWEDI DH, EISSA AM and MOUSTAFA AM.

The cerebellum and psychiatric disorders.
Frontiers in Public Health. 2015; 3(66): 1-8.

PLOGHAUS A, TRACEY I, GATI JS, CLARE S, MENON RS, MATTHEWS PM, RAWLINS JN.

Dissociating pain from its anticipation in the human brain.
Science. 1999; 284:1979–1981.

POPOLI M, YAN Z, McEWEN BS, SANACORA G.

The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission.
Nature. 2012; 13: 22-37.

POZZO-MILLER LD, GOTTSCHALK W, ZHANG L, MCDERMOTT K, DU J, GOPALAKRISHNAN R, OHO C, SHENG ZH, LU B.

Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knock-out mice.
J. Neurosci. 1999 ; 19: 4972–4983.

PURVES D, AUGUSTINE GD, FITZPATRICK D, HALL WC, LaMANTIA AS, McNAMARA JO, WHITE LE.

La motricité et son contrôle central : modulation des mouvements par le cervelet.
In Neurosciences, 4ème Edition, Editions De Boeck, Bruxelles, 2011.

Q

R

RAMOS-REMUS C, GONZALEZ-CASTANEDA RE, GONZALEZ-PEREZ O, LUQUIN S, GARCIA-ESTRADA J. Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. *J. Investig. Med.* 2002; 50: 458–464.

RASMUSSEN A, SHI L et DUMAN RS. Down-regulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footstock. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 27: 133–142.

RAVIZZA SM, MCCORMICK CA, SCHLERF JE, JUSTUS T, IVRY RB, FIEZ JA. Cerebellar damage produces selective deficits in verbal working memory. *Brain.* 2006; 129(2): 306–20.

REICHARDT LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006; 361(1473): 1545–64.

REINES A, CERSETO M, FERRERO A, BONAVIDA C, WINKINSKI S. Neuronal cytoskeletal alterations in an experimental model of depression. *Neuroscience.* 2004; 129: 529-538.

REUCHARDT LF. Neurotrophine-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361(1473): 1545-64.

REZNIKOV, L. R. Stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 3109–3114.

RICHTER S, SCHOCH B, KAISER O, GROETSCHEL H, DIMITROVA A, HEIN-KROPP C, MASCHKE M, GIZEWSKI E, TIMMANN D. Behavioral and affective changes in children and adolescents with chronic cerebellar lesions. *Neurosci. Letters* 2005; 81: 102–107.

RICO B, XU B, REICHARDT LF. TrkB receptor signaling is required for establishment of GABergic synapses in the cerebellum. *Nat Neurosci.* 2002; 5(3): 225-233.

ROBSON AC, LECKIE CM, SECKL JR, HOLMES MC. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 9(61): 1-10.

ROCAMORA N, GARCIA-LADONA FJ, PALACIOS JM, MENGOD G. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and low-affinity nerve growth factor receptor during the postnatal development of the rat cerebellar system. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993; 17: 1–8.

ROCHEFORT C, LEFORT JM, RONDIREIG L.

The cerebellum: a key structure in the navigation system.
Front Neural Circuits. 2013; 17(7): 35.

ROGERS TD, MCKIMM E, DICKSON PE, GOLDOWITZ D, BLAHA CD, MITTLEMAN G.
Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and pre-clinical research.
Front Syst Neurosci. 2013; 7:15.

S

SANG L, QIN W, LIU Y, HAN W, ZHANG Y, JIANG T.
Resting-state functional connectivity of the vermal and hemispheric sub regions of the cerebellum with both the cerebral cortical networks and subcortical structures.
Neuroimage. 2012; 61(4): 1213–25.

SAYKIN AJ, GUR RC, GUR RE, MOZLEY PD, MOZLEY LH, RESNICK SM.
Neuropsychological function in schizophrenia Selective impairment in memory and learning.
Arch Gen Psychiatry. 1991; 48(7): 618–24.

SAWADA K, FUKUI Y, HAWKES R.
Spatial distribution of corticotropin-releasing factor immunopositive climbing fibers in the mouse cerebellum: analysis by whole mount immunohistochemistry.
Brain Res. 2008; 1222: 106-117.

SAWADA K, HAGA H, HISANO S, FUKUI Y.
Topological relationship between corticotropin-releasing factor-positive cerebellar afferents and tyrosine hydroxylase-positive Purkinje cells in a hereditary ataxic mutant, rolling mouse Nagoya.
Neuroscience. 2001; 102: 925–935.

SCHMAHMANN JD, WEILBURG JB, SHERMAN JC.
The neuropsychiatry of the cerebellum – insights from the clinic.
Cerebellum. 2007; 6(3):254–67.

SCHAAF MJM, DE KLOET ER, VREUGDENHIL E.
Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation.
Stress 2000; 3: 201–208.

SCHÄBITZ WR., SOMMER C, ZODER W, KIESSLING M, SCHWANINGER M, SCHWAB S.
Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia.
Stroke. 2000; 31: 2212-2217.

SCHMIDT MD, OITZL MS, LEVINE S, De KLOET ER.
The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation.
Brain Res Dev Brain Res. 2002, 139: 39-49.

SCHOCH B, KONCZAK J, DIMITROVA A, GIZEWSKI ER, WIELAND R, TIMMANN D.
Impact of surgery and adjuvant therapy on balance function in children and adolescents with cerebellar tumors.
Neuropediatrics. 2006; 37:350–358.

- SCHUTTER DJ, KOOLSCHIJN PC, PEPER JS, CRONE EA.
The cerebellum link to neuroticism: a volumetric MRI association study in healthy volunteers.
PLoS One. 2012; 7(5): 372-52.
- SCHWARTZ PM, BORGHESANI PR, LEVY RL, POMEROY SL, SEGAL RA.
Abnormal cerebellar development and foliation on BDNF $-/-$ mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning.
Neuron. 1997; 19(2): 269-81.
- SCHWEIGHOFER N, DOYA K, LAY F.
Unsupervised learning of granule cell sparse codes enhances cerebellar adaptive control.
Neuroscience. 2001; 103(1): 35–50.
- SECKL JR.
Prenatal glucocorticoids and long-term programming.
Eur J Endocrinol. 2004; 151: 49-62.
- SEIL FJ et DRAKE-BAUMANN R.
TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis.
J. Neurosci. 2000; 20: 5367–5373.
- SELVADURAI LP, HARDING IH, CORBEN LA, STAGNITTI MR, STOREY E, EGAN GR, DELATYCKI MB, GEORGIOU-KARISTIANIS N.
Cerebral and cerebellar grey matter atrophy in Friedreich ataxia: the IMAGE-FRDA study.
J Neurol. 2016; 263: 2215-2223.
- SEQUEIRA, A, MAMDANI F, ERNST C, VAWTER MP, BUNNEY WE, LABEL V, REHAL S, KLEMPAN T, GRATTON A, BENKELFAT C, ROULEAU GA, MECHAWAR N, TURECKI G.
Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression.
PLoS ONE 4, e6585 (2009).
- SHARMA, N, KRESS, Y, SHAFIT-ZAGARDO, B.
Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons.
Cell. Motil. Cytoskelet. 1994; 27: 234–247.
- SHEA TB et CHAN WK.
Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation.
Eur. J. Neurosci. 2008; 27: 1893–1901.
- SHELTON MA, NEWMAN JT, GU H, SAMPSON AR, FISH KN, MACDONALD ML, MOYER CE, DIBITETTO JV, DORPH-PETERSEN KA, PENZES P.
Loss of Microtubule-Associated Protein 2 Immunoreactivity Linked to Dendritic Spine Loss in Schizophrenia.
Biol. Psychiatry. 2015; 78: 374–385.

SHIMADA A, MASON CA et MORRISON ME.

TrkB signaling modulates spine density and morphology independent of dendrite structure in cultured neonatal Purkinje cells.

J Neurosci. 1998; 18: 8559–8570.

SHOENER JA, BAIG R, PAGE KC.

Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2006; 290: 1366-73.

SINGER T, SEYMOUR B, O'DOHERTY J, KAUBE H, DOLAN R, FRITH C.

Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain.

Science 2004; 303: 1157–1162

SINGH KK, PARK KJ, HONG EJ, KRAMER BM, GREENBERG ME, KAPLAN DR, MILLER FD.

Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration.

Nat. Neurosci. 2008; 11: 649-658.

SIVASWAMY L, KUMAR A, RAJAN D, BEHEN M, MUZIK O, CHUGANI D.

A diffusion tensor imaging study of the cerebellar pathways in children with autism spectrum disorder.

J Child Neurol. 2010; 25(10): 1223–31.

SKEFOS J, CUMMINGS C, ENZER K, HOLIDAY J, WEED K, LEVY E.

Regional alterations in Purkinje cell density in patients with autism.

PLoS One. 2014; 9(2): 81255.

SMITH SM et VALE WW.

The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress.

Dialogues Clin Neurosci. 2006; 8(4): 383-95.

SMITH M, MAKINO S, KVETNANSKY R, POST RM.

Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain.

Ann NY Acad Sci 1995; 771: 234–239.

SOARES JC, MANN JJ.

The anatomy of mood disorders – review of structural neuroimaging studies.

Biol Psychiatry. 1997; 41(1): 86–106.

SOETANTO A, WILSON RS, TALBOT K, UN A, SCHNEIDER JA, SOBIESK M, KELLY J, LEURGANS S, BENNETT DA, ARNOLD SE.

Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans.

Arch Gen Psychiatry. 2010; 67: 448–457.

SOMENARAIN L et JONES LB.

A comparative study of MAP2 immunostaining in areas 9 and 17 in schizophrenia and Huntington chorea.

J. Psychiatr. Res. 2010; 44: 694–699.

SOUSA N and ALMEIDA OFX.

Disconnection and reconnection: the morphological basis of (mal)adaptation to stress.

Trends Neurosci. 2012; 35: 742–751.Z

SOUSA N, LUKOYANOV NV, MADEIRA MD, ALMEIDA OF, PAULA-BARBOSA MM.

Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement.

Neuroscience. 2000; 97: 253–266.

STOODLEY CJ.

The cerebellum and cognition: evidence from functional imaging studies.

Cerebellum. 2012; 11(2): 352–65.

STOODLEY CJ et SCHMAHMANN JD.

Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing.

Cortex. 2010; 46(7): 831-844.

STARKMAN MN, GIORDANI B, GEBARSKI SS, BERENT S, SCHORK MA, SCHTEINGART DE.

Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease.

Biol. Psychiat. 1999; 46: 1595–1602.

STRICK PL, DUM RP et FIEZ JA.

Cerebellum and non motor function.

Annu Rev Neurosci. 2009; 32: 413–434.

SWINNY JD, METZGER F, IJKEMA-PAASSEN J, GOUNKO NV, GRAMSBERGEN A, Van der WANT JLL.

Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro.

Eur J Neurosci. 2004; 19: 1749-1758.

SWINNY JD, KALICHARAN D, BLAAUW EH, IJKEMA-PAASSEN J, SHI F, GRAMSBERGEN A, VAN DER WANT JLL.

Corticotrophin-releasing factor receptor types 1 and 2 are differentially expressed in pre- and post-synaptic elements in the postnatal developing rat cerebellum.

Eur J Neurosci. 2003; 18: 549-562.

T

TAKAYAMA C, NAKAGAWA S, WATANABE M, MISHINA M, INOUE Y.

Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel delta2 subunit according to the Purkinje cell maturation.

Brain Res Dev Brain Res. 1996; 92: 147–155.

TALATI A, PANTAZATOS SP, SCHNEIER FR, WEISSMAN MM, HIRSCH J.

Gray matter abnormalities in social anxiety disorder: primary, replication, and specificity studies.

Biol Psychiatry. 2013; 73(1): 75–84.

TAVANO A, GRASSO R, GAGLIARDI C, TRIULZI F, BRESOLIN N, FABBRO F, BORGATTI R.

Disorders of cognitive and affective development in cerebellar malformations.

Brain. 2007; 130: 2646–2660.

TENG J, TAKEI Y, HARADA A, NAKATA T, CHEN J, HIROKAWA N.
Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization.
J Cell Biol. 2001; 155(1): 65-76.

TIAN JB, SHAN X, BISHOP GA, KING JS.
Presynaptic localization of a truncated isoform of the type two corticotrophin releasing factor receptor.
Neuroscience. 2006; 138: 691-702.

TOMASI D, VOLKOW ND.
Abnormal functional connectivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder.
Biol Psychiatry. 2012; 71(5): 443–50.

TORRES IJ, BOUDREAU VG, YATHAM LN.
Neuropsychological functioning in euthymic bipolar disorder: a meta-analysis.
Acta Psychiatr Scand. 2007; 434: 17–26.

TOWNSEND J, COURCHESNE E, COVINGTON J, WESTERFIELD M, HARRIS NS, LYDEN P, LOWRY TP, PRESS GA.
Spatial attention deficits in patients with acquired or developmental cerebellar abnormality.
J Neurosci. 1999; 19(13): 5632-43.

TSAI PT, HULL C, CHU Y, GREENE-COLOZZI E, SADOWSKI AR, LEECH JM.
Autistic-like behavior and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice.
Nature. 2012; 488(7413): 647–51.

TSANKOVA N, RENTHAL W, KUMAR A and NESTLER EJ.
Epigenetic regulation in psychiatric disorders.
Nat Rev Neurosci. 2007; 8: 355–367.

TZINGOUNIS AV et WADICHE JI.
Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission.
Nature Rev. Neurosci. 2007; 8: 935–947.

U

UELAND T, OIE M, INGE LANDRO N, RUND BR.
Cognitive functioning in adolescents with schizophrenia spectrum disorders.
Psychiatry Res. 2004; 126(3): 229–39.

ULUPINAR E, YUCEL F, ORTUG G.
The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis.
Neurotoxicol Teratol. 2006, 28: 86-94.

V

VARIDAKI A, MOHAMMAD H, COFFEY ET.
Molecular Mechanisms of Depression.
In: Frodl T (ed), Systems Neuroscience in Depression. Elsevier, London, UK, 2016; 143–163.

VARNÄS K, LAWYER G, JÖNSSON EG, KULLE B, NESVÅG R, HALL H, TERENIUS L AND AGARTZ I.
Brain-derived neurotrophic factor polymorphisms and frontal cortex morphology in schizophrenia.
Psychiatr Genet. 2008; 18: 177-183.

VENERO C et BORRELL J.
Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats.
Eur. J. Neurosci. 1999; 11: 2465–2473.

VICEDOMINI JP, NONNEMAN AJ, DEKOSKY ST.
Perinatal glucocorticoids disrupt learning: a sexually dimorphic response.
Physiol Behav. 1986; 36: 145-149.

VITRAC C, PERON S, FRAPPE I, FERNAGUT PO, JABER M, GAILLARD A.
Dopamine control of pyramidal neuron activity in the primary motor cortex via D2 receptors.
Front Neural Circuits. 2014; 8: 13.

VUILLIER F, MEDEIROS DE BUSTOS E, TATU L.
Functional organization of the cerebellum: a neuroanatomical approach.
Rev Neurol. 2011; 167: 361-369.

VYAS A, MITRA R, SHANKARANARAYANA RAO B S, CHATTARJI S.
Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloidal neurons.
J Neurosci. 2002; 22: 6810–6818.

W

WANG SS, KLOTH AD, BADURA A.
The cerebellum, sensitive periods, and autism.
Neuron. 2014; 83(3): 518–32.

WATANABE M et KANO M.
Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells.
Eur J Neurosci. 2011; 34(10): 1697-710.

WATSON JB, MEDNICK SA, HUTTUNEN M.
Prenatal teratogens and the development of adult mental illness.
Dev. Psychopathol. 1999; 11: 457–466.

WANG X, JIAO Y, TANG T, WANG H, LU Z.
Altered regional homogeneity patterns in adults with attention-deficit hyperactivity disorder.
Eur J Radiol. 2013; 82(9): 1552–7.

WEGIEL J, FLORY M, KUCHNA I, NOWICKI K, MA S, IMAKI H.
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(1): 141.

WETMORE C, ERNFORS P, PERSSON H, OLSON L.

Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol.* 1990; 109: 141–152.

WONG-RILEY MT.

Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 1989; 12(3): 94-101.

WOO NH, TENG HK, SIAO CJ, CHIARUTTINI C, PANG PT, MILNER TA, HEMPSTEAD BL, LU B.

Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 1069-1077.

WOODRUFF-PAK DS.

Stereological estimation of Purkinje neuron number in C57BL/6 mice and its relation to associative learning.

Neuroscience. 2006; 141: 233–243.

WOOLLEY CS, GOULD E, McEWEN BS.

Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons.

Brain Res. 1990; 531: 225–231.

X

XIAO J, GONG S, LEDOUX MS.

Caytaxin deficiency disrupts signaling pathways in cerebellar cortex.

Neuroscience. 2007; 144: 439–461.

Y

YAN Q, RADEKE MJ, MATHESON CR, TALVENHEIMO J, WELCHER AA, FEINSTEIN SC.

Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat.

J Comp Neurol. 1997; 378(1): 135-57.

YANG J, SIAO CJ, NAGAPPAN G, MARINIC T, JING D, MCGRATH K, CHEN ZY, MARK W, TESSAROLLO L, LEE FS, LU B, HEMPSTEAD BL.

Neuronal release of proBDNF.

Nat Neurosci. 2009; 12(2): 113-5.

YEHUDA R, MEYER JS.

Regional patterns of brain growth during the first three weeks following early adrenalectomy.

Physiol Behav. 1991; 49: 233-237.

YOSHII A, MURATA Y, KIM J, ZHANG C, SHOKAT KM, CONSTANTINE-PATON M.

TrkB and protein kinase Mzeta regulate synaptic localization of PSD-95 in developing cortex.

J Neurosci. 2011; 31: 11894–11904.

YOSHIMOTO Y, LIN Q, COLLIER TJ, FRIM DM, BREAKFIELD XO, BOHN MC.
Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease.
Brain. Res. 1995; 691: 25-36.

YU MC, CHO E, LUO CB, LI WW, SHEN WZ, YEW DT.
Immunohistochemical studies of GABA and parvalbumin in the developing human cerebellum.
Neuroscience. 1996; 70: 267-276.
YUCEL K, NAZAROV A, TAYLOR VH, MACDONALD K, HALL GB, MACQUEEN GM.
Cerebellar vermis volume in major depressive disorder.
Brain Struct Funct. 2013; 218(4): 851-8.

YUEN EY, LIU W, KARATSOREOS IN, REN Y, FENG J, McEWEN BS, YAN Z.
Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory.
Mol Psychiatry. 2011; 16: 156-170.

YUEN EY, WEI J et YAN Z.
Repeated stress suppresses glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex and impairs object recognition memory.
Soc Neurosci Abstr. 2010; 389: 21.

YUEN EY, LIU W, KARATSOREOS IN, FENG J, McEWEN BS, YAN Z.
Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory.
Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106: 14075-14079.

Z

ZAFRA F, LINDHOLM D, CASTRÉN E, HARTIKKA J, THOENEN H.
Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes.
J. Neurosci. 1992; 12: 4793-4799.

ZHANG C et WONG-RILEY MTT.
Expression and regulation of NMDA receptor subunit R1 and neuronal nitric oxide synthase in cortical neuronal cultures: correlation with cytochrome oxidase.
J. Neurocytol. 1999; 28: 525-539.

ZHAO HM, WENTHOLD RJ, PETRALIA RS.
Glutamate receptor targeting to synaptic populations on Purkinje cells is developmentally regulated.
J Neurosci. 1998; 18: 5517-5528.

ZHAO Y, XIE W, DAI J, WANG Z, HUANG Y.
The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice.
Brain Res. 2009; 1261: 82-90.

ZHOU P, PORCIONATTO M, PILAPIL M, CHEN Y, CHOI Y, TOLIAS KF, BIKOFF JB, HONG EJ, GREENBERG ME SEGAL RA.

Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*. 2007; 55(1): 53-68.

ZINK M, VOLLMAYR B, GEBICKE-HAERTER PJ, HENN, FA.

Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology*. 2010; 58: 465–473.

ANNEXES

Tableau 23 : Morphométrie cérébelleuse et hippocampique chez la souris 15J en μm .

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Gr = granulaire.

		Contrôle	Corticostérone	p	%
Cervelet	Simplex Gr externe	17 \pm 1	18 \pm 1.2	0.5418	+ 5,9 %
	Simplex Moléculaire	148 \pm 4.2	149.7 \pm 3.3	0.7526	+ 1,2 %
	Simplex Gr interne	117.7 \pm 3.6	126.9 \pm 1.6	0.0393	+ 7,8 %*
	Crus I Gr externe	22.1 \pm 1.3	40.6 \pm 4.5	0.0341	+ 39.3 %*
	Crus I Moléculaire	202.9 \pm 14.8	217.2 \pm 23.5	0.6378	+ 7 %
	Crus I Gr interne	195.7 \pm 18.4	226.8 \pm 21.4	0.2953	+ 15,9 %
	Crus II Gr externe	16.7 \pm 1.2	17.1 \pm 1.7	0.8509	+ 2,4 %
	Crus II Moléculaire	144.7 \pm 6.7	139.9 \pm 6	0.5966	- 3,3 %
	Crus II Gr interne	147.7 \pm 8.3	153 \pm 8.8	0.684	+ 3,4 %
	Paramédian Gr externe	27.9 \pm 1.2	21.9 \pm 1.2	0.0042	- 21.5 %**
	Paramédian II Moléculaire	171.4 \pm 1.5	159.2 \pm 4	0.0178	- 7 %*
	Paramédian II Gr interne	134.1 \pm 4.3	107.5 \pm 5.4	0.0022	- 20 %**
	Vermis Gr externe	15.6 \pm 0.7	21.6 \pm 1.7	0.0073	+ 38.4 %**
	Vermis Moléculaire	146.7 \pm 7.3	145.7 \pm 3.8	0.0975	- 0,7 %
Vermis Gr interne	157,9 \pm 3.05	178.2 \pm 8.7	0,0468	+ 12.9 %	
Hippocampe	CA1 Moléculaire	319.8 \pm 10.5	363 \pm 12.6	0.0305	+ 13.5 %*
	CA1 Oriens	673.7 \pm 19	677.6 \pm 16.1	0.8791	+ 0,6 %
	CA1 Pyramidale	137 \pm 2.1	144.2 \pm 2	0.0270	+ 5.2 %*
	DG Moléculaire	224.9 \pm 4.3	220.5 \pm 7.7	0.6374	- 2 %
	DG Granulaire	156.4 \pm 4.9	137.2 \pm 5.5	0.0205	- 12.3 %*

Tableau 24 : Morphométrie cérébelleuse et hippocampique chez la souris 29J μ m.

		Contrôle	Corticostérone	p	%
Cervelet	Simplex Moléculaire	191 \pm 3	205 \pm 5	0.0301	+ 6.9 %*
	Simplex Gr	106.8 \pm 2.3	117.4 \pm 2.8	0.0104	+ 10 %**
	Crus I Moléculaire	290.1 \pm 4.7	256.3 \pm 11.7	0.0286	- 11.7 %*
	Crus I Gr	198.1 \pm 6.5	196 \pm 2.4	0.7535	- 1 %
	Crus II Moléculaire	166.1 \pm 6.3	166.6 \pm 5.4	0.9541	+ 0,3 %
	Crus II Gr	140.2 \pm 2.6	135.6 \pm 5.1	0.3836	- 3,3 %
	Paramédian II Moléculaire	202.8 \pm 4.4	219.1 \pm 3.1	0.0132	+ 8 %*
	Paramédian II Gr	116.2 \pm 5.1	145.7 \pm 7.0	0.0038	+ 25 %**
	Vermis Moléculaire	NM	NM	-	-
	Vermis Gr interne	NM	NM	-	-
Hippocampe	CA1 Moléculaire	665.2 \pm 11.7	699 \pm 8.6	0.0381	+ 5 %*
	CA1 Oriens	400.6 \pm 6	404 \pm 13	0.7914	+ 0.9 %
	CA1 Pyramidale	95.6 \pm 1.5	104.5 \pm 4.4	0.0463	+ 9.7 %*
	DG Moléculaire	307.8 \pm 4.2	292.7 \pm 5.6	0.0452	- 8.7 %*
	DG Granulaire	135.2 \pm 2.4	123.4 \pm 3	0.0072	- 4.9 %**

* p< 0,05 **p<0,01. Gr = granulaire.

Tableau 25 : Morphométrie cérébelleuse et hippocampique chez la souris adulte (3 mois) en μm .

		Contrôle	Corticostérone	p	%
Cervelet	Simplex Moléculaire	221 \pm 8.7	204 \pm 8.5	0.0193	- 8 %
	Simplex Gr	170 \pm 8.7	134 \pm 5.4	0.0018	- 21 %**
	Crus I Moléculaire	249 \pm 2.1	223 \pm 1.5	0.2560	- 10 %
	Crus I Gr	209 \pm 2.1	190 \pm 1.5	0.3706	- 10 %
	Crus II Moléculaire	177 \pm 1.5	202 \pm 1.5	0.0210	+ 13.2 %*
	Crus II Gr	128 \pm 1.5	143 \pm 4.3	0.0127	+ 11.7 %*
	Paramédian Moléculaire	232,5 \pm 1.5	201,7 \pm 1.6	0.2234	- 6 %
	Paramédian Gr	113 \pm 1.5	112 \pm 1.4	0.6721	- 4 %
	Vermis Moléculaire	279 \pm 6.7	245 \pm 5.9	0.553	- 12 %
	Vermis Gr interne	185 \pm 7.3	171 \pm 6.4	0.6322	- 7,6 %
Hippocampe	CA1 Moléculaire	677.8 \pm 6.8	712.8 \pm 10.5	0.0202	+ 5.2 %*
	CA1 Oriens	403.6 \pm 8.4	436.7 \pm 4.8	0.0029	+ 8.2 %**
	CA1 Pyramidale	84.6 \pm 2.4	91 \pm 1.2	0.0221	+ 7.9 %*
	DG Moléculaire	360.9 \pm 10.7	359.8 \pm 7.9	0.9333	-
	DG Granulaire	105 \pm 2.4	111.2 \pm 1.8	0.0476	+5.9 %*

* p< 0,05 **p<0,01. Gr = granulaire ; – non significatif.

ARTICLES

Neuroscience Research

Effects of corticosterone injections in mid-to-late mouse postnatal development on adult motor activity and coordination

Magali Hernandez^{a,b}, Guillaume Harlé^{a,1}, Robert Lalonde^{a,c}, Catherine Strazielle^{a,b*}

^a Laboratory of Stress, Immunity, Pathogens (EA7300), Medical School, University of Lorraine, Vandœuvre-les-Nancy, France

^b CHRU Nancy, Vandœuvre-les-Nancy, France

^c EA 7475, Department of Psychology, University of Rouen-Normandie, Mont-Saint-Aignan, France

¹ Department of Pathology & Immunology, University of Geneva, Geneva, Switzerland (*present address for G. Harlé*)

*Corresponding author

Laboratoire Stress, Immunité, Pathogènes (EA7300), Faculté de Médecine, Bât A/B 9, avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France

Tel : +33 (3) 72 74 62 40 - Fax : +33 (3) 72 74 67 81

Email : catherine.strazielle@univ-lorraine.fr

Manuscript : 49 pages, 6 figures and 4 tables

Declaration of interest: none

ABSTRACT

Glucocorticoids are involved in the developing brain but, in excessive amounts, may depress its growth and cause psychomotor development disorders. To test the long-term vulnerability of motor structures such as the cerebellum to supraphysiological corticosterone (CORT), the hormone was subcutaneously delivered at a dose of 20 mg/kg from postnatal day (P) 8 to P29 in C57BL/6 male mice evaluated for sensorimotor functions at P15, P22, P29, and 3 months. Relative to placebo, CORT increased motor activity in the open-field at P29 and 3 months as well as facilitating rotorod acquisition and visuomotor control necessary for swimming towards a visible goal without affecting spatial learning in the Morris water maze. CORT caused lobule-specific effects on cerebellar morphology by decreasing granule cell layer thickness in simplex lobule but increasing molecular and granule cell layer thickness in crus 2. The functional impact of these changes is indicated by significant correlations found between cerebellar size and activity levels or proficiency on the rotorod test of motor coordination.

Keywords: Corticosterone - Brain development - Cerebellum - Motor coordination - Spatial learning

1. Introduction

Glucocorticoids and stress affect brain development (Oitzl et al., 2010; Heim and Binder, 2012; Bali and Jaggi, 2015). On rat postnatal day (P) 7, dexamethasone administration depleted brain glucocorticoid receptors (Benesova and Pavlik, 1985) and cortisol on P14–P18 lowered corticosterone binding in frontal cortex, hippocampus, and hypothalamus (Ordyan et al., 2001). But opposite results have been obtained on different administration schedules and different postnatal days, as when corticosterone (CORT)-nursed rat offspring had higher (not lower as in the two previous studies) hippocampal glucocorticoid receptors at P30 (Casolini et al., 1997) and adult (Catalani et al., 2000) periods. Various neurochemical effects have been described even with a single glucocorticoid dose (Contestabile, 2000; Katyare et al., 2003; Li et al., 2014).

Glucocorticoid receptors are expressed on cerebellar fetal neurons and maintained in the mature structure (McEwen, 1987; Ozawa, 2005). CORT administered to rat dams on 17, 18, and 19 days of gestation accelerated the decrement of the external granular layer in the offspring at P12 (Velazquez and Romano, 1987), affecting as a consequence the dendritic arbor and spine density of Purkinje cells (Ruggerio-Vargas et al., 2007). A CORT injection on P7 induced cerebellar neural progenitor cell death at the external granule cell layer (Noguchi et al., 2008) in a manner mimicked by inhibiting the activity of hydroxysteroid-dehydrogenase-type 2 (HSD2), a glucocorticoid-metabolizing enzyme (Noguchi et al., 2011), on a non-sonic hedgehog pathway (Noguchi 2014; Noguchi et al., 2015). But opposite actions on cell survival occurred when CORT injected on P1-P12 increased cholinergic and gamma-aminobutyric acid (GABA) neuron numbers in the rat diagonal band of Broca (Roskoden et al., 2005).

Many experimenters have focused on the stress-hyporesponsive period during the first ten postnatal days when blood corticosterone levels are minimal (Sapolsky and Meaney, 1986). We sought instead to examine the effects of CORT administration during mid-to-late mouse postnatal development (Brydges, 2016), corresponding to granule cell layer formation, Purkinje cell dendritic arborization, and synaptic organization with both climbing and parallel fibers from P8 to P29 (Altman, 1972), on adult cerebellar-related morphology and behavior, comprising exploratory

activity in tests of spontaneous alternation (Dember and Fowler, 1958; Lalonde, 2002), open-field (Walsh and Cummins 1976), elevated plus-maze (Pellow et al., 1985; Cole and Rodgers 1993), and emergence (Paré et al., 2001), motor coordination in stationary beam, coat-hanger, and rotorod tests (Caston et al., 1995; Le Marec et al., 1997; Lalonde and Strazielle, 2007, 2015), as well as spatial learning in the Morris water maze (Morris et al., 1982; DiMattia and Kesner, 1988; Joyal et al., 1996; Noblett and Swain, 2003; Lalonde and Strazielle, 2007).

The effects of CORT on cerebellar morphology were determined on simplex, crus 1, crus 2, and paramedian lobules, the hemispheric part of the dorsal posterior lobe. The adult cerebellar motor syndrome occurs after lesions of anterior lobules I to V and of simplex and paramedian posterior lobules (respectively, VI and VIIb), disrupting two-way pathways with neocortical and spinal regions, whereas the cerebellar cognitive and mood syndrome occurs after lesions of posterior lobules VI and VII, including crus 1 and crus 2, disrupting two-way pathways with neocortex (Timmann et al., 2008; Stoodley and Schmahmann, 2010; Buckner, 2013).

2. Materials and methods

2.1 *Animals*

Four-week-old C57BL/6J mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France) and coupled to obtain pups. Mice were reared inside plastic transparent cages (32 cm x 21 cm x 17 cm for length, width and height, respectively) with woodchip bedding under a 12/12 hr light-dark cycle, a temperature of 23-25°C, a relative humidity of 27-30 %, and with food and water available at all times.

Six litters were used in each group and the mouse pups (n=3-4 males in each litter) were injected with CORT (Sigma-Aldrich, France) at a supra-physiological concentration of 20 mg/kg (CORT-treated mice; n=11), based on a medium dose range where behavioral effects were obtained (Harlé et al., 2017) or else injected with dimethylsulfoxide (DMSO) used as the vehicle (control mice; n=10) from P8 to P29, day of birth being recorded as P1. In each litter, both types of treatment were distributed equally between the males to minimize a litter effect. Female mouse pups were injected

with physiological serum but excluded from the study. The mice were identified by felt pen markings on their tail. All drugs were delivered subcutaneously once a day in a volume of 5 μ L per gram body weight of the animal between 8 and 10 AM for 21 consecutive days. At P15 and P22, the mice were evaluated blindly in the SHIRPA (SmithKline/Harwell/Imperial college/Royal hospital/Phenotype Assessment) primary neurological screen (Rogers et al., 1999), which comprises a battery of neurobehavioral tests on several reflexes, sensorimotor functions, anxiety, and motor activity that reflect the integrity and maturation of the central nervous system. At P29, the end of the injections, male mice were separated and reared inside plastic transparent cages. The animals were kept in groups (animals of same litter) but with different treatments (3-4 animals from the same litter per cage treated with CORT or placebo). At 3 months of age, the mice were assessed on tests evaluating spontaneous motor activity, anxiety, motor coordination, and spatial learning during 16 consecutive days. The body weight of each mouse was recorded once a day during the injection procedure and once a week from P29 to 3 months. This research protocol adhered to guidelines of the European Council Directive (2010/63/UE) and animal care regulations at the University of Lorraine (CELMEA-2012-0008).

2.2 Behavioral studies

The overall experimental design is illustrated in Fig. 1. [Insert Figure 1].

Behavioral tests were conducted during the afternoon (between 13:00 to 17:00) by an experienced observer blind to group designation. The order of behavioral tests was conducted to minimize order effects by starting with the least stressful to the most stressful test. We also minimized a possible inter-test interaction by starting each new test on a different day while submitting both groups to the same procedure, glucocorticoid administration being the only variable differing between the two groups.

2.2.1 Evaluation during the postnatal developmental period (first month)

The mice were evaluated in the SHIRPA primary screen at P15 and P22 and in the actimeter at P29.

The *SHIRPA primary screen* protocol was reported in detail by Lalonde et al. (2005). The mice were first observed under a viewing jar during 5 min for motor parameters and number of fecal boli, then transferred in an arena to record transfer arousal, locomotor activity, body and tail positions, eye opening, piloerection, auditory startle, and touch escape. Lifted by the tail, the mice were then assessed for postural reflexes. After landing on the horizontal grid, the mice were evaluated for grasping the grid, grip strength when dragged by the tail across the grid, body tone, pinna and corneal reflexes, as well as toe-pinch withdrawal of a hindlimb after squeezing with a handheld forceps. The forepaws were then placed on a horizontal bar and the ability of the mice to hang suspended was evaluated. Autonomic function such as skin color, heart rate, hindlimb tone, abdominal tone, lacrimation, salivation, and provoked biting in response to a plastic probe gently put in their mouth were observed. The drop righting reflex was then evaluated according to landing position followed by contact righting when placed inside a small plastic tube. In the final SHIRPA test, the mice were placed on a horizontal grid rotated towards a vertical position and assessed for negative geotaxis (turns and climbs, turns and freezes, moves without turning, no movement, falls off the grid). These observations were completed by noting whether any sign of fear (none, freezes during transfer arousal), irritability (none, struggling during restraint), aggression (none or either provoked or non-provoked biting), and vocalization (none or provoked while handling, as heard by the experimenters) had occurred, together with measurements of body weight and length from tip of nose to base of tail. Any other neurologic sign such as abnormal reflexes, notably limb-clasping or a bat-like posture, and seizure activity, was also noted.

The *photocell actimeter* (Leticia model LE8811, Bioseb, France) provided an evaluation of exploratory activity. It contained a floor made of black perspex 45 cm × 45 cm in size and 36-cm high transparent perspex walls. The device distinguished between fast (>10 cm/s) and slow (<10 cm/s) ambulatory, stereotyped, and rearing movements. Stereotyped movements included grooming and rearing movements included jumping. The mice were placed in the center of the apparatus and the number of movements was recorded in a 5-min session at P29.

2.2.2 Evaluation at 3 months of age

The testing schedule for adult mice, executed during the afternoon, included the following tests: spontaneous alternation in a T-maze (days 1-10), actimeter (days 1-3), elevated plus-maze (day 4), emergence (day 5), stationary beam (day 6), coat-hanger (day 7), rotorod (day 8-10), and Morris water maze (days 11-16). No mouse was pre-exposed to any apparatus except for the actimeter at P29. We reported this battery in several articles and described the tests in detail (e.g. Lalonde et al., 2008; Jacquelin et al., 2013)

The *T-maze* made of plywood consisted of two arms (length 30 cm, width 10 cm) perpendicular to a central stem (length: 80 cm, width: 10 cm). Each part of the maze contained walls 20 cm in height. On the initial trial, the mice were placed in the stem of the T-maze with the right arm blocked by a plastic barrier (forced choice). After entering the available arm (4-paw criterion), the mice were kept in it for 60 s by closing the barrier behind them. The mice were then retrieved and, after removing the barrier, were immediately placed back in the stem for a free-choice trial. On the following 9 days, the same 2-trial procedure was repeated except that the blocked arm on the first trial was changed from right on odd days to left on even days. The number of alternations and the latencies before responding during the choice trial were measured with a cut-off period of 60 s per trial, after which time the mice were gently prodded from behind until responding.

The *elevated plus-maze* (Letica model LE 840, Bioseb, France) consisted of four cross-shaped arms and a 10 cm × 10 cm central region. The enclosed arms and the open arms faced each other on opposite sides. Entries, as defined by a 4-paw criterion, and time spent in enclosed and open arms were measured together with open/total arm entry and duration ratios. The mice were placed in the center, considered as enclosed time until an open arm was entered. The mice were evaluated in a single 5-min session.

In the *emergence test*, the mice were placed inside a novel small toy object (orange-colored plastic shoe, length: 13 cm, width: 6 cm, height: 7.5 cm) perforated with three holes (diameter: 3 cm) and situated in the middle of a 41 cm × 27 cm enclosure made of white plastic and surrounded by 18-cm

high walls. Latencies before emerging with two or four paws in contact with the floor were determined in two 5-min trials with an intertrial interval of 60 min. Irrespective of whether emergence occurred or not, the mice were allowed to explore the large enclosure for 10 s. In the three tests of exploratory activity, the apparatus was wiped clean with a damp cloth and dried before evaluating the next mouse.

In the *stationary beam test*, the mice were placed in the center of a round wooden beam 2.5 cm in diameter, covered with adhesive tape, divided into 11 segments of 10 cm, and situated at a height of 70 cm from a mat-covered floor, to cushion any fall. The number of segment crossed (4-paw criterion) and the latencies before falling were measured in a single 4-trial session with a 1 min cut-off period and a 30-min intertrial interval.

In the *coat-hanger test*, the mice were placed upside down in the middle of a horizontal wire (diameter: 2 mm; length: 40 cm) situated at a height of 60 cm from a mat-covered floor. The mice were released only after firmly gripping the bar with all four paws. Seven types of movement time (MT) were compiled: latencies before reaching (snout criterion) the first 10-cm segment (MT-1) or the extremity (MT-2) of the horizontal bar, latencies before reaching one of the two diagonal bars with two, three, or four paws (MT-3 to MT-5), as well as latencies before reaching (snout criterion) the midway point (MT-6) or the top (MT-7) of either diagonal bar. Latencies before falling and the number of falls were also recorded. Whenever a mouse reached the top of the diagonal bar, it was immediately retrieved and a score of 60 s given for latencies before falling. When a mouse fell, a score of 60 s was given for all MTs not attained. The mice were observed during a single 4-trial session with a 1 min cut-off period and a 20-min intertrial interval.

In the *rotorod* (Leticia Rota-Rod/RS, Bioseb, France) test, the mice were placed on top of a revolving beam moving at an initial speed of 4 rpm. The rotorod gradually accelerated from 4 to 40 rpm over a 2-min trial. Latencies before falling were measured in 8-trial sessions per day with a 15-min intertrial interval. Whenever the mice rotated passively for two complete turns, the mouse was removed and the trial counted as if it fell.

The Morris water maze consisted of a round basin (diameter: 86 cm, height of each wall: 30 cm) made of opaque white plastic and filled with water (22°C). Yellow plastic beads covered the water surface to camouflage the escape platform (diameter: 8 cm). The platform was made of plastic and pierced with holes for the purpose of providing a firm grip. The acquisition of the spatial task consisted of placing the mice next to and facing the wall successively in north (N), east (E), south (S), and west (W) positions, with the escape platform hidden 1 cm beneath water level in the middle of the NW quadrant. When reaching the platform, the mice stayed on it for 5 s. Because mice sometimes bump against the platform and continue swimming during the early trials, the criterion adopted for reaching it throughout training was to remain on it for 5 s. The experimenter was hidden from the view of the animal, but able to follow swimming trajectories on a video-monitor, on which the pool was separated into 4 equally spaced quadrants. The number of quadrant entries (4-paw criterion) and escape latencies were measured for 4 trials per session for 5 days, with an intertrial interval of 15 min. After their swim, the mice were kept dry in a plastic holding cage filled with paper towels. Whenever the mice failed to reach the escape platform within the maximally allowed time of 60 s, it was manually placed on it for 5 s. The day after the acquisition phase, a probe trial was conducted by removing the platform and placing the mouse next to and facing the N side. The time spent in the previously correct quadrant (4-paw criterion) was measured during a single trial of 60 s. Ninety minutes later, the visible platform version of the Morris maze was performed, when the escape platform was raised to a height of 1 cm above water level and shifted to the SE quadrant, with a pole (7 cm in height) inserted on top of it to facilitate viewing by animals swimming with their head up. As in the place learning task, quadrant entries and escape latencies were measured for 4 trials per session with a cut-off period of 60 s per trial and an intertrial interval of 15 min, except that the test was conducted on a single day.

2.3 Cerebellar morphology

2.3.1 Tissue preparation

At the end of the water maze test, the animals were rapidly anesthetized in a chamber saturated with halothane. Blood samples were collected by cardiac puncture within less than 3 min to avoid

changing CORT levels; brains were rapidly removed after decapitation and snap-frozen in cooled 2-methylbutane. The blood was centrifuged at 3500 x g for 20 min at room temperature. Sera and brains were stored at – 80°C until use.

2.3.2 Histological procedure

For each brain, freshly cut frozen sections 20 µm in thickness were stained with a 0.5% cresyl violet (Sigma-Aldrich, France) solution for 30 min following the protocol proposed by Bolam (1992). Images of half the left side of the cerebellum were digitalized with a camera on a light microscope (Olympus, France). The cerebellar lobules were identified by means of the mouse brain stereotaxic atlas of Franklin and Paxinos (1997). Layer thicknesses were measured by means of Image J software (version 1.37, from the National Institutes of Health) after calibration with a micrometric slide converting pixels into micrometers. Planimetry of the cerebellar cortex on the sections was verified by observing that Purkinje cells formed a continuous line parallel to the lobule fissure (Yamasaki et al., 2001; Zhang et al., 2006). In each lobule, measures were performed in its central segment with 6 measures per section from 2 sections per mouse. The measures integrated granular and molecular layers, the latter including the Purkinje cell layer consisting of perikarya. The simplex lobule was measured on two sections, 60 to 100 µm separated from each other (between 5.8 and 6.2 mm posterior to the bregma point). The paramedian lobule was similarly measured on two sections at a level between 6.7 and 7.0 mm posterior to bregma. For crus 1 and crus 2 lobules, largely extended, two sections between 6.2 and 6.5 mm posterior to bregma were chosen. As comparable sections among animals were used, morphometric data were obtained from 7 to 9 mice in each animal group depending on the lobule.

2.4 Serum CORT assay

CORT serum levels were evaluated by an enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) kit (Arbor Assays, Euromedex, France) according to instructions provided by the manufacturer. All samples were analyzed together in duplicate. The CORT concentration, calculated from the standard

curve, was expressed in ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficient variations were respectively below 11% and 6%.

2.5 Statistical analyses

The results obtained on the SHIRPA in CORT- or control-treated mice were compared with the chi-square test. Unpaired-t tests were used to compare the groups in the actimeter at P29 as well as adult behaviors. In spontaneous alternation testing, control and CORT were each compared to a theoretical control group performing at 50% chance by the Mann-Whitney U test. A two-way ANOVA was used for three tests containing repeated measures (actimeter, rotorod, Morris water-maze at 3 months of age). For the morphometric study, unpaired-t-tests were used for intergroup comparisons and the data presented in the form of means \pm standard errors (SEM). Linear correlations were tested in accordance with the restrictive standards proposed by Rousselet and Pernet (2012) between the altered behavioral performances and cerebellar morphometric values of those lobules that differed from normal values. For all statistics, the level of significance was set at $P < 0.05$ and analyzed with StatviewTM 4.1 software.

3. Results

3.1 Body weight

For the entire period of drug injection (P8 to P29), body weight was similar in the two groups of mice ($F(1,19)=0.1$, $P > 0.05$), with only the day effect being significant ($F(1,20)=22.7$, $P < 0.0001$) as a result of normal mouse growth. Body weight was also unchanged on the final day of testing in adults ($26.2 \text{ g} \pm 0.4$ and $26.1 \text{ g} \pm 0.4$ for CORT- and placebo-treated mice respectively).

3.2 SHIRPA

As presented in Table 1, CORT-treated mice were distinguishable from controls on only one aspect of the SHIRPA battery: locomotor activity inside the perspex jar, where they appeared more active at P22 ($\chi^2(2)=7.97$; $P < 0.05$). On the contrary, the two groups were equivalent ($P > 0.05$) in

squares traversed in the arena at P15 (3.5 ± 0.7 vs 2.9 ± 0.6 respectively for CORT and controls) and P22 (5.4 ± 0.8 vs 3.5 ± 1.1 respectively for CORT and controls). [Insert Table 1]

3.3 Exploratory activity

In contrast to the negative result in the SHIRPA arena conducted for only 1 min, a hormone effect was observed on 3 of 6 actimeter measures over a 5-min period at P29 (Fig. 2), where CORT-treated mice were more active than controls in regard to slow ambulatory movements ($t(19)=2.4$, $P < 0.05$), slow stereotypies ($t(19) = 2.13$, $P < 0.05$), and fast rears ($t(19)=2.34$, $P < 0.05$). [Insert Figure 2] As seen in Fig. 3, CORT-treated mice were also more active than placebo-treated mice at 3 months of age in regard to slow ($F(1,19)=6.37$, $P < 0.05$) and fast ($F(1,19)=6.13$, $P < 0.05$) ambulation, slow ($F(1,19)=6.03$, $P < 0.05$) and fast ($F(1,19)=6.61$, $P < 0.05$) rears, and fast stereotypies ($F(1,19)=5.03$, $P < 0.05$), slow stereotypies being at borderline significance ($F(1,19)=4.34$, $P = 0.05$). [Insert Figure 3],

During the entire 10-day spontaneous alternation period, CORT-treated mice and controls alternated above chance (respectively $60\% \pm 5$, $p < 0.05$ and $74\% \pm 4$, $p < 0.0001$, Mann-Whitney). Although CORT-treated mice (111.6 ± 18.65 s) had almost half the choice latencies of control-treated mice (204.4 ± 52.4 s), the results fell short of significance ($t(19)=1.73$, $P > 0.05$), possibly due to high variations. In the elevated plus-maze (Table 2), CORT-treated mice had slightly more open arm entries than controls at borderline significance ($t(19)=2.05$, $P = 0.054$), but these entries relative to the total number of arm entries showed no intergroup difference ($P > 0.05$). Latencies before emerging from the small compartment with two or four paws were equivalent between the two groups of mice (Table 2). Only a trial effect was observed, emergence latencies being higher on the second trial than the first ($F(1,19)=15.9$, $P < 0.001$). [Insert Table 2]

3.4 Motor coordination

Motor coordination was assessed on stationary beam, coat-hanger, and rotorod tests. On the stationary beam (Table 3), none of the mice fell off the bar and distance travelled was similar for CORT-treated mice and controls ($P > 0.05$). Likewise, CORT-treated mice did not differ from

controls ($P > 0.05$) on any measure of the coat-hanger (Table 3). [Insert Table 3] However, CORT-treated mice remained on the rotorod (Fig. 4) longer than control-treated mice ($F(1,19)=4.83$, $P < 0.05$). There was a borderline interaction ($F(11,209)=1.69$, $P = 0.078$) but no trial effect ($F(11,209)=1.52$, $P > 0.05$). In view of the borderline interaction, we examined each day separately. A trial effect appeared on day 1 ($F(3,57)=7.7$, $P < 0.001$) but tapered off on the two subsequent days in the control group. [Insert Figure 4].

3.5 Spatial learning and visuomotor control

Only the day factor was significant for quadrants traversed ($F(4,76)=2.79$, $P < 0.01$) and escape latencies ($F(4,76)=10.18$, $P < 0.001$) during acquisition of the hidden platform version of the Morris water maze (Fig. 5). In the probe trial, CORT-treated (19.73 ± 2.46 sec) and controls (23.7 ± 2.9 sec) did not differ ($t(19)=1.05$, $P > 0.05$). But when compared with a theoretical value of 15 s, control mice spent more time in the target quadrant than chance ($P < 0.05$, Mann-Whitney) while CORT-treated mice did not ($P > 0.05$). In contrast, CORT-treated mice had a lower number of quadrant entries (- 25 %, $p < 0.05$) and faster escape latencies (- 41 %, $P < 0.05$) than controls in the visible platform subtask. [Insert Figure 5]

3.6 Serum CORT levels

CORT-treated mice had equivalent serum corticosterone levels relative to placebo-treated mice (42.8 ng/mL ± 15.2 and 40.7 ng/mL ± 9.5 , respectively $P > 0.05$).

3.7 Cerebellar morphometry

CORT-treated mice displayed smaller volumes in the simplex lobule (Fig. 6) and larger volumes in crus 2. In particular, simplex granule cell layer thickness decreased, while both molecular and granule cell layer thickness increased in crus 2 (Table 4). No morphological changes were uncovered in motor cortex or striatum (data not shown).

The morphological alterations of the cerebellum were correlated with actimeter measures. Highly significant correlations were observed between granule cell thickness of the simplex lobule and five

parameters altered in the actimeter (r values between -0.74 and -0.83 , $P < 0.001$) when the two groups of mice were considered together, attesting to the link between structure and motor activity. More especially in CORT-treated mice, the decrease in granule cell thickness of the simplex lobule was inversely correlated with fast ambulation movements ($r = -0.77$, $P < 0.05$); correlation factors were somewhat high for slow ambulation movements ($r = -0.74$, $P = 0.052$), fast rears ($r = -0.74$, $p = 0.052$), and slow rears ($r = -0.73$, $P = 0.06$) without reaching significance, perhaps because of the small sample size ($n = 7$). The increased volume in the molecular layer of crus 2 was also positively correlated with slow rears ($r = +0.86$, $P < 0.01$), both results indicating that mice with higher morphological changes were more active. Besides, the increasing volume in the molecular layer of crus 2 was correlated with higher fall latencies of the rotarod when considering the two groups of mice together ($r = +0.59$, $p < 0.05$), but more particularly in CORT-treated mice ($r = +0.82$, $P < 0.05$). [Insert Table 4 and Figure 6]

4. Discussion

CORT-infused mice from P8 to P29 acquired the rotarod task more swiftly as adults than placebo-treated mice. Possible mediation of this effect by the cerebellum is indicated by the positive correlation found between latencies before falling off the rod and increased molecular layer thickness of crus 2, possibly caused by glucocorticoid-mediated alterations in growth factors (Mocchetti et al., 1996). In contrast, rotarod acquisition slowed down in adult mice injected with CORT on P2-P14 (Howard and Granoff, 1968), adult rats injected with dexamethasone on P7 (Benesova and Pavlik, 1989), or mice injected and tested with CORT as adults (Harlé et al., 2017). CORT given on P2-P14 also slowed down the cerebellar-mediated conditioned eye-blink reflex in adult rats (Wilber et al., 2011), but when given on P15-P17 facilitated at P28 trace eye-blink conditioning, a hippocampal-mediated task (Wentworth-Eidsaune et al., 2016), though the latter result depended on type of hormone delivery (Claflin et al., 2005, 2014). On the contrary, dexamethasone injected on P7, P9, and P11 had no effect in mice performing the rotarod at P28 or P29 (Maloney et al., 2011). Rotarod acquisition was likewise undisturbed at P27-P29 in rats injected with dexamethasone on P7 (Ferguson et al., 2001) or adult rats injected with dexamethasone on P4 (Vicedomini et al., 1986). In summary, rotarod acquisition appears especially vulnerable after early onset and prolonged

administration of glucocorticoids, as in the Howard and Granoff (1968) study when cerebellar volume diminished in size (Howard, 1968), illustrating a defect on Purkinje cell maturation, which is major during the first postnatal week for proximal dendrite maturation (Lee et al., 2007).

Positive associations have been obtained between cerebellar size or weight and other types of behavioral performances. In particular, heavier cerebellar weight was correlated with better active avoidance learning in normal rats (Villescas et al., 1979) and larger cerebellar size was correlated with better sensorimotor performance in normal human subjects (Dimitrova et al., 2008) or patients with spinocerebellar atrophy (Hernandez-Castillo et al., 2016, 2017; Richter et al., 2005; Selvadurai et al., 2016). In an opposite manner, crus 1 volume was negatively associated with balance times in a mixed population of young and old human subjects (Bernard and Seidler, 2013). Another factor to consider is that sensorimotor training itself may lead to changes in cerebellar morphology (Ben-Soussan et al., 2015; Kleim et al., 1998, 2007).

In contrast to the rotarod, we found no effect on stationary beam and coat-hanger tests or on any SHIRPA test of postural control. Nevertheless, glucocorticoids administered during the first postnatal week are liable to cause deficits in postural control. Dexamethasone injected on P7, P9, and P11 diminished wheel-running skills in mice tested at P75 or P88 and reduced their latencies before falling from an inverted screen at P25, though not at P26 (Maloney et al., 2011). In addition, latencies before turning up on an inclined surface increased at P8 in rats injected with dexamethasone on P7 (Ferguson et al., 2001) and rats injected with dexamethasone on P3-P6 had lower scores at P7 for forelimb placing and postural extension reflexes and at P14 for postural and vibrissa reflexes (Flagel et al., 2002). Pellet-reaching was less precise after CORT in rats injected and tested as adults (Metz et al., 2005) or after combined administration of dexamethasone and aldosterone (Jadavji et al., 2011).

The body weight of our CORT-treated mice was equivalent to that of controls. Likewise, body weight was unchanged in rats at P11-P90 (Casolini et al., 1997; Catalani et al., 2002) and adult mouse offspring (De Filippis et al., 2013) of CORT-administered lactating dams. However, body weight may decrease when glucocorticoids are given prior to the second postnatal week. Rat pups injected

with dexamethasone on P3-P6 weighed less than controls at P4-P8, P14, and P20 (Flagel et al., 2002) and those injected on either P4 (DeKosky et al., 1982) or P7 (Benesova and Pavlik, 1989; Ferguson and Holson, 1999; Ferguson et al., 2001) weighed less as adults. Other neonatal treatments affect only neonatal measures, as when rat pups injected with dexamethasone on P3 weighed less at P7-P28 but not P112 (Ferguson and Holson, 1999) and mouse pups injected with dexamethasone on P7, P9, and P11 weighed less at P9-P28 but not P43 (Maloney et al., 2011). CORT given to mouse dams in drinking water on gestational days 14-21 reduced offspring weight at P25-37 but not P112-P170 (Ceci et al., 2014).

Motor activity increased in our CORT-injected mice exploring the viewing jar at P22 and the open-field at P29 and 3 months. Likewise, open-field horizontal and vertical activities augmented in adult mouse offspring of dams receiving CORT in drinking water from the beginning of the third week of pregnancy until weaning (Pechnick et al., 2006), as did wheel-running activity at P14 and P16-P26 in CORT-injected mice on P2-P14 (Howard and Granoff, 1968). Moreover, a single dexamethasone dose on P7 increased rat open-field activity and rears at P18-P21 (Ferguson and Holson, 1999) and 8 months (Benesova and Pavlik, 1989). Yet the same dexamethasone injection on P7 diminished rat open-field activity at P48-P51 without affecting such behavior at P105-P107 (Ferguson et al., 2001). Moreover, open-field ambulation and rears declined in adult rats after dexamethasone injections on P1, P3, and P5 (Felszeghy et al., 1993), as did open-field activity at 2 and 4 months of age in CORT-injected mice on P2-P14 (Howard and Granoff, 1968). However, CORT given to mouse dams in drinking water on gestational days 14-21 reduced home cage but not open-field activity (Ceci et al., 2014) and dexamethasone injected on P7, P9, and P11 had no effect on open-field activity in mice at P21 (Maloney et al., 2011), nor did open-field or home cage activity change in adult mouse offspring of dams given CORT in drinking water on P1-P7 (De Filippis et al., 2013) or open-field activity in rats at P21 after dexamethasone injections on P3-P6 (Flagel et al., 2002). Thus, motor activity effects differ depending on time of administration and evaluation. Our findings of hyperactivity are in line with those of Pechnick et al. (2006), Howard and Granoff (1968),

Ferguson and Holson (1999), and Benesova and Pavlik (1989), but either no effect or hypoactivity is found when glucocorticoids are administered prior to the second postnatal week.

Our finding of elevated ambulatory mobility was correlated with a thinner granule cell layer of the simplex lobule. But higher slow-paced vertical mobility was correlated with a thicker molecular layer of crus 2, illustrating a bidirectional structuro-functional link. In support of a cause-and effect relation is the finding of hyperactivity in several mouse mutants with early-onset cerebellar atrophy and ataxia (Lalonde and Strazielle, 2007) as well as in rats with cerebellar cortical depletion caused by repeated X-ray exposures on P8-P15 or P12-P15 (Pellegrino and Altman, 1979). Known regulators of dendritic spine development and plasticity (Liston and Gan, 2011), glucocorticoids may play a direct role in the architectonic organization of the cerebellar cortex or an indirect one via changes in calcium currents, extracellular glutamate, and NMDA receptors (Jacobs et al., 2006; Li et al., 2014; Mori and Mishina, 2003).

Unlike the open-field, no hormone effect was discerned on our other exploration tests such as spontaneous alternation, though this assay derives from brain development occurring during the course of the second postnatal week (Egger et al., 1973). Likewise, adult spontaneous alternation in rats was intact when CORT was administered in drinking water on P1-P10 (Macri et al., 2018). In a similar manner, emergence latencies were unchanged in our study and at P57 in rats injected with dexamethasone on P7 (Ferguson et al., 2001) or at P28 when injected on P3-P6 (Flagel et al., 2002). Moreover, no change occurred on the elevated plus-maze in our study or on the elevated zero-maze in adult mouse offspring of dams given CORT in drinking water on P1-P7 (De Filippis et al., 2013). In contrast, open arm duration of the elevated plus-maze augmented in adult rat offspring of dams supplemented with CORT in drinking water from day 1 postpartum to weaning (Catalani et al., 2000, 2002). But when CORT was given to mouse dams in drinking water only on gestational days 14-21, open sector duration of the elevated zero-maze diminished in the offspring at P80 (Ceci et al., 2014). Thus, a change in anxiety levels in elevated plus- or zero-mazes has so far been detected only with glucocorticoid administration started prior to the second postnatal week. In different tests, rat offspring of dams given CORT in drinking water on P2–P14 or pups given the hormone via osmotic

micropumps on P7-P14 increased adult conditioned freezing and extinction (Callaghan and Richardson 2014).

In a similar manner to rotorod facilitation, CORT administration facilitated visuomotor control in the visible platform subtask in the Morris water maze without affecting acquisition of the hidden platform subtask. This facilitation occurred in the form of lower escape latencies and quadrant entries, indicating that the mice reached the platform sooner by swimming a more direct course. Likewise, CORT infused in drinking water to rat dams on P5-P9 or P13-P17 improved the visible platform subtask of the pups at P21 (McCormick et al., 2001). Also as in our study, CORT administered in drinking water to lactating rat dams had no effect on the hidden platform subtask of 16-day old offspring (Casolini et al., 1997) and even shortened latencies before reaching the hidden platform in 1, 2, and 3-month-old offspring (Catalani et al., 1993, 2002), though no effect occurred on the visible platform subtask conducted at 3 months (Catalani et al., 1993). But when glucocorticoids were administered during the first postnatal week, water maze performances worsened (DeKosky et al., 1982; Ferguson et al., 2001; Howard and Granoff, 1968; Vicedomini et al., 1986), such results underlining again that Purkinje cell maturation is particularly vulnerable during the first postnatal week while it is crucial for the following development of the cerebellar cortex. We only found a slight deficit in the probe trial. Despite the lack of an intergroup difference, CORT-injected mice had chance levels of performance in contrast to placebo-injected mice performing above chance. Probe trial performance diminished in juvenile mice treated with CORT combined with restraint stress, not CORT alone (Ngoupaye et al., 2018).

The present findings clearly demonstrate the long-term impact of CORT administration during the postnatal period. Several studies in animals and humans recently highlighted the role of the cerebellum on psychomotor or psychiatric disorders (Frye and Llaneza, 2010; Peng et al., 2011; Stoodley et al., 2017). An ongoing neurochemical study should permit linking the behavior phenotype to brain modifications.

Acknowledgements: This research received intra-mural funding from the University of Lorraine.

References

- Altman, J., 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external granular layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neurol.*, 145, 353-398.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5044254>
- Bali, A., Jaggi, A.S., 2015. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur. J. Pharmacol.* 746, 282-92. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446911>
- Benesova, O., Pavlik, A., 1985. Brain glucocorticoid receptors and their role in behavioural teratogenicity of synthetic glucocorticoids. *Arch. Toxicol., Suppl.* 8, 73-76.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3868384>
- Benesova, O., Pavlik, A., 1989. Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology* 28, 89-97.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2927582>
- Ben-Soussan, T.D., Piervincenzi, C., Venditti, S., Verdone, L., Caserta, M., Carducci, F., 2015. Increased cerebellar volume and BDNF level following quadrato motor training. *Synapse* 69, 1-6.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311848>
- Bernard, J.A., Seidler, R.D., 2013. Relationships between regional cerebellar volume and sensorimotor and cognitive function in young and older adults. *The Cerebellum* 12, 721-737.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625382>
- Bolam, J.P., 1992. *Experimental Neuroanatomy: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Brydges, N.M., 2016. Pre-pubertal stress and brain development in rodents. *Curr. Op. Behav. Sci.* 7, 8-14.
<https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.08.003>

- Buckner, R.L., 2013. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron* 80, 807-815. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183029>
- Callaghan, B.L., Richardson, R. 2014. Early emergence of adult-like fear renewal in the developing rat after chronic corticosterone treatment of the dam or the pups. *Behav. Neurosci.* 128, 594-602.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25150542>
- Casolini, P., Cigliana, G, Alemà, GS, Ruggieri, V., Angelucci, L., Catalani, A., 1997. Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience* 79, 1005-1012. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219963>
- Caston, J., Vasseur, F., Stelz, T., Chianale, C., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J., 1995. Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: studies in intact and cerebellectomized *lurcher* mutant mice. *Dev. Brain Res.* 86, 311-316. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656422>
- Catalani, A., Casolini, P., Scaccianoce, S., Patacchioli, F.R., Spinozzi, P., Angelucci, L., 2000. Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. *Neuroscience* 100, 319-325.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11008169>
- Catalani, A., Casolini, P., Cigliana, G., Scaccianoce, S., Consoli, C., Cinque, C., Zuena, A.R., Angelucci, L.. 2002. Maternal corticosterone influences behavior, stress response and corticosteroid receptors in the female rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 105-114.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076729>
- Catalani, A., Marinelli, M., Scaccianoce, S., Nicolai, R., Muscolo, L.A., Porcu, A., Korányi, L., Piazza, P.V., Angelucci, L., 1993. Progeny of mothers drinking corticosterone during lactation

has lower stress-induced corticosterone secretion and better cognitive performance. *Brain Res.* 624, 209-215. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252393>

Ceci, C., Mela, V., Macrì, S., Marco, E.M., Viveros, M.P., Laviola, G., 2014. Prenatal corticosterone and adolescent URB597 administration modulate emotionality and CB1 receptor expression in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 2131-2144. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24311359>

Claflin, D.I., Greenfield, L.R., Hennessy, M.B., 2014. Modest elevation of corticosterone in preweanling rats impairs subsequent trace eyeblink conditioning during the juvenile period. *Behav. Brain Res.* 258, 19-26. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24140564>

Claflin, D.I., Hennessy, M.B., Jensen, S., 2005. Sex-specific effects of corticosterone on hippocampal-mediated learning in young rats. *Physiol. Behav.* 85, 159-166. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869769>

Cole, J.C., Rodgers, R.J., 1993. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.* 4, 573-580. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224226>

Contestabile, A , 2000. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.* 32, 476-509. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760552>

De Filippis, B., Ricceri, L., Fuso, A., Laviola, G., 2013. Neonatal exposure to low dose corticosterone persistently modulates hippocampal mineralocorticoid receptor expression and improves locomotor/exploratory behaviour in a mouse model of Rett syndrome. *Neuropharmacology* 68, 174-183. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22709945>

DeKosky, S.T., Nonneman, A.J., Scheff, S.W., 1982. Morphologic and behavioral effects of perinatal glucocorticoid administration. *Physiol. Behav.* 29, 895-900. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7156227>

Dember, WN, Fowler H., 1958. Spontaneous alternation behavior. *Psychol. Bull.* 55, 412-428.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13602020>

DiMattia, B.D., Kesner R.P., 1988. Spatial cognitive maps: differential role of parietal cortex and hippocampal formation. *Behav. Neurosci.* 102, 471-480.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3166721>

Dimitrova, A., Gerwig, M., Brol, B., Gizewski, E.R., Forsting, M., Beck, A., Aurich, V., Kolb, F.P., Timmann D., 2008. Correlation of cerebellar volume with eyeblink conditioning in healthy subjects and in patients with cerebellar cortical degeneration. *Brain Res.* 1198, 73-84.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18262502>

Egger, G.J., Livesey, P.J., Dawson, RG., 1973. Ontogenic aspects of central cholinergic involvement in spontaneous alternation behavior. *Dev. Psychobiol.* 6, 289-299.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4793359>

Felszeghy, K., Sasvári, M., Nyakas, C., 1993. Behavioral depression: opposite effects of neonatal dexamethasone and ACTH-(4-9) analogue (ORG 2766) treatments in the rat. *Horm. Behav.* 27, 380-396.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225260>

Ferguson, S.A., Holson, R.R., 1999. Neonatal dexamethasone on day 7 causes mild hyperactivity and cerebellar stunting. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 71-76.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10023803>

Ferguson, S.A., Paule, M.G., Holson, R.R., 2001. Neonatal dexamethasone on day 7 in rats causes behavioral alterations reflective of hippocampal, but not cerebellar, deficits. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 57-69. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274876>

Flagel, S.B., Vázquez, D.M., Watson, S.J. Jr., Neal, C.R. Jr. 2002. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. *Am. J. Physiol.-Regul. Integ. Comp. Physiol.* 282, R55-R63. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742823>

- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Frye, C.A., Llaneza, D.C., 2010. Corticosteroid and neurosteroid dysregulation in an animal model for autism, BTBR mice. *Physiol. Behav.* 100, 264-267. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20298706>
- Harlé, G., Lalonde, R., Fonte, C., Ropars, A., Fripiat, J.-P., Strazielle, C., 2017. Repeated corticosterone injections in adult mice alter stress hormonal receptor expression in the cerebellum and motor coordination without affecting spatial learning. *Behav. Brain Res.* 326, 121-131. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263830>
- Heim, C., Binder, E.B., 2012. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp. Neurol.* 233, 102-111. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101006>
- Hernandez-Castillo, C.R., Diaz, R., Campos-Romo, A., Fernandez-Ruiz, J., 2017. Neural correlates of ataxia severity in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Cerebell. Atax.* 4, 7. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28593048>
- Hernandez-Castillo, C.R., Galvez, V., Diaz, R., Fernandez-Ruiz, J., 2016. Specific cerebellar and cortical degeneration correlates with ataxia severity in spinocerebellar ataxia type 7. *Brain Imaging Behav.* 10, 252-257. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917872>
- Howard E., 1968. Reductions in size and total DNA of cerebrum and cerebellum in adult mice after corticosterone treatment in infancy. *Exp. Neurol.* 22, 191-208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5724943>
- Howard E., Granoff, D.M., 1968. Increased voluntary running and decreased motor coordination in mice after neonatal corticosterone implantation. *Exp. Neurol.* 22, 661-673. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5709812>

- Jacquelin, C., Lalonde, R., Jantzen-Ossola, C., Strazielle, C., 2013. Neurobehavioral performances and brain regional metabolism in *Dab1(scm)* (scrambler) mutant mice. *Behav. Brain Res.* 252, 92-100.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707934>
- Jacobs, C.M., Trinh, M.D., Rootwelt, T., Lømo, J., Paulsen, RE., 2006. Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg^{2+} in cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1070, 116-123.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403471>
- Jadavji, N.M., Supina, R.D., Metz G.A., 2011. Blockade of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors reverses stress-induced motor impairments. *Neuroendocrinology* 94, 278-290.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024815>
- Joyal, C.C., Meyer, C., Jacquart, G., Mahler, P., Caston, J., Lalonde, R., 1996. Effects of midline and lateral cerebellar lesions on motor coordination and spatial orientation. *Brain Res.* 739, 1-11.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955918>
- Katyare, S.S., Balasubramanian, S., Parmar, D.V., 2003. Effect of corticosterone treatment on mitochondrial oxidative energy metabolism in developing rat brain. *Exp. Neurol.* 183, 241-248.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957507>
- Kleim, J.A., Markham, J.A., Vij K., Freese, J.L., Ballard, D.H., Greenough, W.T., 2007. Motor learning induces astrocytic hypertrophy in the cerebellar cortex. *Behav. Brain Res.* 178, 244-249.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257689>

- Kleim, J.A., Swain, R.A., Armstrong, K.A., Napper, R.M., Jones, T.A., Greenough, W.T., 1998. Selective synaptic plasticity within the cerebellar cortex following complex motor skill learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 69, 274-289. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707490>
- Lalonde, R., 2002. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 91-104.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835987>
- Lalonde, R., Barraud, H., [Ravey, J.](#), Guéant, J.L., Bronowicki, J.P., Strazielle, C., 2008. Effects of a B-vitamin-deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice. *Brain Res.* 1188, 122-31.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061153>
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Strazielle, C., 2005. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav. Brain Res.* 157, 91-98.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617775>
- Lalonde, R., Strazielle, C., 2015. Behavioral effects of neonatal lesions on the cerebellar system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 43, 58-65. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907855>
- Lalonde, R., Strazielle, C., 2007. Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain Res.* 1140, 51-74.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16499884>
- Lee, K.H., Bishop, G.A., Tian, J.B., Jang, Y.J., Bui, B.C., Nguyen, T.X., Ahn, J.Y., King, J.S., 2007. Cellular localization of the full-length isoform of the type 2 corticotropin releasing factor receptor in the postnatal mouse cerebellar cortex. *J. Neurosci. Res.* 85,1996-2005.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17471557>

- Le Marec, N., Stelz, T., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J., Caston, J., 1997. Effect of cerebellar granule cell depletion on learning of the equilibrium behaviour: study in postnatally X-irradiated rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2472-2478. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464941>
- Li, S.-X., Fujita, Y., Zhang, J.-C., Ren, Q., Ishima, T., Wu, J., Hashimoto, K., 2014. Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiol. Dis.* 62, 124-134. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051277>
- Liston, C., Gan, W.-B., 2011. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16074-16079. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911374>
- Macrì S, Spinello C, Widomska J, Magliozzi R, Poelmans G, Invernizzi RW, Creti R, Roessner V, Bartolini E, Margarit I, Glennon J, Laviola G, 2018. Neonatal corticosterone mitigates autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus in mice. *Sci. Rep.* 8 (1), 10188, 2018. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29976948>
- Maloney, S.E., Noguchi, K.K., Wozniak, D.F., Fowler, S.C., Farber, N.B., 2011. Long-term effects of multiple glucocorticoid exposures in neonatal mice. *Behav. Sci. (Basel)* 1, 4-30. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22375274>
- McCormick, C.M., Rioux, T., Fisher, R., Lang, K., MacLaury, K., Teillon, S.M., 2001. Effects of neonatal corticosterone treatment on maze performance and HPA axis in juvenile rats. *Physiol. Behav.* 74, 371-379. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714502>
- McEwen, B.S., 1987. Steroid hormones and brain development: some guidelines for understanding actions of pseudohormones and other toxic agents. *Env. Health Persp.* 74, 177-184. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2826119>

- Metz, G.A., Jadavji, N.M., Smith L.K., 2005. Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1190-1200.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176362>
- Mocchetti, I., Spiga, G., Hayes, V.Y., Isackson, P.J., Colangelo, A, 1996. Glucocorticoids differentially increase nerve growth factor and basic fibroblast growth factor expression in the rat brain. *J. Neurosci.* 16, 2141-2148. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604057>
- Mori, H., Mishina, M., 2003. Roles of diverse glutamate receptors in brain functions elucidated by subunit-specific and region-specific gene targeting. *Life Sci.* 74, 329-336.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607261>
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7088155>
- Ngoupaye, G.T., Yassi, F.B., Bahane, D.A.N., Bum E.N, 2018. Combined corticosterone treatment and chronic restraint stress lead to depression associated with early cognitive deficits in mice. *Metab. Brain Dis.* 33, 421-431. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29199383>
- Noblett, K.L., Swain, R.A., 2003. Pretraining enhances recovery from visuospatial deficit following cerebellar dentate nucleus lesion. *Behav. Neurosci.* 117, 785-798.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12931963>
- Noguchi, K.K., 2014. Glucocorticoid induced cerebellar toxicity in the developing neonate: implications for glucocorticoid therapy during bronchopulmonary dysplasia. *Cells* 3, 36-52.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501683>
- Noguchi, K.K., Lau, K., Smith, D.J., Swiney, B.S., Farber, N.B., 2011. Glucocorticoid receptor stimulation and the regulation of neonatal cerebellar neural progenitor cell apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 43, 356-363. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530661>

- Noguchi, K.K., Cabrera, O.H., Swiney, B.S., Salinas-Contreras, P., Smith, J.K., Farber, N.B., 2015. Hedgehog regulates cerebellar progenitor cell and medulloblastoma apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 83, 35-43.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319366>
- Noguchi, K.K., Walls, K.C., Wozniak, D.F., Olney, J.W., Roth, K.A., Farber, N.B., 2008. Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ.* 15, 1582-1592.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600230>
- Oitzl, M.S., Champagne, D.L., Van der Veen, R., de Kloet, E.R., 2010. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 853-866.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631685>
- Ordyan, N.E., Pivina, S.G., Rakitskaya, V.V., Shalyapina, V.G., 2001. The neonatal glucocorticoid treatment-produced long-term changes of the pituitary-adrenal function and brain corticosteroid receptors in rats. *Steroids* 66, 883-888.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711116>
- Ozawa, H., 2005. Steroid hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J. Nippon Med. Sch.* 72, 316-325.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415511>
- Paré, W.P., Tejani-Butt, S., Kluczynski J., 2001. The emergence test: effects of psychotropic drugs on neophobic disposition in Wistar Kyoto (WKY) and Sprague Dawley rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25, 1615-1628.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11642658>
- Pechnick, R.N., Kariagina, A., Hartvig, E., Bresee, C.J., Poland, R.E., Chesnokova, V.M., 2006. Developmental exposure to corticosterone: behavioral changes and differential effects on

leukemia inhibitory factor (LIF) and corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)* 185, 76-83.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416158>

Pellegrino L.J., Altman, J., 1979. Effects of differential interference with postnatal cerebellar neurogenesis on motor performance, activity level, and maze learning of rats: a developmental study. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 1-33. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/571876>

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480>

Peng, J., Liu, J., Nie, B., Li, Y., Shan, B., Wang, G., Li, K. 2011. Cerebral and cerebellar gray matter reduction in first-episode patients with major depressive disorder: a voxel-based morphometry study. *Eur. J. Radiol.* 80, 395-399. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466498>

Richter, S., Dimitrova, A., Maschke, M., Gizewski, E., Beck, A., Aurich, V., Timmann, D., 2005. Degree of cerebellar ataxia correlates with three-dimensional mri-based cerebellar volume in pure cerebellar degeneration. *Eur. Neurol.* 54, 23-27.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088175>

Rogers, D.C., Jones, D.N., Nelson, P.R., Jones, C.M., Quilter, C.A., Robinson, T.L., Hagan, J.J., 1999. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 105, 207-217.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563494>

Roskoden, T., Linke, R., Schwegler H., 2005. Transient early postnatal corticosterone treatment of rats leads to accelerated acquisition of a spatial radial maze task and morphological changes in the septohippocampal region. *Behav. Brain Res.* 157, 45-53.

<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617770>

- Rousselet, G.A., Pernet, C.R. , 2012. Improving standards in brain-behavior correlation analyses. *Front. Hum. Neurosci.* 6, 119. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563313>
- Rugiero-Vargas, C., Ramirez-Escoto, M., DelaRosa-Rugiero, C., Rivas-Manzano, P., 2007. Prenatal corticosterone influences the trajectory of neuronal development, delaying or accelerating aspects of the Purkinje cell differentiation. *Histol. Histopathol.* 22, 963-969.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17523073>
- Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 396, 64-76.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3011218>
- Selvadurai, L.P., Harding, I.H., Corben, L.A., Stagnitti, M.R., Storey, E., Egan, G.F., Delatycki, M.B., Georgiou-Karistianis, N., 2016. Cerebral and cerebellar grey matter atrophy in Friedreich ataxia: the IMAGE-FRDA study. *J. Neurol.* 263, 2215-2223.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27522354>
- Stoodley, C.J., Schmahmann, J.D., 2010. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex* 46, 831-844.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152963>
- Stoodley, C.J., D’Melleo, A.M., Ellegood, J., Jakkamsetti, V., Liu, P., Nebel, M.B., Gibson, J.M., Kelly, E., Meng, F., Cano, C.A., Pascual, J.M., Mostofsky, S.H., Lerch, J.P., Tsai, P.T., 2017. Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nature Neurosci.* 20, 1744-1751.
- <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184200>

- Timmann, D., Brandauer, B., Hermsdörfer, J., Ilg W, Konczak, J., Gerwig, M., Gizewski, E.R., Schoch, B., 2008. Lesion-symptom mapping of the human cerebellum. *Cerebellum* 7, 602-606.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949530>
- Velazquez, P.N., Romano, M.C., 1987. Corticosterone therapy during gestation: effects on the development of rat cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 5, 189-194.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3503497>
- Vicedomini, J.P., Nonneman, A.J., DeKosky S.T., Scheff, S.W., 1986. Perinatal glucocorticoids disrupt learning: a sexually dimorphic response. *Physiol. Behav.* 36 145-149.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3952174>
- Villescas, R., Zamenhof, S., Guthrie D., 1979. The effects of early stress and undernutrition on the behavior of young adult rats and the correlations between behavioral and brain parameters. *Physiol. Behav.* 23, 945-954. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/118473>
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482-504.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582919>
- Wentworth-Eidsaune, C.L., Hennessy, M.B., Claflin, D.I., 2016. Short-term, high-dose administration of corticosterone by injection facilitates trace eyeblink conditioning in young male rats. *Behav. Brain Res.*, 298, 62-68. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26239002>
- Wilber, A.A., Lin, G.L., Wellman, C.L., 2011. Neonatal corticosterone administration impairs adult eyeblink conditioning and decreases glucocorticoid receptor expression in the cerebellar interpositus nucleus. *Neuroscience* 177, 56-65. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21223994>
- Yamasaki, S., Ohmori, H., Yamashita, K., Yasuda, M., 2001. A morphometric study on postnatal development of the external granular layer of mice cerebella, focusing on local difference. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 50, 53-60.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480462>

Zhang, C., Hua, T., Zhu, Z., Luo, X., 2006. Age-related changes of structures in cerebellar cortex of cat. *J. Biosci.*, 31, 55-60.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595875>

Table 1 Number of controls (n=10) and CORT-treated mice (n=11) displaying specific behaviors of the SHIRPA primary screen measured in the viewing jar and the open field at P15 and P22.

TESTS		P15		P22	
		Control %	CORT %	Control %	CORT %
Jar (5 min) Body position	Setting and standing	60	46	90	82
	Rearing	40	54	10	18
Activity	Slow mvt	20	37	50	0*
	Moderate mvt	80	54	50	82*
	Vigorous darting mvt	0	9	0	18*

Tremor	None	90	91	90	73
	Mild	10	9	10	27
Open-field (30 s)					
Arousal transfer	Prolonged freeze, slight mvt	20	0	10	9
	Extended freeze, moderate mvt	0	0	20	0
	Brief freeze, active mvt	10	0	20	17
	Momentary freeze, swift mvt	60	73	50	55
	No freeze, immediate mvt	10	27	0	19
Startle	None	30	27	30	0
	Preyer reflex	70	73	40	55
	Jump less than 1 cm	0	0	30	45
Touch escape	No response	100	92	50	37
	Mild	0	0	50	36
	Moderate	0	8	0	18
	Vigorous	0	0	0	9
Body measurements	Weight (g)	6.7	6.5	7.6	7.7
	Length (cm)	5.2	5.1	5.6	5.7

*p < 0.05 vs. controls (χ^2 test); mvt = movement

Table 2. Mean (\pm SEM) number of arm entries and duration by control and CORT-treated mice at 3 months of age in the elevated plus-maze and latencies before emerging from a small toy object with two or four paws for 2 trials

	Control	CORT
Elevated plus-maze		
Open arm entries	2.2 \pm 0.6	4.1 \pm 0.7
Enclosed arm entries	4.6 \pm 0.6	5.8 \pm 0.8
Open/total arm entries	0.36 \pm 0.08	0.45 \pm 0.06
Open arm duration (s)	68.6 \pm 28.0	97.8 \pm 23.5
Enclosed arm duration (s)	221.4 \pm 27.7	202.2 \pm 23.5
Open /total arm duration (s)	0.23 \pm 0.09	0.33 \pm 0.08
Emergence		
Trial 1-2 paws (s)	92.7 \pm 31.6	62.1 \pm 18.8
Trial 1-4 paws (s)	137.5 \pm 41.7	74.7 \pm 20.1
Trial 2-2 paws (s)	172.6 \pm 40.6	137.3 \pm 30.1
Trial 2-4 paws (s)	174.0 \pm 40.3	158.8 \pm 33.6

Table 3. Motor coordination (means \pm SEM) of control and CORT-treated mice at 3 months of age in stationary beam and coat-hanger tests

	Control	CORT
Stationary beam		
Segments	84.9 \pm 6.7	75.8 \pm 8.9
Fall latencies (s)	60 \pm 0	60 \pm 0
Fall number	0 \pm 0	0 \pm 0
Coat-hanger		
MT-1 (s)	55.5 \pm 9.3	43.9 \pm 11.3
MT-2 (s)	94.2 \pm 11.7	82.1 \pm 13.6
MT-3 2 paws (s)	158.8 \pm 13.1	124.8 \pm 12.3
MT-4 3 paws (s)	204.6 \pm 8.5	191.2 \pm 12.9
MT-5 4 paws (s)	220.0 \pm 4.6	207.3 \pm 9.4
MT-6 Midway (s)	234.7 \pm 2.7	227.6 \pm 6.2
MT-7 Top (s)	236.1 \pm 3.6	234.6 \pm 2.9
Fall latencies (s)	212.2 \pm 13.9	210.3 \pm 11.0
Fall number	0.7 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2

Table 4. Thickness variations for granular and molecular layers of dorsal posterior lobules of the cerebellar hemispheric cortex between control and CORT-treated mice at 3 months of age. Purkinje cell layer is included in the molecular layer measure

CEREBELLUM				
	Simplex	Crus 1	Crus 2	Paramedian
Molecular	- 8%	- 10%	+ 13% *	- 6%
Granular	- 21% **	- 10%	+ 12% **	- 4%

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – unpaired *t*-test

Figure legends

Fig. 1 Exploratory activity in the actimeter (means \pm SEM) at P29 by control and CORT-treated mice

FM = fast ambulation movements; FR = fast rears; FS : fast stereotypies; SM = slow ambulation movements; SR = slow rears; SS = slow stereotypies (* $p < 0.05$ – unpaired t-test)

Fig. 2 Exploratory activity in the actimeter (means \pm SEM) in adults (3 months) by control and CORT-treated mice

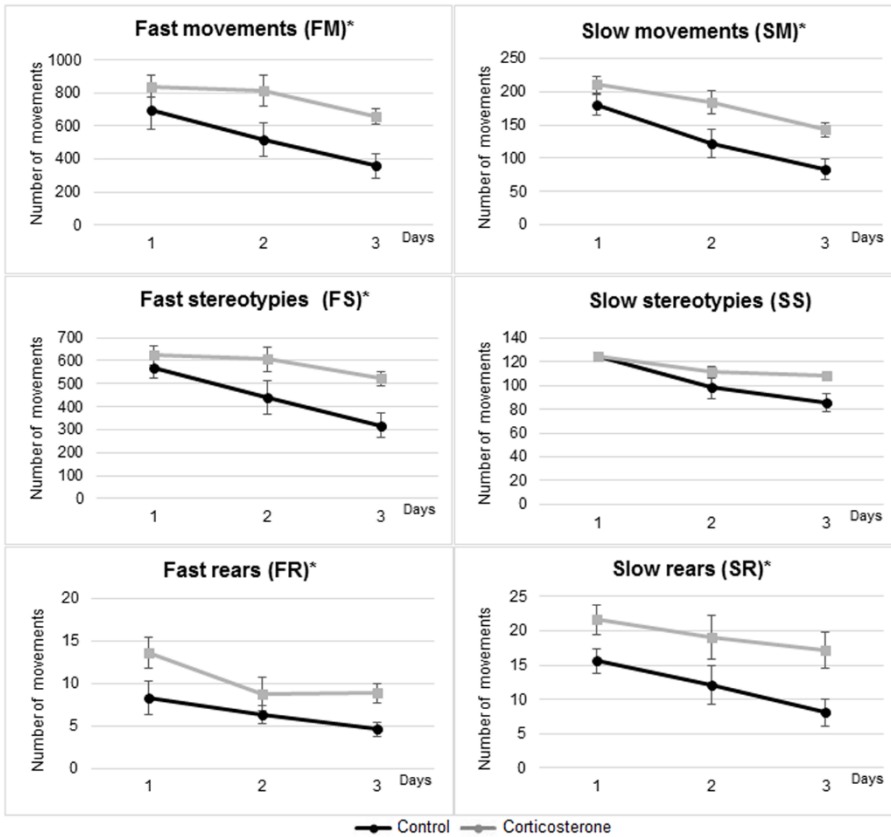
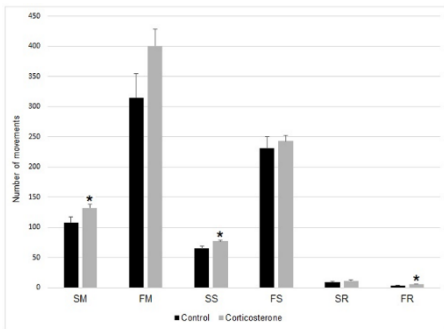
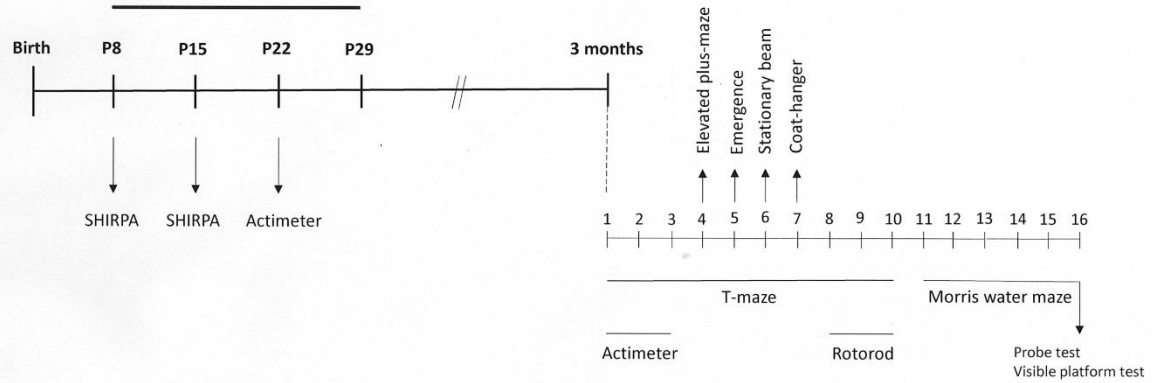
FM = fast ambulation movements; FR = fast rears; FS = fast stereotypies; SM = slow ambulation movements; SR = slow rears; SS = slow stereotypies (* $p < 0.05$ – unpaired t-test)

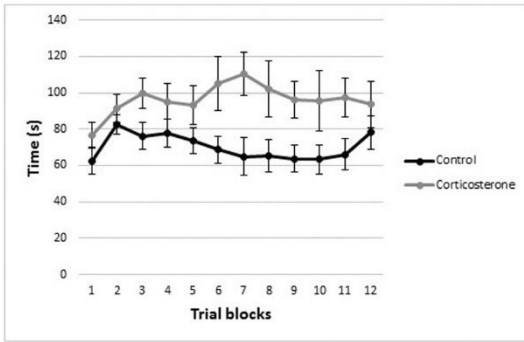
Fig. 3 Latencies before falling (means \pm SEM) from the rotarod by control and CORT-treated mice at 3 months of age (8 trials/day with 2 trial combined latencies for each score)

Fig. 4 Daily quadrant entries and escape latencies (s) in 4-trial sessions (means \pm SEM) during acquisition of the hidden platform version of the Morris water maze and during the visible platform version by control and CORT-treated mice at 3 months of age (* $p < 0.05$ – unpaired t-test)

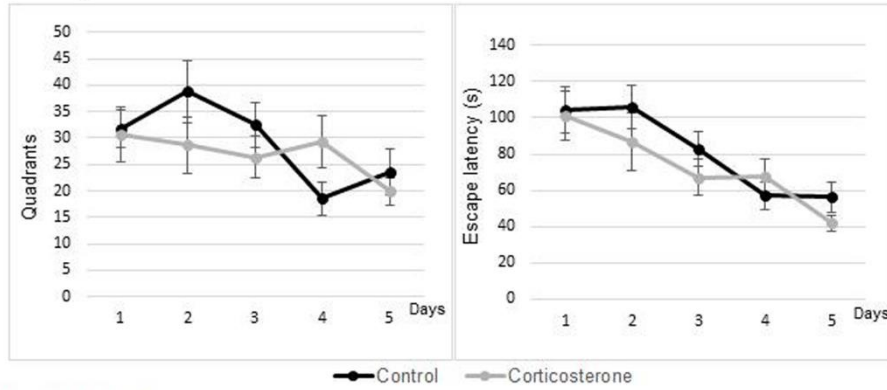
Chronic injections (21 days)

Corticosterone 20 mg/kg : corticosterone group (n=11)
 DMSO : control group (n=10)

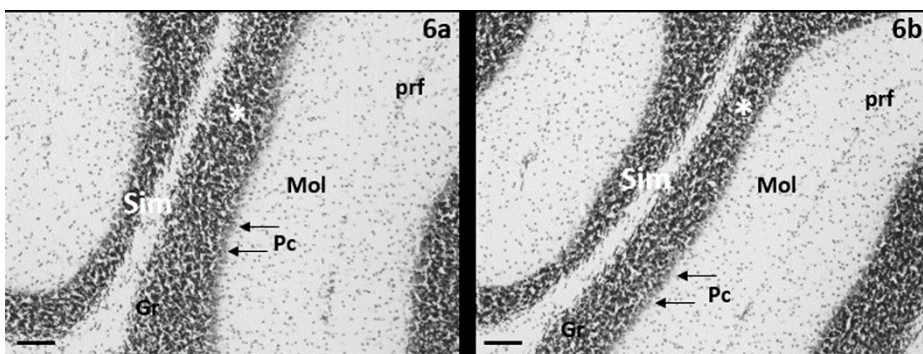
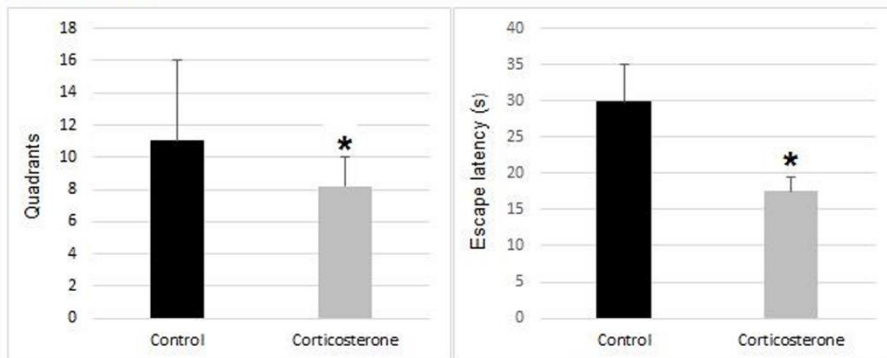




Hidden platform



Visible platform



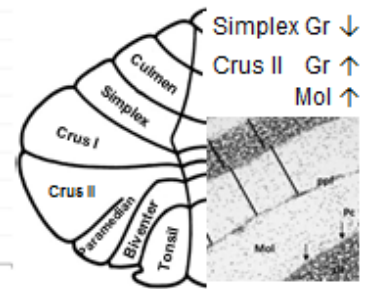
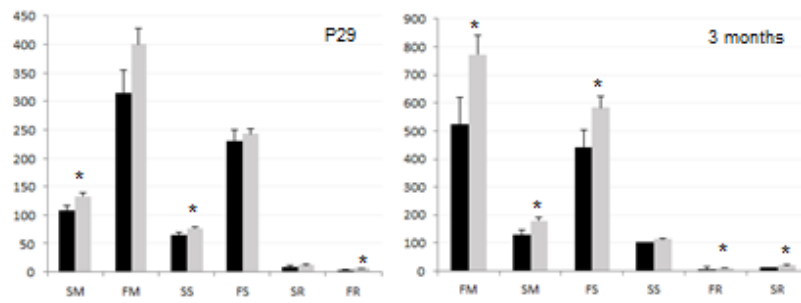
CORTICOSTERONE Chronic injections from postnatal day 8 to 29

↓
Early effects

↓
Long-term effects

MOTOR ACTIVITY in ACTIMETER

CEREBELLAR MORPHOLOGY



Résumé

Plusieurs études ont montré que le cervelet, à l'instar de l'hippocampe, était vulnérable à toutes modifications environnementales telles qu'une exposition à un stress ou un taux supraphysiologique de glucocorticoïdes. Cette vulnérabilité s'observe sur l'organisation cellulaire et moléculaire de ces deux structures et se traduit par des désordres fonctionnels sous forme de déficits moteurs, cognitifs ou émotionnels. Les effets d'un stress chronique sur la mise en place des effecteurs cellulaires de l'hippocampe et du cervelet sont bien rapportés dans la littérature lorsque l'animal subi un stress chronique durant la période embryonnaire. Cependant la période postnatale et plus particulièrement les deux dernières semaines correspondant, pour le cervelet, à la mise en place de la couche granulaire interne et à l'établissement des contacts synaptiques entre les cellules de Purkinje et ses afférences reste peu étudié. Ce travail a donc pour objectif d'étudier cette période cruciale pour la maturation fonctionnelle du cervelet afin de répondre dans un premier temps à deux questions principales : 1) La corticostérone administrée chroniquement chez le souriceau durant cette période pourrait-elle induire un effet délétère sur le développement postnatal du cervelet ? 2) Les glucocorticoïdes sont-ils capables de modifier l'expression de certains facteurs neurotrophiques impliqués dans la mise en place et l'organisation des différents types cellulaires retrouvés au sein du cervelet et *in fine* avoir un impact à long terme sur la fonctionnalité du cervelet ? Pour répondre à ces hypothèses, chaque souriceau a reçu durant 21 jours consécutifs une injection sous-cutanée de corticostérone (20 mg/kg) ou de diméthylsulfoxyde (groupe contrôle) de J8 à J29 PN. Les résultats ont montré qu'une administration chronique de corticostérone de J8 à J29 postnatal avait des effets sur le développement du cervelet et de l'hippocampe qui s'exprimaient au niveau de l'organisation cellulaire des structures et au niveau moléculaire par le biais de certains facteurs impliqués dans l'architecture cellulaire et tissulaire (modification d'expression des gènes codant pour CRH-R1, CRH-R2, GR et GluR δ 2 à J15). Ces effets s'inscrivent à long terme : 1) des modifications morphométriques telles qu'une augmentation d'épaisseur des couches granulaires et moléculaire de Crus II et une diminution d'épaisseur de la couche granulaire de Simplex ; 2) des changements d'activité métabolique régionale observée entre autres dans le cervelet, l'hippocampe, l'amygdale et le noyau vestibulaire latéral et 3) des variations du phénotype sensori-moteur mises en évidence dans l'actimètre, le rotarod et le test de la piscine de Morris, ont été observés à l'âge adulte. Enfin, l'administration chronique de corticostérone équivalente à des situations de stress durant l'enfance a modifié la réponse au stress à l'âge adulte comme l'ont montré les différents dosages des hormones du stress effectués dans l'hypothalamus et l'hippocampe. Cette étude a permis de démontrer qu'une exposition chronique à la corticostérone durant la période postnatale avait des effets immédiats mais aussi un impact à long terme sur la structure et la fonctionnalité du cervelet.

Mots clés : Cervelet, développement postnatal, stress, CRH, sensori-motricité

Abstract

During the prenatal period, the cerebellum is immature and particularly vulnerable to stressors such as repetitive maternal deprivation or supra-physiological glucocorticoid exposure that might impact the normal cerebellar development and its functions. However, the potentials effects of glucocorticoids during the postnatal developmental window from postnatal day 8 (PND8) to PND29 that corresponds to 1) the set-up of climbing fiber innervation on the dendritic arborization of Purkinje cells, 2) granule cell proliferation and migration and 3) Purkinje cell – parallel fibers synaptogenesis, are not well established. So the purpose of the present study was to determine whether 1) chronic corticosterone treatment during this period could affect the development and the maturation of the cerebellum; 2) glucocorticoids could change the expression of genes encoding for several factors involved in the different steps of the cerebellar development; and 3) chronic corticosterone administered during the postnatal period could have long-term effects on cerebellar functions. In the present study, mice were injected with corticosterone (20 mg/kg) or dimethylsulfoxyde (control group) from PND8 to PND29. Results show that chronic corticosterone delivered from PND 8 to 29 affect the cerebellar and hippocampal development: morphological changes and downregulation or upregulation of gene encoding for neurotrophic factor, corticotropin releasing hormone (CRH), were observed at PND 15 and 29. Furthermore, changes in morphological, regional metabolic activity, gene expression, and sensori-motor phenotype were also highlighted at adult period, illustrating the long-term impact of early corticosterone administration on cerebellar development. Finally, chronic corticosterone injection during the postnatal period modified the stress response at adulthood as shown by the stress hormones assays performed in the hypothalamus and hippocampus. This study illustrates the long-effect impact of early in life corticosterone administration on the structure of the cerebellum and cerebellar-mediated functions.

Key words: Cerebellum, development, stress, CRH, motor function