

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR Inserm 930 "Imagerie et Cerveau"

Équipe "Imagerie moléculaire du cerveau"

THÈSE

présentée par :

François-Xavier LEPELLETIER

soutenue le : **20 Septembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François – Rabelais de Tours**

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Neurosciences

EFFETS À LONG TERME D'UNE EXPOSITION PRÉNATALE AU MÉTHYLPHÉNIDATE CHEZ LE RAT

THÈSE dirigée par :

Madame CHALON Sylvie

Directeur de Recherche INSERM, Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur BARROT Michel

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

Monsieur BERQUIN Patrick

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Amiens

JURY :

Monsieur BARROT Michel

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

Madame BELZUNG Catherine

Professeur des Universités, Tours

Monsieur BERQUIN Patrick

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Amiens

Madame CHALON Sylvie

Directeur de Recherche INSERM, Tours

Monsieur GALINEAU Laurent

Maître de Conférences Universitaires, Tours

Monsieur SOLINAS Marcello

Chargé de Recherche CNRS, Poitiers

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier :

Le Professeur Denis Guilloteau, directeur de laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U930.

Le Docteur Sylvie Chalon, Directeur de recherche, pour m'avoir accordé sa confiance et son soutien au cours de ces 3 (et un peu plus) années de thèse, pour son aide précieuse et ses conseils toujours avisés, sa disponibilité, son enthousiasme et ses corrections (sur papier !).

Le Docteur Michel Barrot et le Professeur Patrick Berquin d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Le Professeur Catherine Belzung (équipe 4) ainsi que le docteur Patrick Vourc'h et le professeur Christian Andres (équipe 2) qui m'ont permis d'utiliser leurs installations.

Le Docteur Marcello Solinas du laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques de Poitiers qui m'a permis de réaliser les manip d'auto-administration et de compléter mes travaux.

Je souhaite remercier chaleureusement le Docteur Laurent Galineau, qui m'a encadré, peut-être supporté durant ces années (et inversement !). Tu m'as conseillé, fait réfléchir sur mon sujet, tu m'as appris à prendre du recul par rapport à mon travail. Tu m'as aussi appris au niveau manip, la microdialyse, la seringue de radio (tu sais, là où je te mets la misère maintenant...). Tu m'as aussi éclairé de tes lumières durant toute cette thèse, tu m'as beaucoup aidé, aussi sur la rédaction. Tu m'as aussi conseillé, beaucoup, sur mon avenir, proche ou lointain... Je t'en remercie. Nous avons passé également de bons moments à parler ch'tis : shogun et born again tonight ! À se raconter soirées ou souvenirs, les moments TEP, les moments voitures ensemble, de bons souvenirs... Bref merci !

Je souhaite aussi remercier intensément ceux qui ont partagé ma vie au sein de l'équipe :

Lucas Reboul, merci Doc pour tout, ces soirées, ces moments de délires, le bad (je te battraï !), tes conseils, d'être là quand j'en ai besoin et ça sera toujours réciproque...

Fanny Ledonné, ma stagiaire, la première, tous ces moments que l'on a passé ensemble au labo mais aussi en dehors, j'espère t'avoir été de bons conseils !

Dieter Ory et Liesbeth Haspeslagh, le roi et la reine de Belgique, ces parties de foot devant la fac et dans le couloir du labo, le parc Astérix, la Punto en kit, ces soirées à l'Académia, dans les couloirs du Crous et au Pym's... Une petite menthe à l'eau, né ? Tout sec ? Thanks for all my friends. Et promis, je vous montrerai à quoi sert une blouse.

Stéphanie Fioleau, mlle Avatar, qu'est ce que j'ai pu me moquer de toi ! J'en suis désolé... bon nan c'est pas vrai !

Stéphanie Duval, mon repère caennais ! Je me sentais moins seul grâce à toi ! Ma poupée Blonde ! Maintenant que tu n'es plus là, tout le monde dit que j'ai pris ta place pour mon côté Ken ;)

Julie Jeunot, la petite chimiste, à très vite pour d'autres soirées et week-ends, ambiance électrique !

Frédéric Tantot, merci mon vieux pour ces moments passés dans bâtiment L pour le comportement ! Pour ces stats ;) Et pour les délires ensemble. Bonne continuation.

Valérian Rat, j'espère ne pas avoir été trop dur quand je te faisais bosser avec moi, bonne continuation et bonne réussite à toi. Où est Laurent ?

Brice de la Crompe de la Boissière, mes respects mon seigneur. Merci pour ta gentillesse, ton amitié et ces moments passés ensemble à parler philosophie... Bon courage pour ta thèse vieux.

Inge Vandeveld, un grand merci pour tous les bons moments labo et en dehors que nous avons passé ensemble. À bientôt la belge !

Laurane Pena, un merci à toi également pour ton sourire et les moments passés ensemble en immuno. J'ai fait de toi la reine du montage !

Yun, merci à toi pour ces fous rires et la découverte de ton alphabet, j'attends ton saké !

Gaëlle Merlet, stagiaire de compét', certes on a pas beaucoup bossé ensemble, je t'ai fait découvrir la vie du labo... On s'est surtout retrouver en dehors, la dernière couchée, les retours à deux à pied du centre ville à 6h du mat', que du bonheur ;) Si tu pouvais refaire tes cookies quand tu repasses par chez moi !

Jérôme Durand, ah que j'ai du t'embêté avec mon habitude manip TEP ! Et que tu nous as fait rire quand tu t'es vidé sur le Belge ! Moment d'anthologie... "Julie" : Qui ça ? Je m'en marre encore... Vive le K2R !

Jonathan Bogaerts, petit Belge, c'était cool de d'avoir. Des fous rires, des discussions plus sérieuses, des soirées en tout genre, des petits yeux, des banquettes au Pym's, un pressing (merci Jérôme), un g***y **le, merci pour tout et à très vite. Nan mais franchement, sais-tu où est Laurent ?

Dimitri Cheramy, petit branleur, toujours dans les bons coups, jamais dans les mauvais ! On s'est bien marré, l'attaque de Benji sous la douche restera la meilleure ;) et tu es vraiment un brin moqueur...

Marion Philippe, c'était cool de t'encadrer. J'espère ne pas t'avoir traumatiser ! L'HPLC, l'habitude TEP, je t'en ai donné des trucs chiants à faire ;) T'es quelqu'un sur qui on peut compter, au labo mais aussi en dehors. Prends soin de toi et merci.

Laurence Le Moigno, alias Sylvie de l'amour est dans le pré. Merci pour tous les fous rires au bureau et les petits draw sur iphone :)

Céline Nicolas, la Pictavienne, déjà pas évident de me supporter tout un mois de juillet, bravo ! Et merci pour les bons moments labo à danser la Zumba et Tacata ! Bon courage à toi.

Dorian Sargent, nouveau petit Lucas et Brice, j'espère que ce séjour parmi nous t'as plus ! J'attends toujours que tu me battes à la Powerboule !

Julie Busson, ton rire et ton professionnalisme restera. Beaucoup de bons moments ensemble et désolé pour tous les facebook jacking :) N'oublies pas de mater les ch'tis en re-play après être passée chez Loclerc !! Mais fait gaffe, ça bouche à Monnaie.

Emilie Desfosses, bon courage à toi, je te laisse un lourd héritage et j'espère que mon petit coaching te sera utile. Merci de m'avoir confié Mowgli, il s'en souvient encore ;) Et moi aussi ! Il m'a pété dessus !!! Relax, coupe ta frange (c'est pas du jus d'orange) et bon casse-croûte !

Aurélie Testefort, petite Aurélie, toute sage ! Bonne continuation à toi. Si tu veux un conseil pour ta robe de mariage, fais moi signe !

Charlotte de Vleminck, la toute petite Belge ! Essaie de mettre une veste quand il fait 5 degrés et d'enlever ton écharpe et ton gilet au printemps ;) Ce n'est pas une bonne idée le pansement au pied...;). Tu m'auras fait la VAGUE au Pym's, nan mais allo quoi !

Michiel Peeters, alias Michou ! Ne change pas, tu es amusant ! Perfectionne toi au bad mon ami ! Take care ! Merci pour ces bons moments, né !

Mathilde Rakotoarimanana, j'ai du écorcher ton nom, c'est certain ! J'espère que ton passage au labo te laissera un bon souvenir vieille SB(ureau)F ! Merci pour les -30% chez Morgan.

Claire Tronel, ma petite secrétaire, 4 ans à tes côtés, ça passe vite ! Bon, on s'en est pas si mal sorti que ça. Des hauts et des moins hauts surement, mais au final, une amitié. Merci de m'avoir supporté et de m'avoir soutenu.

Aurélié Doméné, merci pour les phases d'HPLC et tes conseils microscope... Voilà tout est dit ! Bon j'déconne... Outre ton professionnalisme au labo que je ne développerai pas ici, j'ai trouvé en toi une amie avec qui j'ai partagé de bons moments de la vie. Tout ce temps passé ensemble a souvent été exquis et agréable : les soirées Pym's, les soirées étudiantes, l'amour est dans le pré, notre mythique Martini, les olives et le Banyuls, la Sangria (bon j'arrête là, ça fait alcoololo)... et bien d'autres encore ;) Merci pour tout et bonne route !

Benjamin Plante, mon Benji, merci pour tout. J'ai trouvé en toi, un ami, que de soirées ensemble, que de fous rires, ton mode PLS en gitan dans mon local technique, ton gala pharma terminé à 23h, les week-ends dans le 41, les soirées bad (promis, je te laisserai gagner, une fois), les après-midis piscine chez toi, les coupures grenadine, les soirées foot... et ta générosité. Tu n'es qu'un gamin mais on peut compter sur toi, merci. Vivement les matchs à Old Trafford.

Je remercie également tout ceux qui ont croisé ma route :

Sylvie Bodard, merci de ton aide, ta bonne humeur et nos nombreuses rigolades, y'en a pas 2 comme toi ; Clovis Tauber pour ta sympathie et ton immense aide pour les images TEP ! ; Bruno Brizard pour le temps que tu m'as consacré pour le comportement et ta bonne humeur ; Sophie Serrière pour ta précieuse aide pour les manips TEP et tes conseils ; Thierry Papin pour ta disponibilité, tes blagues et nos discussions ; Pierre Castelnau pour tes conseils ; Lucette Garreau pour ton aide en radioprotection, tes compliments ;) et nos discussions tardives ; MC Furon et MP Vilar, merci à toutes les deux pour vos disponibilités et votre gentillesse, je n'oublierai jamais les sifflements de MP ! ; Patrick Emond pour ta bonne humeur et le prêt de ton labo à l'hôpital ; Zuhal Gulhan pour ta sympathie et tes moqueries ; Nathalie

Méheut pour ta bonne humeur ; Nicolas Arlicot pour nos discussions sur l'OM ; Jackie Vergotte et Francine Wojciekowski pour votre gentillesse ; Wilfrid Baudoin pour nos chambrages footballistiques ; sans oublier Chrystophe Aubert, Daniel Antier, Emilie Vierron, Karine Vuillet, Johnny Vercouillie, Gabrielle Chicheri, Ying Yang, Céline Mothes, Paolo Gonzales Gutierrez, Hiba Zbib, Christelle Pruckner, Sylvie Mavel, Diane Dufour et Serge Maia.

Un remerciement pour mes collègues de l'ADOCT : Marmotte, Vincent P et Vincent J (et son sanibroyeur), Claire, Rimoric, Chouquette et Chouquette, Fillot, Aurore, Max, Boulette et Aline... avec qui nous avons bien festoyé ;) Continuez à porter haut notre association !!

Une pensée aux Docteurs Annelise Letourneur (toujours là même quand un océan nous sépare), Antonin Leblanc (que de soirées mémorables, avec toutes tes dents bien sûr !), Léna Marteau, Olivier Moustié, Sighild Lemarchant, Julien Hay (pour tous ces fou-rires pendant ces 4 ans à Caen, soit vous suivez, soit c'est la pooorte), Amandine Jullienne, Mathieu Alary, mes collègues et ami(e)s.

Mes ami(e)s : Elodie (merci d'avoir été là depuis le début de mon aventure tourangelle !), Laure (ma miss tétons st***g rose, que de fou-rires au bad et partout ailleurs !), Florian et Edith, Annso, Anaïs, Rémy, Irina, Antoine et Annso, Tony et Vivi, Mamal, Ketty, Lorelei, Ségo, Laura, Boris, Mister Bazin, Louis, Florian et Clément, Ambre, DJ Oliv', tous les potes du bad... et tous les autres, j'en oublie, c'est certain...

À Mathilde...

À mes grands-parents...

À mes parents...

RÉSUMÉ

Le MPH est le médicament le plus prescrit pour le traitement du trouble déficitaire de l'attention/hyperactivité (TDA/H). Sa prescription de l'enfance à l'âge adulte et notamment chez les femmes en âge de procréer soulève des questions sur les effets à long terme d'un tel traitement sur le cerveau en développement. À ce jour, aucune information n'est disponible concernant la présence ou non de modifications neurobiologiques à l'âge adulte consécutives à une exposition prénatale au MPH. Nous avons utilisé un modèle d'exposition prénatale au MPH chez le rat pour étudier les conséquences d'un tel traitement sur le fonctionnement du cerveau adulte.

L'imagerie scintigraphique a été réalisée pour comparer les profils métaboliques cérébraux des rats exposés en prénatal au MPH vs témoins. L'aspect structural de leur système dopaminergique a été évalué avec un immunomarquage de la TH et l'aspect fonctionnel à l'aide de microdialyse *in vivo* et d'immunohistochimie c-Fos dans des conditions basales et après stimulation dopaminergique. Parallèlement, l'évaluation comportementale de ces animaux vis-à-vis de récompense naturelle ou synthétique ainsi que leur réactivité vis-à-vis de l'effet locomoteur de la cocaïne a été étudiée.

Les animaux exposés en prénatal au MPH affichent des altérations neurobiologiques structurales et fonctionnelles associées au système dopaminergique et à sa réactivité suite à une administration de cocaïne. Nos résultats montrent aussi que ces animaux présentent une altération de la préférence et de la motivation au sucre (renforçateur naturel) alors qu'aucune différence de motivation pour s'auto-administrer de la cocaïne (renforçateur synthétique) n'a été décelée. Cependant, ces animaux montrent une baisse de sensibilité aux effets locomoteurs de la cocaïne.

À notre connaissance, notre étude préclinique est la première qui rapporte des modifications neurobiologiques à long terme après une exposition prénatale au MPH. Sur un plan plus fondamental, ces données devraient permettre de mieux comprendre comment des perturbations dopaminergiques transitoires au cours du développement cérébral peuvent induire des altérations cérébrales à long terme.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Remerciements</i>	3
<i>Résumé</i>	8
<i>Table des matières</i>	9
<i>Abréviations</i>	15
INTRODUCTION	19
I - Histoire du Méthylphénidate	21
II - Utilisations du Méthylphénidate	22
A/ Le TDA/H	22
B/ La narcolepsie	26
C/ Utilisation illicite	27
III - Effets du Méthylphénidate	28
A/ Chez l'animal	28
B/ Chez l'homme	29
IV - Pharmacocinétique et métabolisme du Méthylphénidate	30
V - Mécanismes d'action du Méthylphénidate	32
A/ Sur la neurotransmission dopaminergique	34
B/ Sur la neurotransmission norépinéphrinergique	40
C/ Sur la neurotransmission sérotoninergique	42

VI - Efficacité du Méthylphénidate et risques associés	42
A/ Chez l'adulte	42
B/ Chez l'enfant et l'adolescent	44
VII - Le Méthylphénidate au cours du développement	46
A/ Effets spécifiques du MPH sur le cerveau adolescent	48
B/ Conséquences moléculaires et métaboliques à long terme de l'exposition au MPH chez l'adolescent	51
C/ Effets comportementaux à long terme d'une exposition au MPH chez l'adolescent	54
VIII - Le Méthylphénidate et la grossesse/lactation	57
A/ Études cliniques	57
B/ Études précliniques	60
OBJECTIFS	63
MATÉRIELS ET MÉTHODES	67
I - Animaux et protocole d'exposition au MPH	69
A/ Animaux	69
B/ Protocole d'exposition au MPH	70
II - Imagerie scintigraphique : TEP	71
A/ Protocole d'imagerie TEP	72
B/ Analyse d'image	74

III - Études des altérations dopaminergiques sur le plan structural et sur le plan fonctionnel à l'état basal et après stimulation du système dopaminergique 75

A/ Sur un plan structural : immunomarquage de la tyrosine hydroxylase 75

1- Protocole

2- Préparation des tissus et réalisation des coupes

3- Protocole de marquage

4- Comptage

B/ Sur un plan fonctionnel 80

1- Quantification de la DA - Microdialyse intracérébrale en double implantation chez le rat anesthésié

1-1 Chirurgie

1-2 Les sondes et l'implantation

1-3 Recueil des microdialysats

1-4 Quantification de la DA des échantillons par HPLC

2- Marquage immunohistochimique c-Fos

2-1 Protocole

2-2 Préparation des tissus et réalisation des coupes

2-3 Protocole de marquage

2-4 Comptage

3- Imagerie scintigraphique : TEP

3-1 Protocole de l'imagerie TEP

3-2 Analyse des images TEP

IV - Études des altérations comportementales 94

A/ Renforteur naturel 94

1- Test de préférence au sucre

2- Réponse opérante au sucre

2-1 Préparation préalable

2-2 Protocole	
2-2.1 Ratio fixe (FR1)	
2-2.2 Ratio progressif (PR)	
B/ Renforceur synthétique	100
1- Auto-administration de cocaïne	
1-1 Chirurgie	
1-2 Protocole d'auto-administration de cocaïne	
1-2.1 Ratio fixe : FR1	
1-2.2 Ratio Fixe : FR5	
1-2.3 PR	
2- Test de l'activité locomotrice	
V - Analyses statistiques	106
RÉSULTATS	109
I - Effets de l'exposition prénatale au MPH sur les paramètres physiologiques	111
A/ Sur les rates gestantes	111
B/ Sur la portée	111
C/ Sur la progéniture adulte	113
II - Imagerie scintigraphique : TEP	114
III - Études des altérations dopaminergiques sur le plan structural et sur le plan fonctionnel à l'état basal et après stimulation	116
A/ Sur un plan structural : immunomarquage de la tyrosine hydroxylase	116

B/ Sur un plan fonctionnel	119
1- Quantification de la DA - Microdialyse intracérébrale en double implantation chez le rat anesthésié	
1-1 Vérification de l'implantation des sondes	
1-2 NacSh	
1-3 Cortex cingulaire	
2- Marquage immunohistochimique c-Fos	
3- Imagerie scintigraphique : TEP	
IV - Études des altérations comportementales	128
A/ Renforteur naturel	128
1- Test de préférence au sucre	
2- Réponse opérante au sucre : FR1 et PR	
B/ Renforteur synthétique	130
1- Auto-administration de cocaïne : FR1, FR5 et PR	
2- Test de l'activité locomotrice	
DISCUSSION	135
I - Une exposition prénatale au MPH induit-elle des conséquences physiologiques sur les rates gestantes et sur la portée ?	138
II - Une exposition prénatale au MPH entraîne-t-elle des modifications à long terme de l'activité cérébrale ?	139
III - Les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentent-ils des altérations structurales du système dopaminergique ?	141

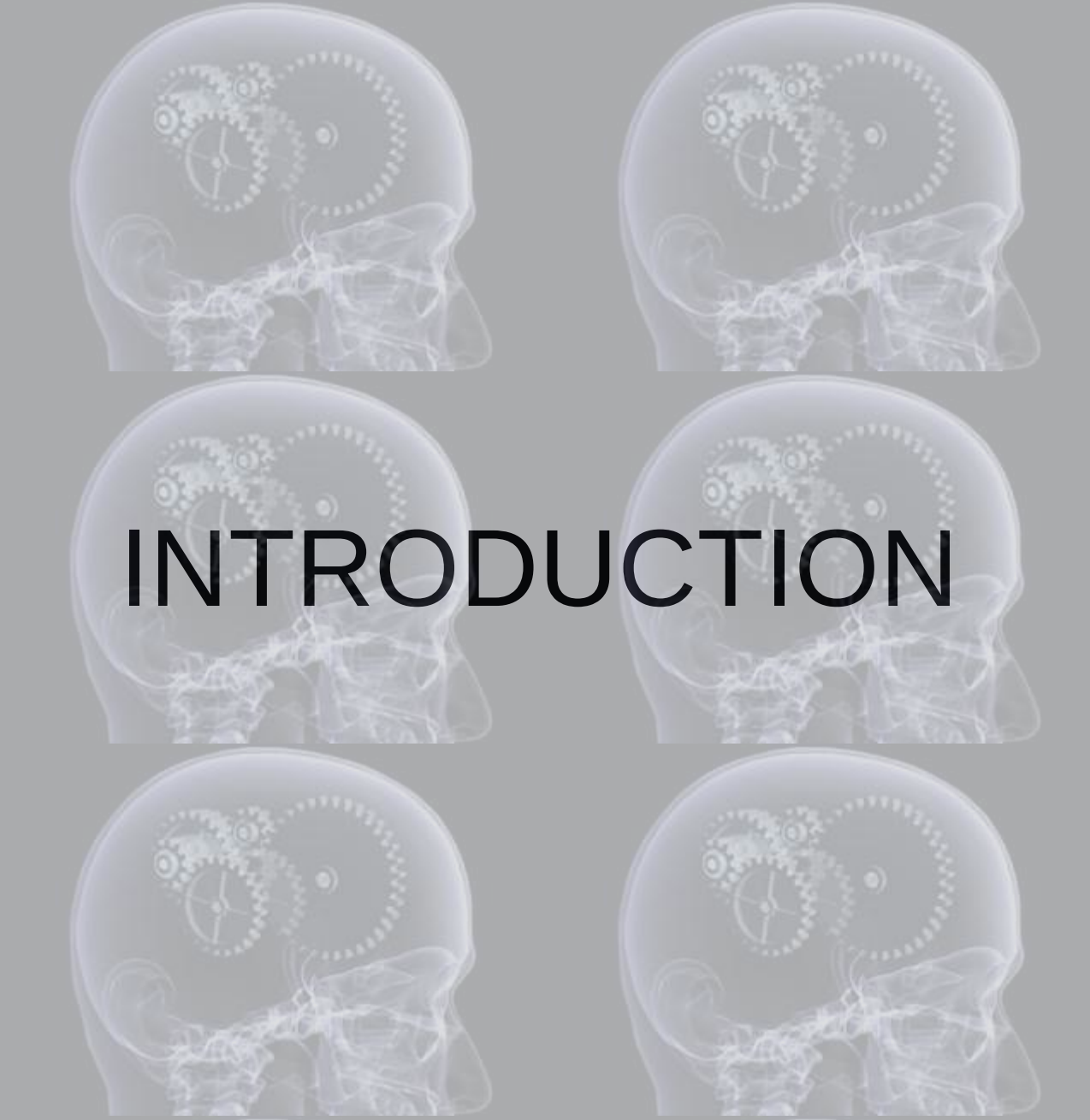
IV - Les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentent-ils des altérations fonctionnelles du système dopaminergique ?	142
V - Les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentent-ils des altérations comportementales ?	145
VI – Comparaison entre l'exposition prénatale au MPH, à la cocaïne, aux amphétamines et aux antidépresseurs	149
VII - Influence dopaminergique sur le développement	150
CONCLUSION	153
BIBLIOGRAPHIE	157

ABRÉVIATIONS

¹⁸ FDG	2-deoxy-2-(¹⁸ F)fluoro-d-glucose
5-HT	Sérotonine
AA	Auto-Administration
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la Variance
AP	AntéroPostérieur
APA	American Psychiatric Association
ATX	Atomoxétine
bCBV	Volume sanguin cérébral basal
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BOLD	Blood Oxygen Level Dependent
CG	Cortex Cingulaire
CMRglc	Taux métabolique de glucose cérébral local
CPF	Cortex Préfrontal
CPP	Conditionnement de Préférence de Place
DA	Dopamine
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAT	Transporteur de la Dopamine
DL	Dorsolatéral

DM	Dorsomédian
DSM	Diagnostic and Statistical Manual
DV	DorsoVentral
FR1	Fixed Ratio 1
FR5	Fixed Ratio 5
GABA	Acide γ aminobutyrique
H	Habituation
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
i.p.	Intrapéritonéale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LHb	Habénula Latérale
LHyp	Hypothalamus Latéral
MDMA	3,4-méthylènedioxy-N-méthamphétamine
ML	MédioLatéral
MPH	D-thréo-méthylphenidate hydrochloride
Nac	Noyau accumbens
NacSh	Shell du Noyau accumbens
NE	Norépinephrine
NET	Transporteur membranaire de la Norépinephrine
NGS	Sérum Normal de Chèvre
NP	Nose-Poke
p.o.	Par voie orale
PB	Phosphate Buffer

PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldéhyde
phy	Sérum physiologique
PR	Ratio Progressif
RD1	Récepteur Dopaminergique de type 1
RD2	Récepteur Dopaminergique de type 2
s.c.	Sous-cutanée
SERT	Transporteur de la sérotonine
SD	Déviation Standard
SN	Substance Noire
SNc	Substance Noire pars compacta
SNr	Substance Noire pars reticulata
SRM	Spectroscopie à Résonnance Magnétique
TDA/H	Trouble Déficitaire de l'Attention avec ou sans Hyperactivité
TDA/H-C	Sous-type combiné du TDAH
TDA/H-HI	Sous-type hyperactif et impulsif du TDAH
TDA/H-PI	Sous-type principalement inattentif du TDAH
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TH	Tyrosine Hydroxylase
VMAT2	Vesicular Monoamine Transporteur 2
VP	Pallidum Ventral
VTA	Aire Tegmentale Ventrale



INTRODUCTION

I - Histoire du Méthylphénidate

Le méthylphénidate (MPH) est une phénylisopropylamine substituée et le principe actif de la Ritaline®. Ce médicament a été synthétisé pour la première fois en 1944 à Bâle par le Dr. Leandro Panizzon (cf **Figure 1**), chimiste dans les laboratoires de recherche pharmaceutique Ciba (Ciba-Geigy Pharmaceutical Company). Avec sa femme Marguerite, il découvrit l'effet stimulant de cette molécule dans le cadre d'un essai effectué sur eux-mêmes. Pour l'anecdote, Marguerite prenait volontiers du MPH avant d'aller pratiquer le tennis. En honneur de sa femme qu'il surnommait Rita, Panizzon appela cette substance la Ritaline.



Figure 1 : Photographie de Leandro Panizzon (1878-1967) qui synthétisa le premier le MPH en 1944, entouré de ses collègues de chez Ciba-Geigy.

Dès 1954, la Ritaline® a été utilisée pour le traitement de nombreuses pathologies (fatigue chronique, états léthargiques et confusionnels, psychoses séniles, overdose aux barbituriques, dépression, narcolepsie) mais son efficacité n'a jamais été aussi importante que dans le traitement du trouble de déficit de l'attention/hyperactivité (TDA/H) (Chiarello et Cole, 1987; Challman et Lipsky, 2000; Kirby et al, 2002; Kappeler, 2007). Actuellement, les deux indications de la Ritaline® sont la narcolepsie et le TDA/H, c'est d'ailleurs le médicament psychostimulant le plus prescrit pour traiter les patients TDA/H (Fone et Nutt, 2005).

II - Utilisations du Méthylphénidate

A/ Le TDA/H

Le TDA/H a été découvert il y a plus d'un siècle. C'est en 1845 qu'un psychiatre allemand, Heinrich Hoffman (1809-1894), fait la première description de cette maladie dans un de ses poèmes où il décrit l'histoire de Philip Fidgety (cf **Figure 2**) : *"Permettez-moi de voir si Philip peut être un gentil jeune homme" dit le père avec sérieux ; "permettez-moi de voir s'il est capable de s'asseoir correctement à table" ajoute la mère dans un ton très grave, tout en regardant Philip continuer à faire le pitre [...]* Ce vilain enfant s'agite et devient de plus en plus agressif et sauvage, et ceci jusqu'à ce que sa chaise se renverse. Philip se met ainsi à hurler de toutes ses forces [...] Les verres, le pain, les couteaux et fourchettes tombent au sol. Pauvre papa et pauvre maman, qui dépités, se demandent comment ils vont faire pour dîner maintenant (adapté de : <http://www.vaxa.com/fidgety-philip.cfm>). C'est ainsi que ce poème écrit il y a pourtant plus de 160 ans rapporte le comportement typique d'un enfant atteint de TDA/H.

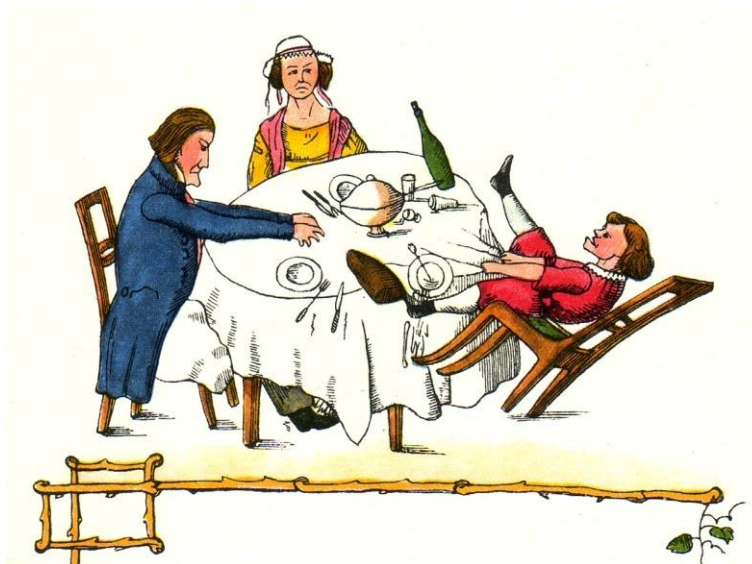


Figure 2 : Illustration de "Die Geschichte vom Zappel-Philipp" tirée du livre "Der Struwwelpeter" datant de 1845 caractérisant un enfant souffrant de TDA/H.

Le DSM-IV (1994) distingue trois sous-types de TDA/H : (i) le sous-type inattentif (TDA/H-PI) se manifeste surtout par des troubles de l'attention, la personne est alors perçue comme non motivée et passive, (ii) le sous-type hyperactif et impulsif (TDA/H-HI) qualifie les individus qui sont dans un état d'agitation permanente et réagissent de manière très impulsive, (iii) le sous-type combiné (TDA/H-C) rassemble les caractéristiques des deux premiers sous-types. Le diagnostic du TDA/H est réalisé à partir d'un questionnaire type (d'après le DSM-IV-TR) (cf **Figure 3**). Un nombre minimal de critères est nécessaire pour le diagnostic de chaque sous-type.

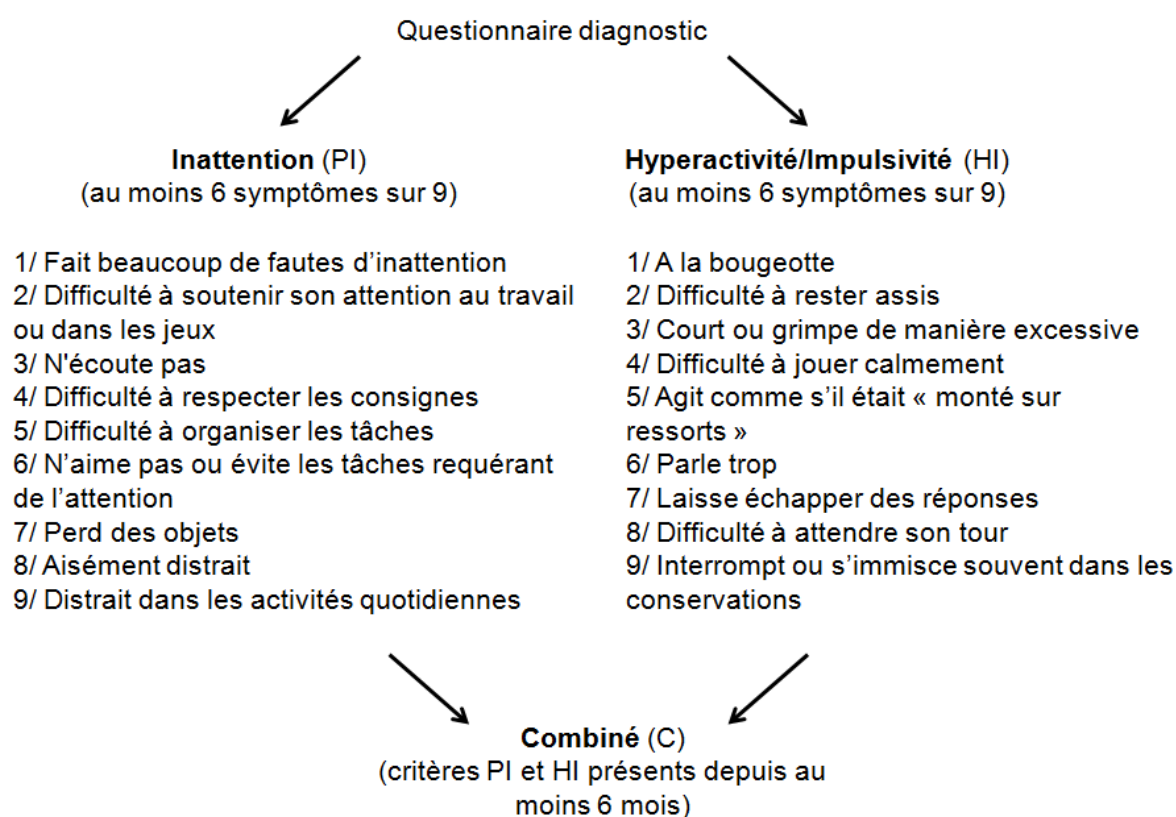


Figure 3 : Questionnaire diagnostique de TDA/H chez l'enfant (d'après le DSM-IV-TR).

Il est également nécessaire que ces symptômes provoquent une gêne fonctionnelle et qu'ils soient présents avant l'âge de 7 ans ; les symptômes doivent être observés dans au moins deux types d'environnement différents (par exemple école, travail, maison) ; et ne doivent pas pouvoir être expliqués par une maladie mentale comme la dépression, l'anxiété ou un autre trouble de la personnalité.

La nouvelle édition du DSM, communément intitulée DSM-5, est actuellement en préparation. Quelques modifications sont à prévoir avec notamment des changements au niveau du critère de diagnostic des symptômes (d'après : www.dsm5.org).

Le TDA/H est une affection neurodéveloppementale diagnostiquée chez 5,29% des enfants (Polanczyc et al, 2007) et qui persiste dans 70% des cas à l'âge adulte (Biederman, 1998). Il est estimé que 2,5% de la population adulte est atteinte de TDA/H (Faraone et al, 2000 ; Simon et al, 2009). Récemment, une étude épidémiologique a été réalisée sur un échantillon représentatif de la population pédiatrique française de 1012 foyers comprenant au moins un enfant âgé entre 6 et 12 ans. Les résultats ont montré une prévalence pour le TDA/H de 3,5%, dont la répartition est de 46,5% de type TDA/H-PI, 40% de type TDA/H-HI et 13,5% de type TDA/H-C (Faraone et al, 2012). Par ailleurs, il a été constaté que 36,5% des enfants diagnostiqués TDA/H recevaient un traitement médicamenteux pour cette affection. Le taux de prévalence a été corrigé à 5,6% en prenant en compte cette donnée. Les garçons sont trois à six fois plus affectés que les filles (Murphy et al, 1996). D'après Wolraich et al (1996), les garçons sont plus nombreux à avoir le sous-type TDA/H-HI que les filles à hauteur d'un ratio de 4:1 et également plus nombreux à hauteur d'un ratio de 2:1 pour le sous-type TDA/H-PI.

Les causes du TDA/H demeurent mal connues, elles seraient à la fois génétiques et environnementales. En effet, il a été montré que quand un jumeau est TDA/H, il y a 80% de risque que l'autre le soit aussi (Barkley, 1998). De même, si un parent est TDA/H, il y a 57% de risque que ses enfants aient la maladie (Barkley, 1998). Une étude suggère que la génétique contribuerait à 76% des cas de TDA/H (Mick et al, 2008) avec des gènes impliqués codant des protéines synaptiques et des protéines engagées dans les systèmes de neurotransmissions monoaminergiques (cf **Tableau 1**).

Gènes impliqués dans la neurotransmission et la neuroplasticité	Gènes impliqués dans les neurotransmissions monoaminergiques		
	Système DA	Système NE	Système 5-HT
SNAP25 CHRNA4 NMDA BDNF NGF NTF3 NTF4/5 GDNF	DRD4 DRD5 DAT1/SLC6A3 DDC	NET1/SLC6A2 ADRA2A ADRA2C DBH	5-HTT/SLC6A4 HTR1B HTR2A TPH2

Tableau 1 : Liste des gènes impliqués dans le TDA/H, codant des protéines synaptiques (de la neurotransmission et de la neuroplasticité) et des protéines de la neurotransmission monoaminergique (d'après Mick et al, 2008). (SNAP25 : Synaptosomal-associated protein 25 ; CHRNA4 : Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4 ; NMDA : N-methyl-D-aspartate ; BDNF : Brain-derived neurotrophic factor ; NGF : Nerve growth factor ; NTF3 et NTF4/5 : Neurotrophin-3 et Neurotrophin-4/5 ; GDNF : Glial cell-derived neurotrophic factor ; DRD4 et DRD5 : Dopamine receptor 4 et Dopamine receptor 5 ; DAT1/SLC6A3 : Dopamine transporter gene ; DDC : DOPA decarboxylase ; NET1/SLC6A2 : Norepinephrine transporter gene ; ADRA2A et ADRA2C : alpha-2A adrenergic receptor et alpha-2C adrenergic receptor ; DBH : Dopamine beta-hydroxylase ; 5-HTT/SLC6A4 : Serotonin transporter gene ; HTR1B et HTR1B : 5-hydroxytryptamine receptor 1B et 5-hydroxytryptamine receptor 2A ; TPH2 : Tryptophan hydroxylase 2)

La Ritaline® est le psychostimulant le plus prescrit dans le traitement du TDA/H (Fone et Nutt, 2005) en plus de dérivés d'amphétamine (Lysdexamphétamine), de médicaments non psychostimulants (Atomoxetine) et de thérapies comportementales. En général, la posologie est de 1 mg/kg/jour en 2 ou 3 prises jusqu'à une dose maximale de 60 mg/jour.

B/ La narcolepsie

La narcolepsie est un trouble de la régulation des états de veille et de sommeil. Elle est décrite pour la première fois par Carl Friedrich Otto Westphal (1877) (Schenck et al, 2007) (cf **Figure 4**). Elle est peu reconnue et souvent sous-diagnostiquée.



Figure 4 : Photographie de Carl Friedrich Otto Westphal (1833-1890).

Elle se caractérise par une somnolence diurne excessive, une cataplexie, la survenue d'hallucinations lors de l'endormissement et de paralysie pendant le sommeil (Kappeler, 2007). Ce syndrome tend à persister toute la vie avec des symptômes perçus comme très inquiétants au début et qui peuvent être source d'une grande frustration pour le patient sans entraîner malgré tout de maladie grave. La prévalence de la narcolepsie est estimée entre 2 et 3 pour 10000 habitants en France (www.orpha.net), soit environ 0,05 % de la population (Akintomide et Rickards, 2011). L'âge d'apparition de cette maladie est variable avec des symptômes qui surviennent dès les premières années de vie jusqu'à environ 50 ans et touchant aussi bien les hommes que les femmes. Les personnes atteintes de narcolepsie sont habituellement en bonne santé et normales à tous les autres égards avec une espérance de vie identique à celle des personnes non atteintes. Aucune anomalie physique ni lésionnelle n'a jamais été associée à ce trouble (Vecchierini, 2004). Il a été émis l'hypothèse que la narcolepsie serait consécutive à une baisse importante de la concentration en hypocretine, neuropeptide impliqué dans la régulation de l'état d'éveil (Nishino et al, 2000). Cette baisse pourrait être due à des

mutations du gène codant l'hypocrétine, à un dérèglement du système immunitaire qui pourrait s'attaquer aux cellules produisant ce neuropeptide ou à l'exposition à des infections, toxines ou traumatismes cérébraux (www.orpha.net).

Le traitement le plus répandu pour la narcolepsie est le Modiodal®. Son principe actif, le modafinil, stimule l'éveil chez un certain nombre d'espèces animales ainsi que chez l'homme (revue Prescrire, 1999). Le MPH n'est utilisé qu'en cas d'échec avec le modafinil, c'est à dire dans environ 20 % des cas (d'après : www.anc-narcolepsie.com).

C/ Utilisation illicite

Du fait de la prescription croissante de MPH (de moins de 2 millions de prescriptions en 1991 vs plus de 22 millions en 2001 dans le monde (Greenhill et al, 2002)) et de ses propriétés psychostimulantes, de plus en plus de cas d'utilisations de MPH hors indication ont été rapportés ces dernières années (Kollins et al, 2001; Svetlov et al, 2007). Ce type d'utilisation est particulièrement présent chez les adolescents et jeunes adultes qui recherchent les effets euphorisants, anorexigènes et psychostimulants (augmentation des capacités attentionnelles pendant les périodes de révisions d'examen (Revue Prescrire, 2012)). Une étude américaine a révélé qu'environ 10,4% des étudiants utilisent ou ont déjà utilisé de manière illicite un psychostimulant prescrit sur ordonnance. Pour 93,5% d'entre eux, c'était une aide à la concentration (Herman et al, 2011). D'après Bogle et Smith (2009), l'estimation de la consommation annuelle illicite de MPH aux USA est d'environ 4%.

Ce type de consommation n'est cependant pas récente et a débuté dans les années 70 aux USA, le MPH étant alors surnommé «kiddy coke», «vitamin R», «pineapple», «skippy» ou encore «R-ball» (www.dailymail.co.uk/news/article-494862/Ritalin-The-scandal-kiddy-coke.html; <http://www.casapalmera.com/articles/signs-and-effects-of-the-methylphenidate-a-drug-also-known-as-ritalin>). De nombreux rapports concernant les abus de MPH ont été rédigés par le NIDA (National Institute on Drug Abuse) et ceux-ci ont augmenté de 6 fois entre 1990 et 1995

(www.drugabuse.gov). Dans ce contexte, le MPH est administré le plus souvent par voie orale ou intranasale même si des cas d'administration intraveineuse ont aussi été décrits (Parran et Jasinski, 1991). Les doses absorbées sont aussi difficilement quantifiables, même si certains rapports d'expériences décrivent des doses de 20 et 150 mg par prise unique ou répétée simplement sur quelques heures (<http://www.erowid.org/pharms/methylphenidate>). La consommation répétée de MPH par voie orale induit rarement une dépendance au contraire de ce qui est observé pour les administrations intranasale ou intraveineuse (Parran et Jasinski, 1991).

III - Effets du Méthylphénidate

A/ Chez l'animal

Des études ont montré qu'une administration de MPH induit une augmentation de l'activité locomotrice chez l'animal similaire à ce qui est observé pour d'autres psychostimulants (McNamara et al, 1993 ; Kankaanpää et al, 2000). En général, une dose supérieure ou équivalente à 2,5 mg/kg, administrée par voie intrapéritonéale (i.p.) ou sous-cutanée (s.c.) provoque une augmentation de l'activité locomotrice de l'animal (Browne et Segal, 1977; Gaytan et al, 1996; Crawford et al, 1998; Eckermann et al, 2001) qui peut durer pendant 40 à 90 minutes après une injection s.c. (Askenasy et al, 2007).

À doses plus élevées, le MPH induit chez le rat des stéréotypies dont l'intensité varie en fonction de la dose administrée (Scheel-Krüger, 1971 ; Gaytan et al, 1996). Ces stéréotypies sont des mouvements répétitifs de la tête, du corps et des extrémités, ou encore un reniflement incessant associé à du léchage. Il a été montré que l'administration d'une dose élevée de 40 mg/kg chez le rongeur produit un profil d'activité en trois phases : (i) une phase d'hyperactivité locomotrice, (ii) une phase dominée par des comportements stéréotypés, et (iii) une deuxième période d'hyperactivité locomotrice (Gaytan et al, 1997).

B/ Chez l'homme

Le sujet sain n'est pas censé être exposé au MPH qui est une substance répertoriée par la convention sur les substances psychotropes de 1971, ce qui en fait un produit contrôlé dans la plupart des pays comme la France, où le MPH fait partie des substances réglementées assimilées aux stupéfiants. Ceci signifie que le MPH ne peut être délivré que sur ordonnance initialement hospitalière par des médecins spécialisés en neurologie, psychiatrie et pédiatrie et renouvelée ensuite sur ordonnance sécurisée par le médecin généraliste. Néanmoins, certains cas de consommation de MPH hors indication ont été rapportés et ont permis de déterminer les effets d'une administration aiguë de MPH. Ceux-ci surviennent avec une latence de quelques minutes à 30 minutes en fonction de la voie d'administration (intraveineuse ou per-os, respectivement) et incluent dans un premier temps une sensation d'euphorie, une augmentation de l'activité locomotrice, des capacités de concentration, de la motivation, une baisse de la sensation de fatigue, de l'appétit et une résistance à l'endormissement. Sur le plan physiologique, ceci s'accompagne d'une élévation du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Dans un second temps, le sujet ressent une sensation de bien être et de relaxation qui est suivie de l'atténuation progressive des effets précédemment cités accompagnée d'insomnies, de vertiges et de nausées/vomissements en cas de consommation de nourriture. Des conséquences à long terme en cas d'abus répétés de MPH hors prescription ont été décrites incluant notamment une importante perte de poids, la survenue d'insomnie, de dépression et de paranoïa (<http://www.erowid.org/pharms/methylphenidate>). Cette consommation chronique peut aussi s'accompagner de conséquences physiologiques comme la survenue d'emphysème, de toxicité pulmonaire, de rétinopathies, et de dysfonctionnements hépatiques (Sherman et al, 1987 ; Schmidt et al, 1991).

Chez le patient TDA/H, la prise de MPH induit des effets similaires, notamment une élévation des capacités de concentration et d'attention, une baisse de l'impulsivité et de l'hyperactivité et ceci dans les 60 minutes suivant la prise (Silva et al, 2006). Des effets secondaires sont aussi présents suite à la prise de MPH par les patients TDA/H incluant la survenue d'insomnie, de vertiges, d'irritabilité,

d'anxiété, de migraine, de perte d'appétit et occasionnellement l'apparition de tics moteurs (Klein-Schwartz, 2002). Au niveau physiologique, des augmentations du rythme cardiaque et de la pression artérielle peuvent survenir.

À la suite d'un surdosage ou d'une intoxication au MPH, les sujets peuvent présenter des symptômes allant de l'euphorie jusqu'à de la tachycardie pour une toxicité légère du MPH, des hallucinations ou des palpitations pour une toxicité plutôt modérée et jusqu'au coma pour les cas les plus extrêmes (cf **Tableau 2**).

Toxicité légère	Toxicité modérée	Toxicité sévère
Euphorie Hypervigilance Bruxisme État de conscience altéré Tachycardie Hypertension artérielle	Agitation franche Paranoïa Hallucinations Diaphorèse Vomissement Douleur abdominale Palpitations Douleur rétrosternale	Hyperthermie Acidose métabolique Rhabdomyolyse Hyperkaliémie Insuffisance rénale aigüe Coma Convulsions

Tableau 2 : Signes et symptômes d'une intoxication au MPH (ou aux amphétamines) (d'après : TOXINZ, septembre 2011).

IV - Pharmacocinétique et métabolisme du Méthylphénidate

Le MPH est un dérivé pipéridinique, qui possède deux centres chiraux d'où l'existence de quatre énantiomères comprenant des formes dextrogyres et lévogyres, chacune thréo ou érythro (cf **Figure 5**).

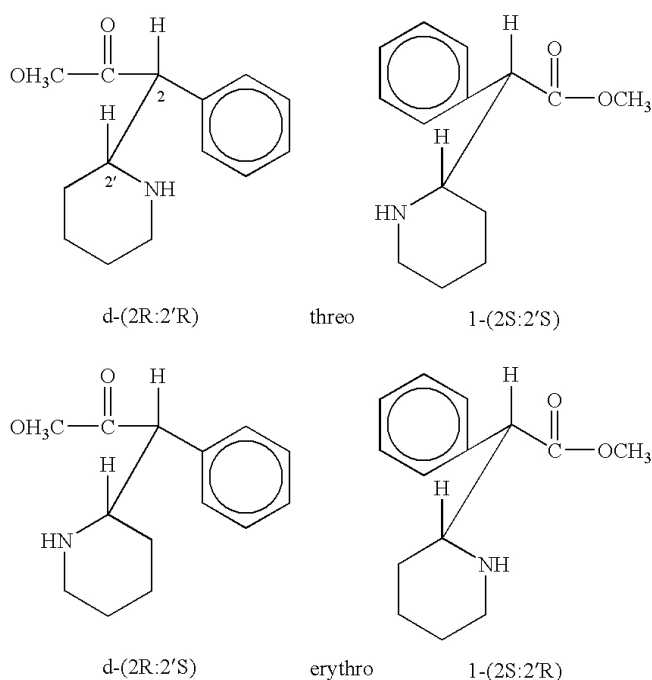


Figure 5 : Structure des quatre énantiomères du MPH.

Seules les formes thréo sont présentes dans la Ritaline® car il a été montré que les formes érythro n'entraînaient que très peu d'effets stimulants (Patrick et al, 1987). De plus, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que le D-thréo-MPH est l'isomère qui est majoritairement responsable des effets pharmacologiques (Patrick et al, 1987; Eckerman et al, 1991; Ding et al, 1997; Quinn, 2008).

Après administration orale, le MPH est rapidement et presque totalement absorbé. Cependant, suite à l'effet de premier passage, sa biodisponibilité systémique n'est que d'environ 30% de la dose administrée et il existe de grandes variabilités individuelles (11 à 53%) (Chan et al, 1983). La prise simultanée d'aliments accélère l'absorption, mais n'a aucun effet sur la quantité de produit résorbée. Chez l'enfant et l'adulte, des pics de concentration plasmatique de 10,8 ng/ml et de 7,8 ng/ml respectivement ont été observés en moyenne deux heures après l'administration d'une dose orale de 0,3 mg/kg. Ces concentrations plasmatiques maximales présentent de fortes variations interindividuelles. Qu'il s'agisse d'une administration aiguë ou répétée de MPH, le profil des concentrations plasmatiques est équivalent. Les effets, suite à la prise de MPH, surviennent assez rapidement compte tenu de sa demi-vie plasmatique courte (2,4 heures chez l'enfant et 2,1 heures chez l'adulte), la durée des effets étant de 1 à 4 heures. Après une administration par voie intraveineuse, les concentrations plasmatiques des deux énantiomères sont identiques jusqu'à 1,5 heures après l'injection et diffèrent après.

Quelque soit la voie d'administration, la biodisponibilité du D-thréo-MPH est de 23% alors que celle du L-thréo-MPH est de 5%. Dans le sang, le MPH et ses métabolites se répartissent entre le plasma (57%) et les érythrocytes (43%). La liaison aux protéines sériques est plus faible (15% environ). Le volume de distribution apparent est d'environ 13,1 l/kg.

Dans les 48 à 96 heures après l'administration orale, 78 à 97% de la dose administrée sont éliminés sous forme de métabolites dans l'urine, et 1 à 3% dans les fèces. On ne retrouve dans l'urine que de faibles quantités de MPH non métabolisé (< 1%). La majeure partie de la dose administrée est éliminée dans l'urine sous forme d'un composé inactif, l'acide ritalinique ou acide α -phényl-2-pipéridine-acétique (60 à 86%) (Patrick et al, 1987 ; Aoyama et al, 1994). Le métabolisme est énantiosélectif puisque la demi-vie du D-thréo-MPH est plus longue et ses concentrations plasmatiques plus élevées que le L-thréo-MPH (Srinivas et al, 1993). L'absorption d'autres drogues peut interagir avec le MPH et peut conduire à la formation de métabolites tel que l'éthylphénidate. Ce dernier a été identifié chez des patients ayant fait une overdose (Markowitz et al, 1999).

8% de MPH traverse la barrière hémato-encéphalique par diffusion passive pour atteindre le cerveau après une administration intraveineuse avec un pic de concentration présent au niveau cérébral entre 4 et 10 minutes après l'administration. La pharmacocinétique par prise orale est plus lente puisque la survenue du pic de MPH dans le cerveau arrive 60 minutes ou plus après l'administration (Volkow et al, 1995).

V - Mécanismes d'action du Méthylphénidate

Le mécanisme d'action du MPH n'est pas encore totalement élucidé mais ses effets sont liés à différents neurotransmetteurs que sont la dopamine (DA) et la norépinephrine (NE) (Challman et Lipsky, 2000). Le MPH est un agoniste indirect des systèmes dopaminergique et norépinéphrinergique : il bloque le transporteur de la DA (DAT) et de la NE (NET) (Sadasivan et al, 2012). Il a été montré que le MPH a une meilleure affinité pour le DAT ($IC_{50} = 84 \pm 33$ nM) par rapport au NET ($IC_{50} =$

514±74 nM) et ne se lie que très modestement au transporteur de la sérotonine (SERT) (IC₅₀>50000 nM) (Gatley et al, 1996). L'imagerie nucléaire à tomographie par émission de positons (TEP) ainsi que l'utilisation de MPH radiomarké au carbone 11 ont permis de mettre en évidence que la distribution du MPH au niveau cérébral est relativement hétérogène, à savoir que la plupart du MPH se fixe dans le striatum et qu'il est retrouvé dans une moindre mesure au niveau du thalamus, du cortex et du cervelet (Volkow et al, 1995). Il a été montré chez l'homme et chez le babouin qu'alors que le L-thréo-MPH s'accumule de façon homogène dans tout le cerveau, le D-thréo-MPH s'accumule préférentiellement au niveau du striatum et du noyau accumbens (Nac) (Volkow et al, 1995 ; Ding et al, 1997) (cf **Figure 6**).

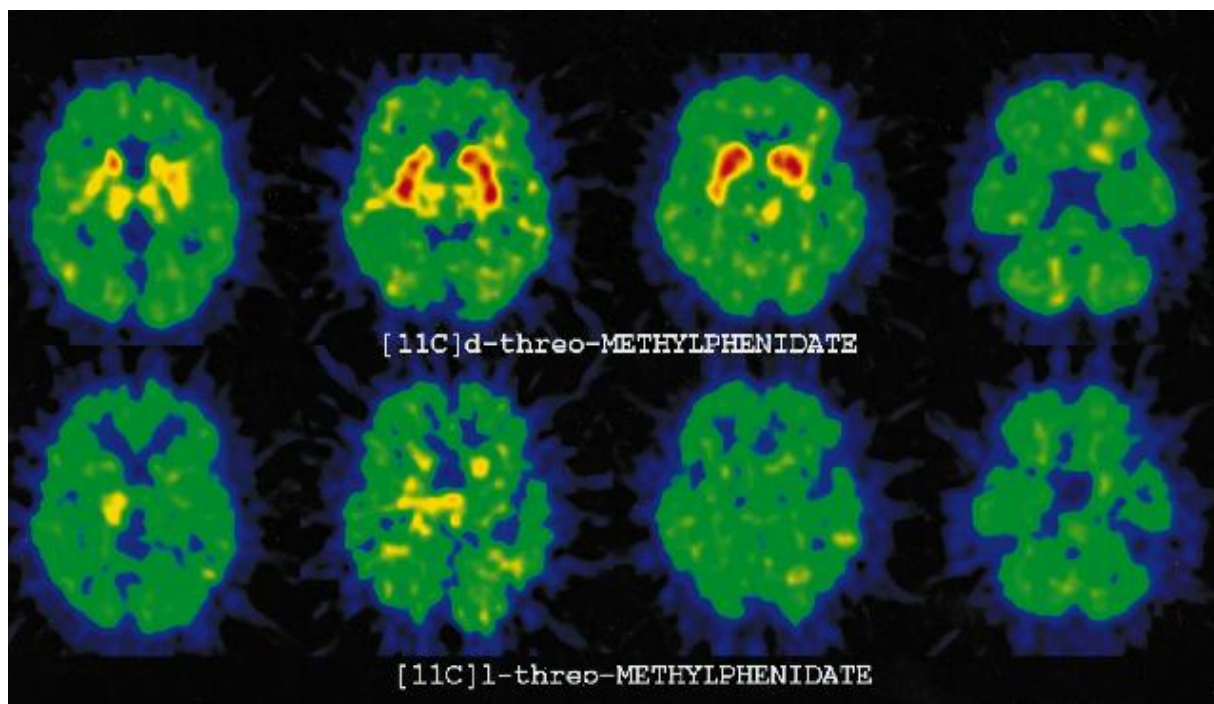


Figure 6 : Images TEP d'un cerveau humain après une injection de ¹¹C D-thréo-MPH (en haut) ou de ¹¹C L-thréo-MPH (en bas). De gauche à droite, partie supérieure du cerveau à la base du crâne. Ces images montrent l'accumulation de la radioactivité dans les ganglions de la base pour le ¹¹C D-thréo-MPH (d'après Ding et al, 1997).

A/ Sur la neurotransmission dopaminergique

Le MPH exerce une action "cocaïne-like" et ses effets thérapeutiques seraient liés à une facilitation de la neurotransmission dopaminergique (Froimowitz et al, 1995). Dans le cerveau humain, le MPH occupe et bloque le DAT (Volkow et al, 1999), amplifiant ainsi le signal dopaminergique (Volkow et al, 2002). C'est un inhibiteur de la recapture de la DA (Patrick et al, 1987) (cf **Figure 7**). Chez l'homme, une dose utilisée en thérapeutique bloque plus de 50% de DAT au niveau cérébral (Volkow et al, 1998). Le MPH entre en compétition avec la DA pour la liaison au DAT prolongeant ainsi la durée de vie de la DA au niveau de la fente synaptique, ce qui induit une augmentation de la stimulation pré- et post-synaptique (Volkow et al, 1995). Par imagerie TEP, il a été montré que l'administration par voie orale de MPH induit une augmentation de la DA extracellulaire au niveau du striatum (Volkow et al, 2001).

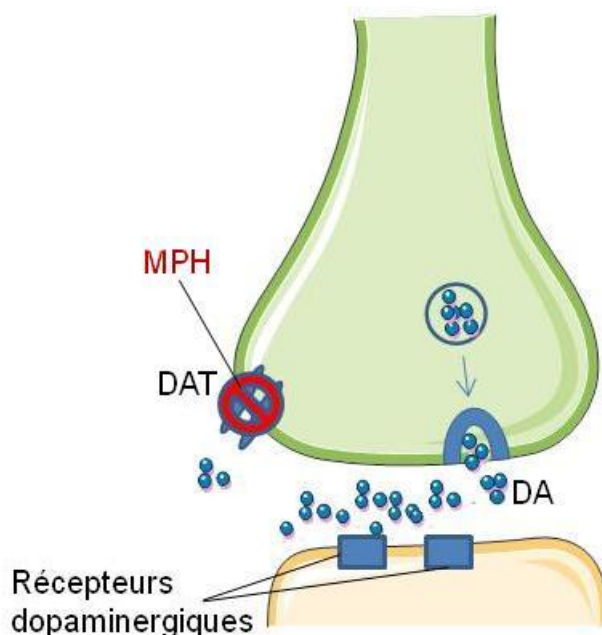


Figure 7 : Schéma du blocage du DAT par le MPH, amplifiant le signal dopaminergique. (DA : dopamine ; DAT : transporteur de la dopamine)

L'activité des neurones dopaminergiques est en partie régulée par des récepteurs pré-synaptiques ou autorécepteurs présents sur membranes des axones et des dendrites. Ces récepteurs dopaminergiques de type 2 (RD2) interviennent dans le mécanisme de rétrocontrôle négatif de la synthèse et de la libération de la

DA (Grace, 1991 ; Gioanni et Pirot, 2009). La libération de la DA est réalisée de manière pulsatile et en bouffées durant l'influx nerveux, on parle alors d'activité phasique de la DA. En dehors des influx, l'activité dopaminergique basale est dite tonique. Le blocage du DAT inhibe la recapture de DA, résultant donc en une accumulation de DA dans l'espace extraneuronal, ce qui déclenche une cascade d'événements médiée par ces récepteurs dopaminergiques.

L'utilisation de l'imagerie TEP pour étudier la liaison du ^{11}C -raclopride sur les RD2 dans le cerveau de 11 adultes en bonne santé montre que le traitement au MPH diminue significativement la liaison de ce radioligand dans le striatum, en raison de la compétition croissante exercée par la DA extracellulaire endogène et de la disponibilité de RD2 (cf **Figure 8**), comme indiqué par des mesures de B_{max}/K_d qui suggèrent une réduction de la liaison d'environ $20\% \pm 12\%$ après une dose orale de 0,8 mg/kg de MPH (Volkow et al, 2001).

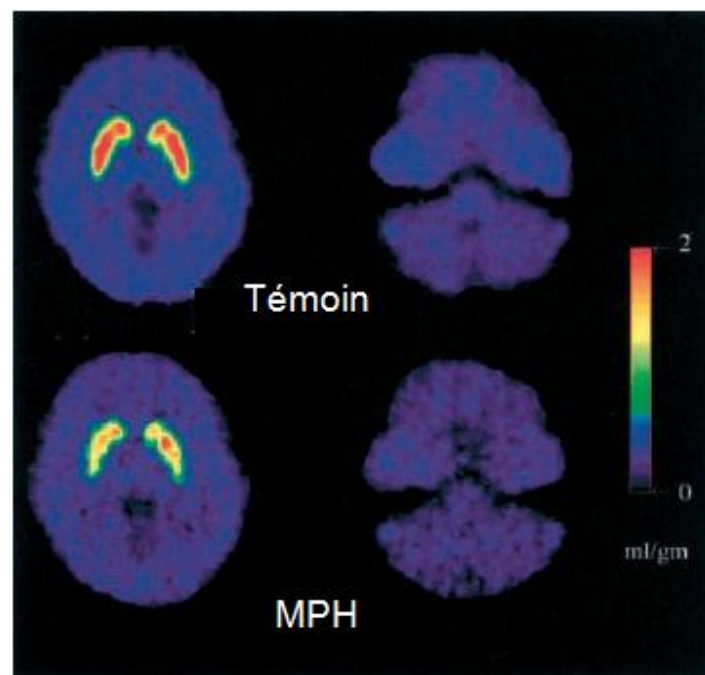


Figure 8 : Images de distribution du ^{11}C -raclopride au niveau du striatum et du cervelet avant et après administration de 60 mg de MPH per os. Celui-ci réduit la fixation du ^{11}C -raclopride dans le striatum où il est en compétition avec la DA pour se lier aux récepteurs D2, mais pas dans le cervelet où la liaison est essentiellement non spécifique (d'après Volkow et al, 2001).

À faible dose (0,5 mg/kg), il a été émis l'hypothèse que l'accumulation de la DA striatale après le blocage du DAT par le MPH augmente l'activation des RD2 pré-synaptiques, réduisant ainsi la libération de la DA suite à un nouvel influx nerveux, et ayant donc pour conséquence une moindre activation post-synaptique des récepteurs D1 (RD1) et RD2. L'ensemble de ces phénomènes a pour conséquence la réduction de l'hyperactivité dans un contexte de TDA/H (Seeman et Madras, 1998) (cf **Figure 9**). Il a aussi été proposé que l'accumulation de DA à la suite d'un blocage du DAT par le MPH pourrait induire une amélioration de l'attention et une diminution du caractère impulsif de l'individu en augmentant le rapport signal/bruit de la signalisation dopaminergique au niveau des neurones striataux, notamment en diminuant le bruit de fond de l'activité dopaminergique tonique (Volkow et al, 2001 ; Rosa-Neto et al, 2005). Néanmoins, il a été récemment montré dans des études utilisant le MPH et l'atomoxétine (ATX) (un inhibiteur de la recapture de la NE), que cette action du MPH sur l'attention et l'impulsivité n'était pas exclusivement dopaminergique, la NE ayant aussi son influence (Engert et Pruessner, 2008 ; Economidou et al, 2012). À des doses plus élevées de MPH (supérieures à 1 ou 2 mg/kg), la concentration de DA extracellulaire basale est augmentée de 14 à 35 fois (Sharp et al, 1987 ; Kuczenski et Segal, 1989) et celle de la DA phasique de 7 fois (Seeman et Madras, 1998). Ces doses sont associées à la stimulation généralisée du système nerveux, liée à la très forte concentration de DA dans la fente synaptique au repos et après libération.

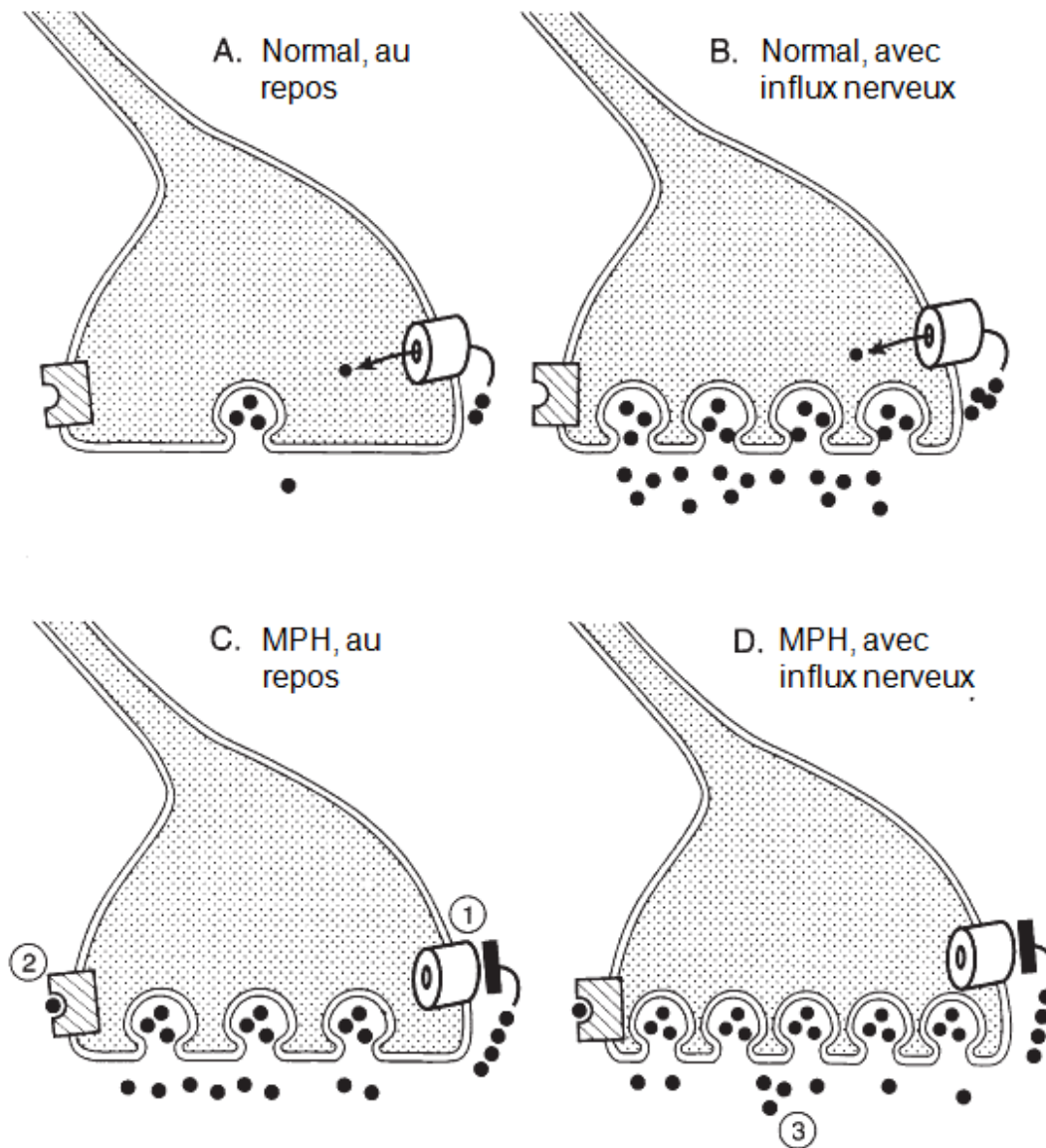


Figure 9 : Pharmacologie cellulaire de l'action d'une faible dose de MPH au niveau pré-synaptique. (A) La concentration normale de repos de la dopamine extracellulaire est de l'ordre de 4 nM. (B) La hausse transitoire de la concentration de DA extracellulaire au cours de l'influx nerveux normal (60 fois) revient à un niveau de repos par la diffusion et la recapture de la DA par les DAT. (C) En présence de MPH, le DAT est bloqué (étape 1) et le niveau de repos de la DA extracellulaire est augmenté d'environ 6 fois. (D) La concentration élevée de repos de DA agit sur les RD2 pré-synaptiques situés sur les terminaisons nerveuses (étape 2) pour réduire l'augmentation relative (seulement 2 fois) de DA additionnelle à la suite d'un nouvel influx nerveux (étape 3). Cette plus basse augmentation de la DA va ensuite agir essentiellement au niveau des RD2 post-synaptiques et ainsi induire une diminution de l'activité motrice du sujet (d'après Seeman et Madras, 1998).

La **Figure 10** illustre le mode d'action supposé du MPH sur le système dopaminergique. Le MPH agit indirectement comme un agoniste dopaminergique en augmentant l'accumulation de DA par le blocage du DAT. De plus, l'action du MPH sur les autorécepteurs D2 va induire une augmentation de la densité des VMAT2 (*vesicular monoamine transporter 2*) au niveau des vésicules pré-synaptiques isolées (Brown et al, 2001 ; Sandoval et al, 2002). Le résultat global est l'amplification de l'activité dopaminergique striatale ainsi que la réduction de la fréquence de l'activité de bruit de fond des neurones qui peuvent cliniquement conduire à l'amélioration de l'attention et à la réduction de la distraction du sujet (Rosa-Neto et al, 2005).

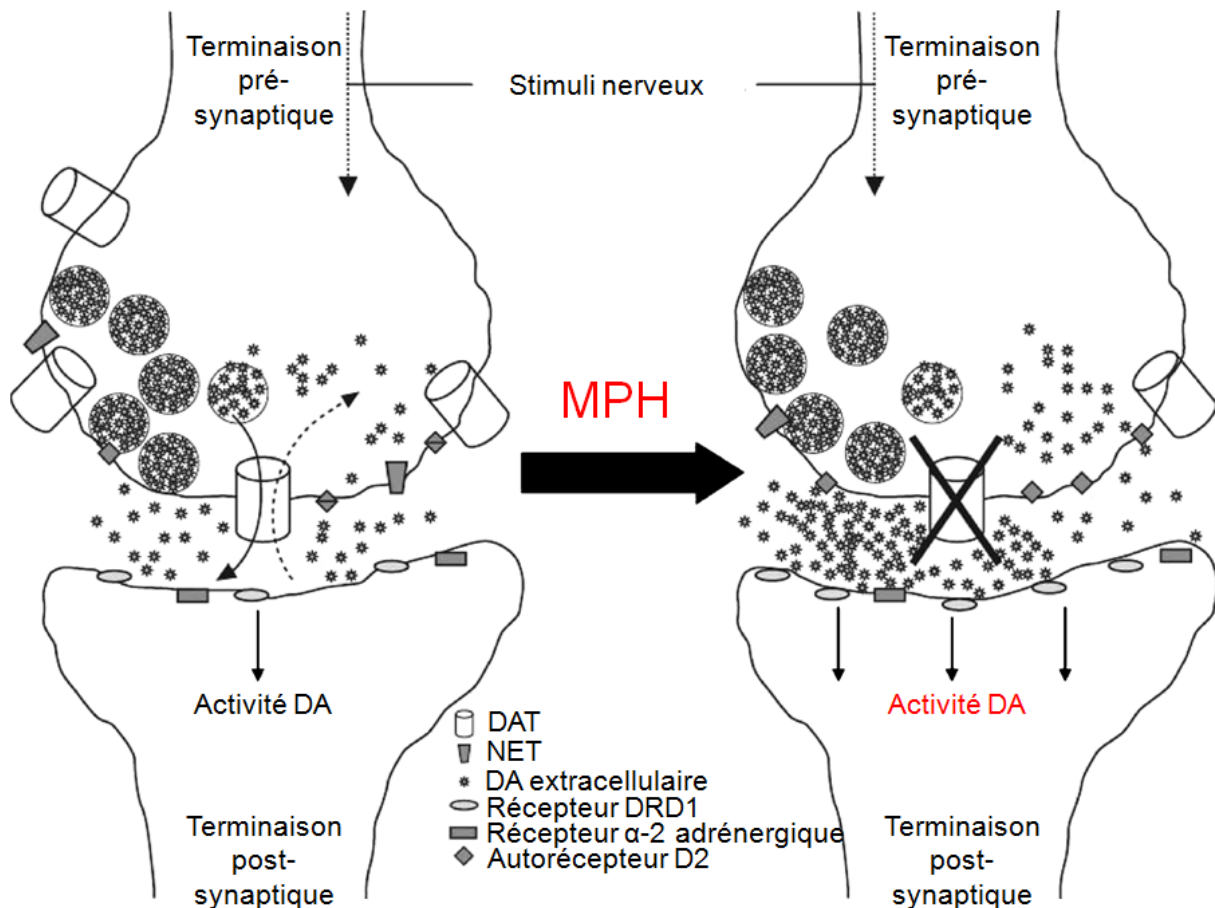


Figure 10 : Modèle d'action du MPH sur le système dopaminergique. Le schéma de gauche représente une synapse entre deux neurones chez un individu TDA/H avant le traitement au MPH. Il montre des niveaux relativement faibles de DA et des niveaux plutôt élevés de DAT. Les autorécepteurs D2 sont actifs. Les concentrations de NET sont soupçonnées être faibles dans le striatum (mais plus hautes dans la région corticale, où ils peuvent servir également au transport de la DA, voir chapitre V-B). Le schéma de droite représente une synapse après le traitement au MPH. Le neurone pré-synaptique montre le blocage des DAT et l'augmentation de DA dans l'espace extracellulaire. L'activité du MPH est potentiellement d'augmenter la concentration de DA extracellulaire via de multiples mécanismes. Le MPH bloque le DAT et son action sur les autorécepteurs D2 au niveau du neurone pré-synaptique entraîne une amplification de l'activité dopaminergique et une amélioration des déficits attentionnels, du fonctionnement cognitif et de l'hyperactivité motrice (d'après Wilens, 2008).

Bien que le blocage du DAT striatal soit considéré comme le principal mode d'action du MPH dans le traitement du TDA/H, de nouveaux arguments provenant d'études chez l'animal suggèrent une implication des DRD1 et des récepteurs α-2 adrénergiques post-synaptiques. Chez le rat, il a été montré que le MPH administré

par voie orale (1-2 mg/kg) améliore les performances lors d'une tâche de mémoire de travail spatiale qui fait intervenir le cortex préfrontal (CPF). Cet effet bénéfique du MPH est bloqué par un antagoniste dopaminergique des RD1 ainsi que par un antagoniste des récepteurs α -2 adrénergiques (Arnsten et al, 2005). Il a également été montré chez le rat que le MPH augmentait l'excitabilité des cellules corticales et que cet effet pouvait être bloqué par l'application d'un antagoniste des récepteurs α -2 adrénergiques mais pas par un antagoniste des RD1 (Andrews et al, 2006). Ces résultats suggèrent que les effets corticaux ou cognitifs du MPH sont médiés par des changements de la neurotransmission norépinéphrinergerique et/ou dopaminergique dans le CPF. Il reste à déterminer si ces RD1 et adrénorécepteurs post-synaptiques ont aussi un rôle dans les effets locomoteurs du MPH (Wilens et al, 2008).

B/ Sur la neurotransmission norépinéphrinergerique

Une étude récente a montré l'implication du NET dans le TDA/H (Kim et al, 2006). En effet, il a été identifié un polymorphisme fonctionnel dans le gène humain du NET, à savoir une diminution de la fonction du promoteur qui est associée de façon significative avec le TDA/H.

Il a été découvert que le MPH pouvait potentiellement inhiber le NET chez l'homme et chez la souris (Han et Gu, 2006). Une association génétique a été identifiée entre la réactivité au MPH et le gène codant le NET chez des enfants chinois atteints de TDA/H (Yang et al, 2004). En effet, le polymorphisme G1287A du gène du NET est associé significativement avec la réponse au MPH (évaluée par la *ADHD Rating Scale IV*). Ces résultats suggèrent que les effets du MPH peuvent être médiés en partie par le système norépinéphrinergerique. Des données chez l'animal corroborent l'idée de cette participation de la NE dans les effets du MPH. Une étude démontre que de faibles doses de MPH (0,25-1 mg/kg) administrées chez le rat exercent un effet double sur la fonction cognitive et sur les taux de DA et de NE (Berridge et al, 2006). Des tests comportementaux ont montré qu'un traitement au MPH améliorerait l'attention soutenue ainsi que la mémoire de travail spatiale, alors que des études de microdialyse ont montré que ce traitement augmentait la

concentration de NE et dans une moindre mesure de DA spécifiquement dans le CPF (115-280% et 75-130% pour NE et DA, respectivement). Dans une autre étude de microdialyse chez le rat, une administration i.p. de MPH a provoqué une augmentation des niveaux extracellulaires de NE dans l'hippocampe et de DA dans le striatum (Kuczenski et al, 2001). Ces études suggèrent un rôle important de la NE dans la réponse au MPH.

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les systèmes dopaminergique et norépinéphrinergique peuvent interagir dans le cadre du TDA/H. Dans le CPF, où contrairement au striatum, les concentrations de DAT sont relativement faibles comparées aux NET, il a été montré que le NET participe et est même majoritairement responsable de la recapture de la DA (Madras et al, 2005). Il existe également des hétérorécepteurs au niveau pré-synaptique, permettant les interactions entre les deux systèmes. En effet, diverses études chez l'animal suggèrent que les monoamines dans le cortex frontal sont sous le contrôle d'hétérorécepteurs (appelés ainsi car ils modulent la libération d'un neuromédiateur tout en étant activés par d'autres). Par exemple, l'utilisation de la microdialyse chez le rat vigile a permis d'étudier les interactions entre la DA et la NE dans le CPF (Gobert et al, 1998). L'administration locale d'agonistes des récepteurs α -2 adrénergiques a pour conséquence une augmentation des taux de DA dans le CPF, alors que l'administration d'antagonistes de ces récepteurs a l'effet inverse. Une étude a rapporté les mêmes résultats dans la partie médiale du CPF mais pas dans le striatum (Gresch et al, 1995). Ces résultats sont cohérents avec un possible mécanisme dans lequel la NE se lie à des hétérorécepteurs dans le CPF et donc diminue la libération de DA. Cette région corticale, impliquée dans les fonctions cognitives comme l'attention, est altérée chez les patients TDA/H (Bush, 2010). Ces fonctions sont dépendantes de la DA et de la NE. En augmentant leurs concentrations, le MPH améliore la mémoire de travail via une stimulation indirecte des RD1 et des récepteurs α -2 adrénergiques dans les cellules pyramidales du CPF (Arnsten, 2011). En fait, les effets de la DA et de la NE sont complémentaires : la DA agit sur les RD1 façonnant ainsi les décharges neuronales afin de réduire le rapport signal/bruit de la neurotransmission dopaminergique tandis que la NE stimule la fréquence grâce à une activation des récepteurs α -2 adrénergiques. L'ensemble de

ces travaux sont compatibles avec un possible double rôle de la DA et de la NE dans les effets corticaux du MPH.

C/ Sur la neurotransmission sérotoninergique

Jusqu'à présent, il était suggéré que la sérotonine (5-HT) ne jouait aucun rôle précis dans le mécanisme d'action du MPH. En effet, il a été montré qu'une administration aiguë ou chronique de MPH chez la souris n'induisait pas de variation de concentration de 5-HT au sein du striatum, du CPF et de l'hippocampe (Kuczenski et Segal, 2001 ; Koda et al, 2010) et que le MPH a très peu d'affinité pour le SERT (Gatley et al, 1996).

Il a été montré très récemment qu'une administration aiguë ou répétée de MPH modulait l'activité des neurones des noyaux du raphé appartenant au système sérotoninergique (Tang et Dafny, 2013). D'autres études devront confirmer cette récente découverte.

VI - Efficacité du Méthylphénidate et risques associés

A/ Chez l'adulte

De nombreuses études ont relaté l'efficacité et la sûreté du MPH comme traitement chez l'adulte atteint de TDA/H.

Une étude a montré que le traitement par deux dosages de MPH (10 mg, 3 fois par jour ou 15 mg, 3 fois par jour) pendant deux semaines présente de meilleurs résultats dans la lutte contre la symptomatologie du TDA/H chez 30 patients atteints de ce syndrome comparé au placebo (Bouffard et al, 2003). D'autres symptômes psychiatriques dont l'anxiété et la dépression sont également améliorés par ce traitement. Il n'a pas été constaté de différences entre les effets des deux dosages

de MPH. De plus, le MPH a été bien toléré, sans effet sur les mesures physiologiques telles que la pression artérielle, le pouls et le poids et également sans effet secondaire grave. Une étude sur 45 adultes souffrant de TDA/H a montré que le MPH, administré pendant trois semaines (de 0,5 mg/kg la première jusqu'à 1 mg/kg la troisième) a permis aux sujets d'avoir de meilleurs résultats aux tests de QI (38 à 51% vs 7 à 18% de réponses positives, respectivement pour les sujets et les témoins) (Kooij et al, 2004). De nouveau, dans cette étude, les effets secondaires du MPH étaient rares et bénins. Le MPH se révèle donc être un traitement efficace et bien toléré pour les symptômes du TDA/H chez l'adulte dans le court terme.

D'autres études ont testé l'efficacité du MPH sur une période un peu plus longue (1 à 2 mois). Un essai a porté sur 401 adultes atteints de TDA/H (218 hommes) âgés de 18 à 63 ans (Medori et al, 2008). Trois doses différentes de MPH ont été testées (18, 36 et 72 mg/jour) pendant cinq semaines. Des tests (scores de CAARS (*Conners' Adult ADHD Rating Scale*)) ont été utilisés afin d'évaluer les effets du traitement à la fin des cinq semaines. Les trois doses de MPH ont été associées à une amélioration beaucoup plus importante des symptômes du TDA/H comparé au placebo. Les effets indésirables les plus fréquents incluaient la diminution de l'appétit (25% des cas) et des céphalées (21%). La pression artérielle et le pouls étaient augmentés durant la première semaine puis restaient stables par la suite jusqu'à la cinquième semaine. Une autre étude (Adler et al, 2009) a comparé l'effet de plusieurs doses de MPH sur sept semaines : 36, 54, 72, 90 et 108 mg/jour sur 226 patients âgés de 18 à 65 ans (110 sujets traités au MPH et 116 sujets-placebo). Pour cela, des questionnaires ont été utilisés (*Adult ADHD Investigator Symptom Report Scale*) et les sujets traités au MPH ont montré une nette amélioration de leur symptomatologie. Quelques effets secondaires ont été rapportés mais ils n'étaient en aucun cas très sérieux. Une autre étude a également évalué l'innocuité et la tolérance du MPH dans un schéma à doses flexibles (18 à 90 mg/jour) chez 370 adultes souffrant de TDA/H (Buitelaar et al, 2009) sur sept semaines. Des effets secondaires ont été signalés chez 68% des patients et la plupart étaient d'intensité légère ou modérée. Le plus fréquemment, il a été rapporté des maux de tête (17% des cas), une perte d'appétit (13%) et de l'insomnie (11%). Ces effets indésirables étaient rarement graves (< 1%, 2 sujets/370). De petites augmentations de pression artérielle ainsi que de légères pertes de poids ont été observées. Ces résultats

fournissent des arguments supplémentaires pour la sécurité et la tolérance du MPH chez l'adulte à moyen terme.

La qualité de vie des patients sous MPH a aussi été évaluée par l'intermédiaire d'une échelle de score, la AAQoL (Adult ADHD Quality of Life Scale). Chez 60 patients atteints de TDA/H (âge moyen : 31 ans), ce score a été calculé après 12 semaines de traitement et a confirmé une très nette amélioration de la qualité de vie des sujets ($P < 0,0001$) et aucun effet secondaire grave n'a été répertorié (Mattos et al, 2012). Il a été également conduit une étude de 34 semaines pour étudier l'efficacité à long terme du MPH chez 223 sujets TDA/H. Dans cet essai, les réponses cliniques ont été significativement meilleures chez les patients traités. Cependant, des insomnies, des pertes d'appétit, des états nerveux, une sécheresse des muqueuses et des symptômes neurologiques ont été associés à la prise du MPH.

B/ Chez l'enfant et l'adolescent

De nombreuses études ont présenté l'efficacité et l'innocuité du MPH dans le traitement du TDA/H.

Dans l'une des premières études contrôlées pour l'efficacité de la Ritaline®, menée à Chicago sur 30 enfants atteints de TDA/H, le MPH a eu des effets bénéfiques sur 68% d'entre eux au bout de trois semaines. Des tests neuropsychologiques ont montré des améliorations de l'apprentissage, de la mémoire visuelle et de la coordination œil-main des enfants (Millichap et al, 1968). Un peu plus tard, un rapport réalisé sur un total de 337 enfants issus de 7 études différentes a montré un effet bénéfique du MPH dans 83% des cas (Millichap, 1973). Des rapports ultérieurs sur le MPH et autres stimulants du système nerveux central, incluant près de 5000 enfants, ont continué à démontrer des effets positifs chez plus de 70% des sujets. Chez ces enfants, le comportement hyperactif a été réduit, leur estime de soi, l'apprentissage, les relations sociales et familiales ont été améliorés (Spencer et al, 1996). D'après des études plus récentes, l'administration orale de doses cliniques de MPH améliore la mémoire de travail, le contrôle inhibiteur, la

flexibilité et d'autres fonctions cognitives dépendantes du cortex préfrontal (Bedard et al, 2003 ; Mehta et al, 2004 ; Turner et al, 2005 ; Hanwella et al, 2011 ; Treuer et al, 2013). Au total, plus de 200 essais cliniques ont confirmé l'efficacité du MPH chez 70 à 80% des patients en 2005 (Fone et Nutt, 2005).

À plus long terme, un essai clinique de 14 mois regroupant 579 enfants atteints de TDA/H-C et âgés de 7 à 10 ans a été mené (The MTA Cooperative Group, 1999). Les enfants ont été répartis en quatre groupes : (i) traitement au MPH, (ii) thérapie comportementale (à l'école, par les parents et par des médecins), (iii) traitement combiné : traitement au MPH et thérapie comportementale, (iv) soins à domicile. Les quatre groupes ont montré des réductions importantes des symptômes au fil du temps, avec des degrés différents de changements entre eux. Les enfants qui ont reçu le traitement au MPH ainsi que ceux qui ont reçu le traitement combiné ont montré une amélioration significativement plus importante des différents symptômes que les autres sujets. Le traitement combiné ainsi que la simple prescription de MPH n'a pas présenté de différence entre les effets. Cependant, ces traitements au MPH ont de bien meilleurs résultats comparativement au traitement sans MPH en ce qui concerne les symptômes agressifs, les relations avec les parents ou les enseignants et l'aptitude à lire. Les stratégies thérapeutiques avec médication ont donc de bien meilleurs résultats pour le traitement des symptômes du TDA/H. Une étude plus récente (Silva et al, 2008) menée chez 82 enfants âgés de 6 à 12 ans a également mis en avant les effets bénéfiques sur les symptômes d'un traitement par du MPH à libération prolongée. Dans cette étude, aucun effet indésirable grave n'a été signalé.

L'arrêt de la prise du MPH coïncide avec la résurgence des symptômes chez la plupart des sujets souffrant du TDA/H (Rosenfeld, 1979 ; Bolea-Alamanac et al, 2013).

Ces études ont présenté l'efficacité et l'innocuité du MPH dans le traitement du TDA/H que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant. Cependant, l'absence de toxicité apparente ou d'effets secondaires conséquents associés à la prise de MPH n'indique

pas nécessairement une absence totale de danger pour la santé (Morris et al, 2012). D'autres études cliniques sont nécessaires pour conclure sur l'efficacité et surtout sur la sûreté de la prise de MPH et comprendre l'impact réel à long terme de cette pharmacothérapie. En effet, le TDA/H est une maladie qui perdure à l'âge adulte (Robinson et al, 2002 ; Biederman et Spencer, 2002 ; Safren et al, 2005), ce qui peut amener chez les patients une prise de MPH sur le long terme et peut conduire à une exposition prénatale au MPH en cas de grossesse.

VII - Le Méthylphénidate au cours du développement

La plupart des études précliniques réalisées lors du développement cérébral modélisent une exposition au MPH durant l'adolescence et étudient les effets comportementaux et les neuroadaptations biochimiques cérébrales à long terme.

L'adolescence est la période de transition entre l'enfance et la vie adulte. Pendant l'adolescence, de profonds changements hormonaux et physiques se produisent. Le cerveau de l'adolescent subit des changements et des remaniements notamment au niveau des systèmes de neurotransmetteurs, y compris le système dopaminergique. En outre, un répertoire comportemental particulier est observé chez les humains et chez les rongeurs dans une période largement identifiée comme leur adolescence, c'est à dire pour ces derniers entre les jours postnataux 28 et 50 (Laviola et al, 2003) comme le présente la **Figure 11**.

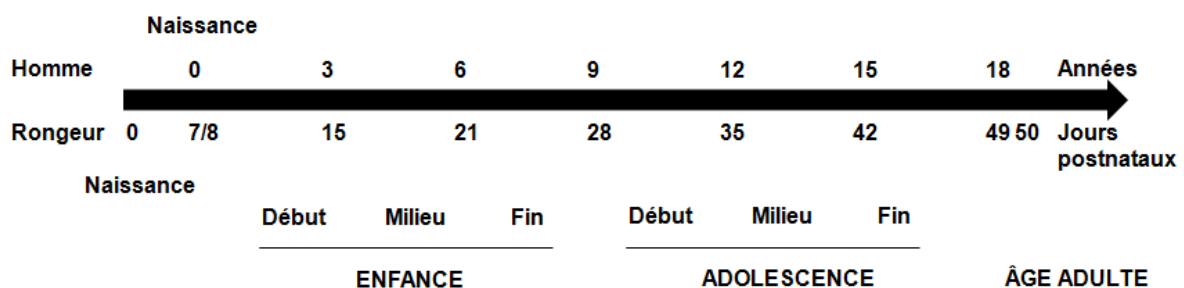


Figure 11 : Comparaison des périodes de vie de l'enfance et de l'adolescence entre l'homme et le rongeur (d'après Marco et al, 2001).

Un intérêt particulier a été consacré à l'étude du système dopaminergique, et des différences notables entre les animaux adolescents et adultes ont été décrites après un traitement au MPH. En effet, le profil de développement spécifique du système dopaminergique pendant l'adolescence peut contribuer à certains comportements au cours de cette période (Andersen et al, 2002). De nombreux remodelages des circuits corticaux et limbiques ont été identifiés comme une caractéristique biologique de l'adolescence. Des phénomènes de prolifération des terminaisons axonales et des synapses et de plasticité surviennent au niveau de ces circuits (Chechik et al, 1999). L'expression des RD1 et RD2 dans le striatum chez le rat, est au plus haut à l'adolescence entre P28 et P40 (Tarazi et al, 1998 ; 1999). Des particularités dans la maturation des systèmes de neurotransmetteurs dopaminergique et sérotoninergique ont également été rapportées chez les rongeurs adolescents, pouvant conduire à des discontinuités dans les fonctions méso-limbique et fronto-corticale (Chambers et Potenza, 2003).

En raison de son profil pharmacologique et de son rôle thérapeutique dans le TDA/H, les études précliniques sur le MPH ont également porté sur le circuit limbique cortico-striatal, une boucle impliquée dans le traitement de l'information émotionnelle et comportementale. Diverses régions de ce circuit ont été particulièrement considérées comme le CPF, le striatum dorsal et ventral ainsi que l'hippocampe. Le Nac est une partie du striatum ventral essentielle dans le système de récompense qui reçoit entre autre des informations du CPF, du cortex enthorinal, de l'hippocampe, de l'amygdale baso-latérale, du thalamus et de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et se projette au niveau du pallidum ventral, de la substance noire (SN), de la VTA et de l'hypothalamus (Noori et al, 2012) (cf **Figure 12**).

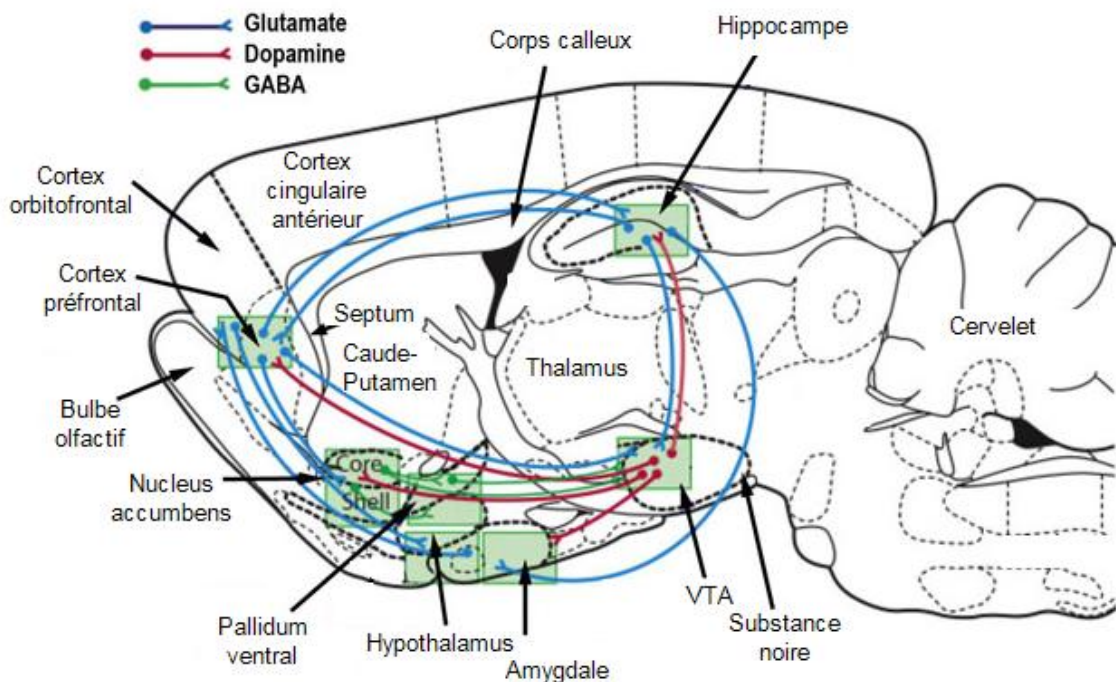


Figure 12 : Schéma représentant les noyaux clés (carrés verts) du système limbique sur une coupe sagittale de cerveau de rat : amygdale, hippocampe, CPF, hypothalamus, Nac, pallidum ventral et VTA. Les neurones dopaminergiques issus de la VTA (flèches rouges), les voies glutamatergiques (flèches bleues) reliant le CPF, l'hippocampe et les ganglions de la base et les neurones inhibiteurs GABAergiques (flèches vertes) constituent les circuits neuronaux principaux du système dopaminergique mésolimbique (d'après : www.sites.sinauer.com).

A/ Effets spécifiques du MPH sur le cerveau adolescent

Plusieurs études ont montré que le MPH et autres psychostimulants comme la cocaïne et l'amphétamine affectent différemment les rats adolescents comparés aux rats adultes (Bolanos et al, 1998 ; Laviola et al, 1995). Une étude récente d'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez le rat a étudié les différences neuro-fonctionnelles et de réponses cérébro-vasculaires à la suite d'une administration de MPH chez une population de rats adolescents comparée à une population adulte (Canese et al, 2009). Les résultats ont montré que l'administration aiguë de MPH provoque des changements dans l'intensité du signal BOLD en fonction des régions. Le signal BOLD en réponse au MPH est détecté dans un certain nombre de régions, mais l'ampleur, la direction (positive ou négative) et le profil temporel de ces variations de signaux sont nettement différents chez les adolescents comparés aux

rats adultes. Chez les rats adultes, le MPH induit une augmentation de l'intensité du signal BOLD spécifiquement dans le Nac et dans le CPF. Ces deux régions ont une activation simultanée après l'administration du MPH, avec un profil temporel similaire. Au contraire, dans la population d'adolescents, une baisse généralisée de l'intensité du signal BOLD a été observée. Une fois de plus, les profils temporels du signal BOLD des deux régions sont similaires pour le CPF et le Nac, avec des changements qui ont lieu peu de temps après l'injection de MPH (cf **Figure 13**). D'autres études sur le MPH (Hewitt et al, 2005) ainsi que des travaux utilisant la cocaïne (Febo et al, 2005), l'amphétamine (Dixon et al, 2005) ou la guanfacine (Easton et al, 2006) ont également rapporté des réponses BOLD similaires dans CPF et Nac. Ces résultats sont en accord avec les réarrangements et remodelages (liés à l'âge) des systèmes monoaminergiques centraux qui sont ciblés par le MPH, et provoquent donc une réponse neuronale et/ou cérébrovasculaire au MPH différente au sein l'adolescence.

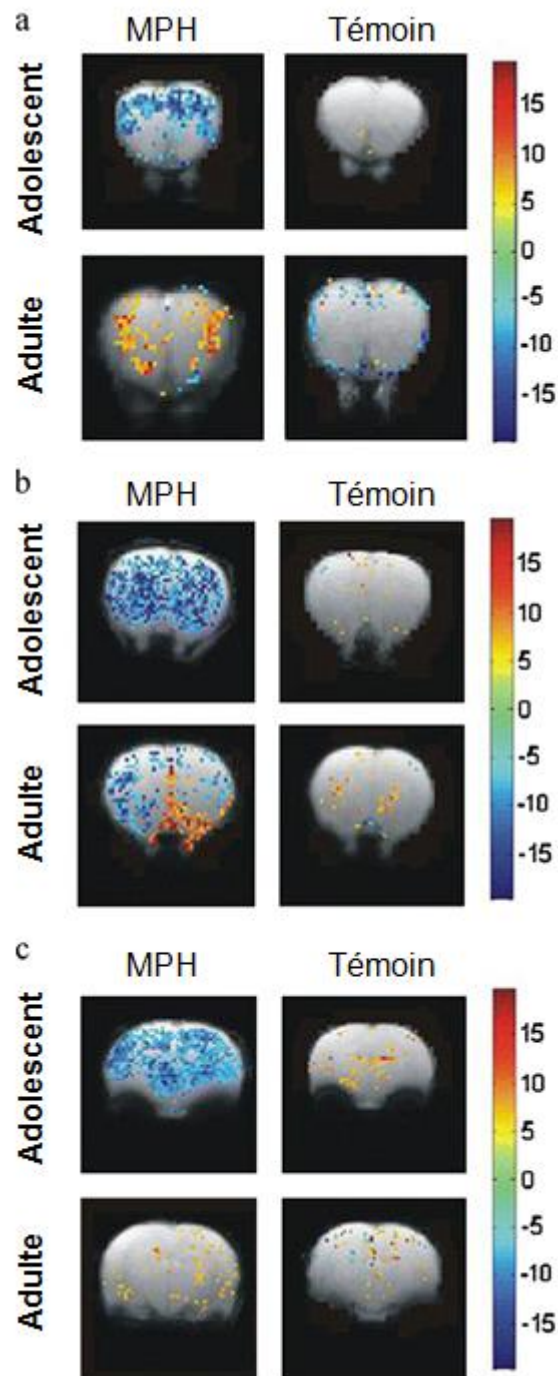


Figure 13 : Effets du MPH sur les cerveaux de rat adolescent et adulte visualisés en IRM fonctionnelle. Les cartes de signal BOLD (en échelle de couleur) sont superposées sur un template IRM anatomique de rat (échelle de gris) : (a) CPF (+2,7/Bregma), (b) Nac (+1,0/Bregma), (c) Hippocampe (-4,8/Bregma). Les rats anesthésiés à l'isoflurane ont été examinés (IRM 4,7 T) pendant 30 minutes avant (état basal) et 30 minutes après l'administration de MPH (0 ou 4 mg/kg i.p.). Les échelles de couleur représentent le niveau de significativité (test t de Student, seuil $P < 0,05$), obtenu pour chaque pixel lorsque l'intensité du signal en réponse au MPH est supérieure ou inférieure à la valeur basale (d'après Canese et al, 2009).

Avec l'inattention et l'hyperactivité, l'impulsivité est un symptôme clé du TDA/H. Ce comportement impulsif peut être défini de plusieurs manières, et l'un des paradigmes les plus largement adoptés suppose que les sujets impulsifs sont intolérants à des situations où la récompense est retardée : les petits renforcements immédiats sont préférés à des récompenses plus importantes qui viennent seulement après un délai (Evenden, 1999). L'exposition au MPH pendant l'adolescence a pour conséquence d'augmenter la préférence pour une récompense plus grande mais retardée, dans une tâche d'*intolerance-to-delay*, autrement dit de réduire l'impulsivité de l'animal (Adriani et Laviola, 2004).

Les effets de l'administration chronique de MPH chez des animaux adolescents diffèrent des animaux adultes. En effet, l'administration chronique de MPH induit un phénomène de sensibilisation chez les rats adultes, caractérisé par l'augmentation progressive des réponses locomotrices à la suite d'une administration répétée de MPH (Yang et al, 2003). Cette sensibilisation n'est pas retrouvée chez les rats adolescents (Yang et al, 2006). Par conséquent, l'âge de l'animal joue un rôle déterminant dans les effets chroniques du MPH.

B/ Conséquences moléculaires et métaboliques à long terme de l'exposition au MPH chez l'adolescent

L'exposition répétée de cocaïne ou d'amphétamine provoque des changements stables dans l'expression des gènes et des altérations persistantes dans la morphologie dendritique au sein du système mésocorticolimbique dopaminergique, la voie principale du circuit de la récompense, particulièrement au sein du striatum (Canales et al, 2005). Des études moléculaires ont suggéré que des changements similaires pourraient également se produire avec une exposition au MPH, surtout pendant l'adolescence (Yano et Steiner, 2007). Les effets d'une exposition aiguë ou chronique au MPH sur les molécules de signalisation neuronale et de plasticité synaptique, y compris les facteurs de transcription, les neuropeptides et les composants des cascades de signalisation ont été récemment évalués, et ces effets moléculaires sont comparables à ceux produits par la cocaïne et

l'amphétamine (Banerjee et al, 2009 ; Brandon et al, 2003 ; Shen et Choong, 2006). Certains changements moléculaires, comme ceux sur les gènes d'activation précoce, sont également similaires à ceux observés avec la cocaïne et les amphétamines (Brandon et Steiner, 2003). D'autres effets, notamment sur l'expression de molécules neuronales post-synaptiques (comme *homer1a*) ou de peptides opioïdes, diffèrent entre les traitements au MPH, à la cocaïne et à l'amphétamine. Ces différences supportent la notion que le MPH induit des neuroadaptations en parties différentes que celles induites par la cocaïne et l'amphétamine (Yano et Steiner, 2007). Les effets sur l'expression des gènes/protéines au sein du striatum de l'administration aiguë (**Tableau 3**) ou chronique (**Tableau 4**) de MPH sont répertoriés ci-dessous.

Des changements de comportements durables causés par une exposition répétée aux drogues psychoactives, comme la sensibilisation, sont susceptibles d'entraîner des changements dans l'expression des gènes des voies mésocorticale et mésolimbique dopaminergiques. L'ensemble du complexe striatal a été choisi pour les expériences de puce à ADN comme une zone cible représentative du circuit de la récompense depuis que des changements moléculaires induits par le traitement au MPH ont été observés dans les régions du caudé putamen ou striatum dorsal chez le rat (Yano et Steiner, 2007). Quelques 700 gènes montrent des changements significatifs dans leur expression striatale à la fin de l'exposition au MPH chez des animaux adolescents (Adriani et al, 2006 ; 2006).

Références	Gène/Protéine	Espèce	Âge	Dose (mg/kg)	Administration	Effet
Adriani et al, 2006 Brandon et Steiner, 2003	<i>c-fos</i>	rat	P35, P46	2 à 10	i.p.	Augmentation
Chase et al, 2003 Chase et al, 2003	<i>c-fos</i>	rat	P38	1 à 20	s.c.	Augmentation
Penner et al, 2002 Hawken et al, 2004	<i>c-fos</i>	souris	P3-45	5 à 40	s.c.	Augmentation
Brandon et Steiner, 2003 Cotterly et al, 2007	<i>zif268</i>	rat	P35	2 à 10	i.p.	Augmentation
Chase et al, 2003	FosB	rat	P38	2 et 10	s.c.	Augmentation
Adriani et al, 2006 Cotterly et al, 2007	<i>homer1a</i>	rat	P35, P46	2 et 5	i.p.	Augmentation
Chase et al, 2007	<i>arc</i>	rat	P38	2 et 10	s.c.	Augmentation
Chase et al, 2007	<i>arc</i>	rat	P26	2 à 10	p.o.	Augmentation
Banerjee et al, 2009	<i>arc</i>	rat	P25	2	i.p.	Augmentation
Chase et al, 2007	BDNF	rat	P38	2 et 10	s.c.	Pas d'effet

Tableau 3 : Effets à long terme d'une administration aiguë de MPH chez le rat adolescent sur l'expression des gènes/protéines au sein du striatum (i.p. : intrapéritonéale ; s.c. : sous-cutanée ; p.o. : par voie orale).

Références	Gène/Protéine	Espèce	Âge	Dose (mg/kg)	Basal ou Challenge (mg/kg)	Administration	Effet
Chase et al, 2003 Chase et al, 2005	<i>c-fos</i>	rat	P25-37	1 à 10	1 à 10	s.c.	Augmentation moindre / MPH aigu
Hawken et al, 2004	<i>c-fos</i>	souris	P26-38	5 et 40	5 et 40	s.c.	Augmentation moindre/ MPH aigu
Cotterly et al, 2007	<i>zif268</i>	rat	P35-41	10	5	i.p.	Augmentation moindre / MPH aigu
Chase et al, 2005	FosB	rat	P25-37	2 et 10	2 et 10	s.c.	Augmentation / MPH aigu
Adriani et al, 2006	CREB	rat	P30-45	2	2	i.p.	Pas de changement / témoin
Adriani et al, 2006	<i>homer1a</i>	rat	P30-45	2	2	i.p.	Pas de changement / témoin
Cotterly et al, 2007	<i>homer1a</i>	rat	P35-41	10	5	i.p.	Identique / MPH aigu
Chase et al, 2007	<i>arc</i>	rat	P25-37	2 et 10	2 et 10	s.c.	Augmentation moindre / MPH aigu
Chase et al, 2007	<i>arc</i>	rat	P25-37	7,5	7,5	p.o.	Identique / MPH aigu
Chase et al, 2007	BDNF	rat	P25-37	2 et 10	2 et 10	s.c.	Augmentation moindre / MPH aigu
Brandon et Steiner, 2003	Dynorphine	rat	P35-41	10	basal	i.p.	Augmentation / témoin
Adriani et al, 2006	Dynorphine	rat	P30-45	2	basal	i.p.	Pas de changement / témoin
Brandon et Steiner, 2003	Enképhaline	rat	P35-41	10	basal	i.p.	Pas de changement / témoin

Tableau 4 : Effets à long terme d'une administration répétée de MPH chez le rat adolescent sur l'expression des gènes/protéines au sein du striatum (adapté de Yano et Steiner, 2007) (i.p. : intrapéritonéale ; s.c. : sous-cutanée ; p.o. : par voie orale ; basal ou challenge : taux basal ou après un challenge au MPH avec le même mode d'administration que pendant le traitement chronique).

D'autres travaux ont étudié les conséquences à long terme d'une exposition au MPH durant l'adolescence en détectant les changements fonctionnels au niveau du striatum dorsal et du Nac, ainsi qu'au niveau du CPF (Adriani et al, 2007). En utilisant de la spectroscopie à résonance magnétique (SRM) au ¹H chez des rats

anesthésiés, il a été constaté que la créatine et la taurine, deux métabolites impliqués dans l'apport d'énergie aux cellules musculaires et dans l'efficacité synaptique respectivement, sont modulées de manière opposée au sein du striatum dorsal et du Nac, à savoir une augmentation dans le premier et une diminution dans le second après une exposition au MPH durant l'adolescence (cf **Tableau 5**) (Adriani et al, 2007). Les niveaux de taurine dans une région donnée seraient un indice de réactivité régionale aux influx nerveux synaptiques et donc de la fonctionnalité cérébrale locale.

Métabolite	Témoin	MPH
Striatum dorsal		
choline	0,35 ± 0,02	0,40 ± 0,01*
créatine	1,42 ± 0,05	1,53 ± 0,04*
glutamine	1,03 ± 0,09	0,99 ± 0,09
glutamate	1,65 ± 0,09	1,77 ± 0,03
taurine	1,25 ± 0,09	1,47 ± 0,07*
inositols	1,24 ± 0,06	1,38 ± 0,04
Nac		
choline	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,02
créatine	1,75 ± 0,06	1,50 ± 0,07*
glutamine	1,12 ± 0,06	1,30 ± 0,08
glutamate	1,73 ± 0,09	1,75 ± 0,11
taurine	1,35 ± 0,10	1,05 ± 0,08*
inositols	1,06 ± 0,05	0,99 ± 0,13

Tableau 5 : Effets métaboliques à long terme d'une exposition au MPH au cours de l'adolescence dans deux régions du système dopaminergique : le striatum dorsal et le Nac. Les paramètres métaboliques ont été mesurés par SRM chez des rats mâles adultes qui ont subi une exposition au MPH (2 mg/kg, i.p.) durant leur adolescence (P30-44), *P<0,05 (d'après Adriani et al, 2007).

C/ Effets comportementaux à long terme d'une exposition au MPH chez l'adolescent

Les données provenant d'études chez les rongeurs rapportent que l'exposition aigüe ou chronique au MPH durant l'adolescence induit des changements neuronaux au sein du CPF, du Nac, du noyau caudé ou de la VTA (Brandon et al, 2001 ; Brandon et al, 2003 ; Prieto-Gómez et al, 2005 ; Yang et al, 2006 ; Claussen et

Dafny, 2011 ; Chong et al, 2012 ; Salek et al, 2012) aboutissant à des changements comportementaux durables qui sont encore présents à l'âge adulte.

Ces changements touchent en particulier les réponses émotionnelles et motivationnelles plus tard dans la vie, à l'âge adulte. En effet, l'exposition au MPH (2 mg/kg, i.p.) durant l'adolescence rend les animaux adultes moins sensibles à des récompenses naturelles comme le sucre. De plus, ces animaux sont plus sensibles à des situations stressantes, affichant des signes d'anxiété et une augmentation des taux de corticostéroïdes plasmatiques (Bolanos et al, 2003). Des tests de nage forcée ont également montré des états de dépression chez ces animaux (Carlezon et al, 2003). En outre, une augmentation des réponses psychomotrices ainsi qu'une vulnérabilité à l'auto-administration à la cocaïne ont été décrites chez des rats ayant eu une exposition répétée au MPH (1 à 10 mg/kg, i.p.) durant l'adolescence (Brandon et al, 2001 ; Harvey et al, 2011). Ces résultats, ainsi que ceux répertoriés dans le **tableau 6** suggèrent que l'exposition à des doses relativement faibles de MPH durant l'adolescence peut augmenter la prise de renforçateurs et donc avoir des conséquences sur la sensibilité des animaux adultes à l'auto-administration de cocaïne.

D'autres études ont rapporté que l'exposition au MPH durant l'adolescence induisait des adaptations comportementales et neurobiologiques, qui perduraient à l'âge adulte et qui sont compatibles avec une sensibilité accrue aux effets aversifs de la cocaïne (Andersen et al, 2002). En utilisant le conditionnement de préférence de place (CPP), il a été montré que l'exposition au MPH (P20 à P35) augmente les propriétés aversives de la cocaïne et réduit la sensibilité à cette récompense chez l'animal adulte (Carlezon et al, 2003). Une augmentation de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne a également été rapportée chez des rats administrés au MPH durant l'adolescence (de P30 à P46) (Adriani et al, 2006).

Des rats adultes exposés au MPH au cours de l'adolescence sont caractérisés par une diminution de leur niveau basal d'impulsivité (Adriani et al, 2007). Un tel résultat est en accord avec l'action thérapeutique du MPH sur les patients atteints de TDAH.

Références	Exposition au MPH	Tests comportementaux	Effets observés à l'âge adulte
Brandon et al, 2001	5 et 10 mg/kg, pendant 5 ou 7 jours, à partir de P35 2 mg/kg, pendant 7 jours, à partir de P35	Réponses motrices Auto-administration	Augmentation réponses psychomotrices à la cocaïne Augmentation de l'auto-administration à la cocaïne
Andersen et al, 2002	2 mg/kg, 2 fois par jour, de P20 à P35	CPP à la cocaïne	Sensibilité accrue aux effets aversifs de la cocaïne et moindre aux propriétés stimulantes locomotrices de la cocaïne
Bolanos et al, 2003	2 mg/kg, 2 fois par jour, de P20 à P35	Interaction sociale Préférence au sucre Réponse locomotrice à un nouvel environnement Croix sur-élevée et toilettage Comportement sexuel Nage forcée Taux de corticostérone en réponse à un stress de contention	Pas d'effet Diminution de la préférence au sucre Exploration moins spontanée Augmentation de l'anxiété et du toilettage Diminution du comportement sexuel Tendance pour des réponses de type dépressif Augmentation du taux de corticostérone
Carlezon et al, 2003	2 mg/kg, 2 fois par jour, de P20 à P35	CPP à la cocaïne Nage forcée Activité locomotrice	Sensibilité accrue aux effets aversifs de la cocaïne Tendance pour des réponses de type dépressif Phase d'habituation atténuée
Adriani et al, 2006	2 mg/kg, de P30 à P46	Réponses motrices <i>Probabilistic delivery task</i>	Augmentation des effets psychomoteurs de la cocaïne Augmentation de l'efficacité et/ou flexibilité
Adriani et al, 2007	2 mg/kg, de P30 à P44	<i>Delay discounting task</i>	Tolérance accrue au délai avant la récompense

Tableau 6 : Conséquences comportementales à long terme de l'administration chronique de MPH à l'adolescence. Toutes les expérimentations ont été réalisées chez le rat et le MPH a été administré en i.p. (d'après Marco et al, 2011). (CPP : conditionnement de préférence de place)

Au total, un certain nombre de travaux démontrent que des expositions au MPH pendant l'adolescence conduisent à long terme à des modifications dans le système de récompense ainsi que des comportements d'anxiété et de l'impulsivité chez les rongeurs mâles adultes. De plus, plusieurs études avec des protocoles similaires d'exposition au MPH ont également démontré que l'administration de ce psychostimulant durant l'adolescence induisait des changements moléculaires liés au réseau de la DA et des noyaux gris centraux.

VIII - Le Méthylphénidate et la grossesse / lactation

A/ Études cliniques

Les conséquences d'une exposition prénatale et d'une exposition durant l'allaitement au MPH ne sont pas encore bien établies. La décision de continuer la prise de MPH pendant la grossesse ou l'allaitement doit être prise par la femme et son partenaire sur les conseils du médecin. Il est en effet essentiel pour les cliniciens d'informer la femme et sa famille de l'état actuel des connaissances, y compris les incertitudes relatives aux conséquences de la prise du MPH pendant cette période (d'après : <http://www.mothersmatter.co.nz/Medications/Other/Methylphenidate.asp>). Quelques études ont suggéré une exposition, certes faible, du nourrisson pendant l'allaitement en cas de traitement maternel. Un rapport a en effet montré une trace de MPH dans le sang de l'enfant après l'allaitement (0,2% de la dose maternelle) (Fortinguerra et al, 2009). Une autre étude a également détecté une dose infantile de 0,16% de la dose maternelle chez une mère qui a repris du MPH dans la période du post-partum (Spigset et al, 2007). Ainsi, la décision d'allaiter pendant le traitement devrait faire l'objet d'une analyse risques - bénéfices (Hackett et al, 2005).

En règle générale, pendant la grossesse, il est préférable que tout traitement médicamenteux soit stoppé. Cependant, certaines patientes continuent de prendre leur traitement car les risques de résurgence des symptômes du TDA/H sont trop

importants et peuvent être trop invalidants. L'étude de cas suivante en est la parfaite illustration (Bolea-Alamanac et al, 2013) (cf **Figure 14**).

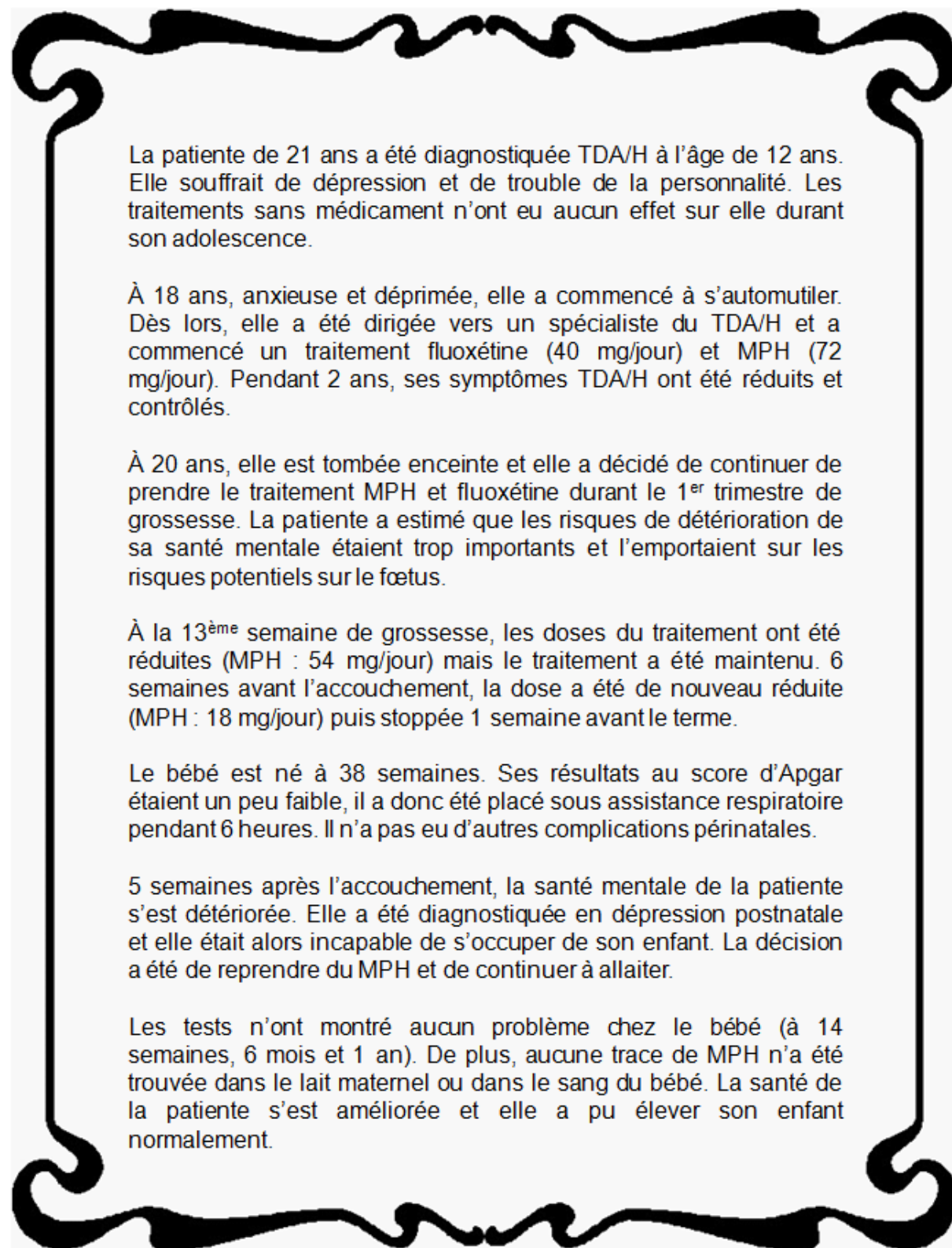


Figure 14 : Étude de cas d'une femme sous traitement MPH pendant la grossesse (adapté de Bolea-Alamanac et al, 2013).

Parmi la population adulte TDA/H, des femmes pourraient donc nécessiter d'un traitement au MPH pendant leur grossesse. Or, jusqu'à aujourd'hui, très peu d'informations sont disponibles sur les conséquences d'une exposition au MPH au cours du développement. En outre, il est montré que 66% des femmes TDA/H ont des grossesses prématurées ou non désirées (Barkley et al, 2008), il y a donc des risques d'expositions accidentelles à ce médicament. Seulement quelques études cliniques ont étudié la tératogénicité et les conséquences de cette exposition au MPH en début de grossesse chez l'humain. Humphreys et ses collaborateurs (2007) ont répertorié 63 cas d'exposition prénatale au MPH. Une vaste étude sur les drogues durant la gestation regroupant 50282 femmes (Heinonen et al, 1977) est la première à mettre en avant 11 cas d'expositions prénatales au MPH durant le premier trimestre de grossesse. Ces 11 expositions au MPH qui font partie au total de 96 grossesses exposées à des sympathomimétiques ont été analysées et aucune augmentation significative des malformations n'a été observée (Golub et al, 2005). Un second groupe de 13 nouveau-nés exposés en début de grossesse au MPH a été examiné dans le cadre d'une étude de surveillance des bénéficiaires de *Michigan Medicaid*. Une malformation majeure et un défaut cardiaque ont été observés dans ce groupe (Briggs et al, 2005). Une étude rétrospective a examiné les effets d'une administration intraveineuse abusive de MPH et de pentazocine (opioïde de la classe des analgésiques) chez 38 femmes enceintes (Debooy et al, 1993). Parmi ces 39 enfants exposés (dont deux jumeaux), 21% sont nés prématurément, 31% ont eu un retard de croissance et 28% avaient des symptômes de sevrage mais aucun effet tératogène ou sévère retard développemental n'a été observé. Les deux jumeaux présentaient des malformations compatibles avec le syndrome d'alcoolisme fœtal et des malformations majeures ont été observées chez deux autres enfants. De plus, un retard intellectuel a été observé chez 4 des 21 enfants qui ont été suivis pendant leur croissance. Cependant, cette étude n'avait pas de groupe témoin. En outre, l'administration concomitante de pentazocine et l'abus simultané de cigarettes, d'alcool et d'autres drogues au cours des grossesses n'ont pas permis de conclure véritablement sur les effets spécifiques du MPH. Une revue récente a répertorié l'ensemble des cas d'expositions prénatales durant le premier trimestre de grossesse en essayant de s'affranchir de ces abus (Dideriksen et al, 2013). Sur 180 enfants exposés, 4 enfants sont nés avec une malformation. L'exposition prénatale au MPH ne semble pas associée à un risque accru de malformations congénitales.

Cependant, la qualité et la quantité des données disponibles ne permettent pas une évaluation précise des risques. Il est donc très complexe de mener des études cliniques et de contrôler l'ensemble des facteurs environnementaux qui viennent interférer avec les résultats. Dans ce contexte, l'utilisation de modèles animaux représente l'occasion de dépasser ces limites.

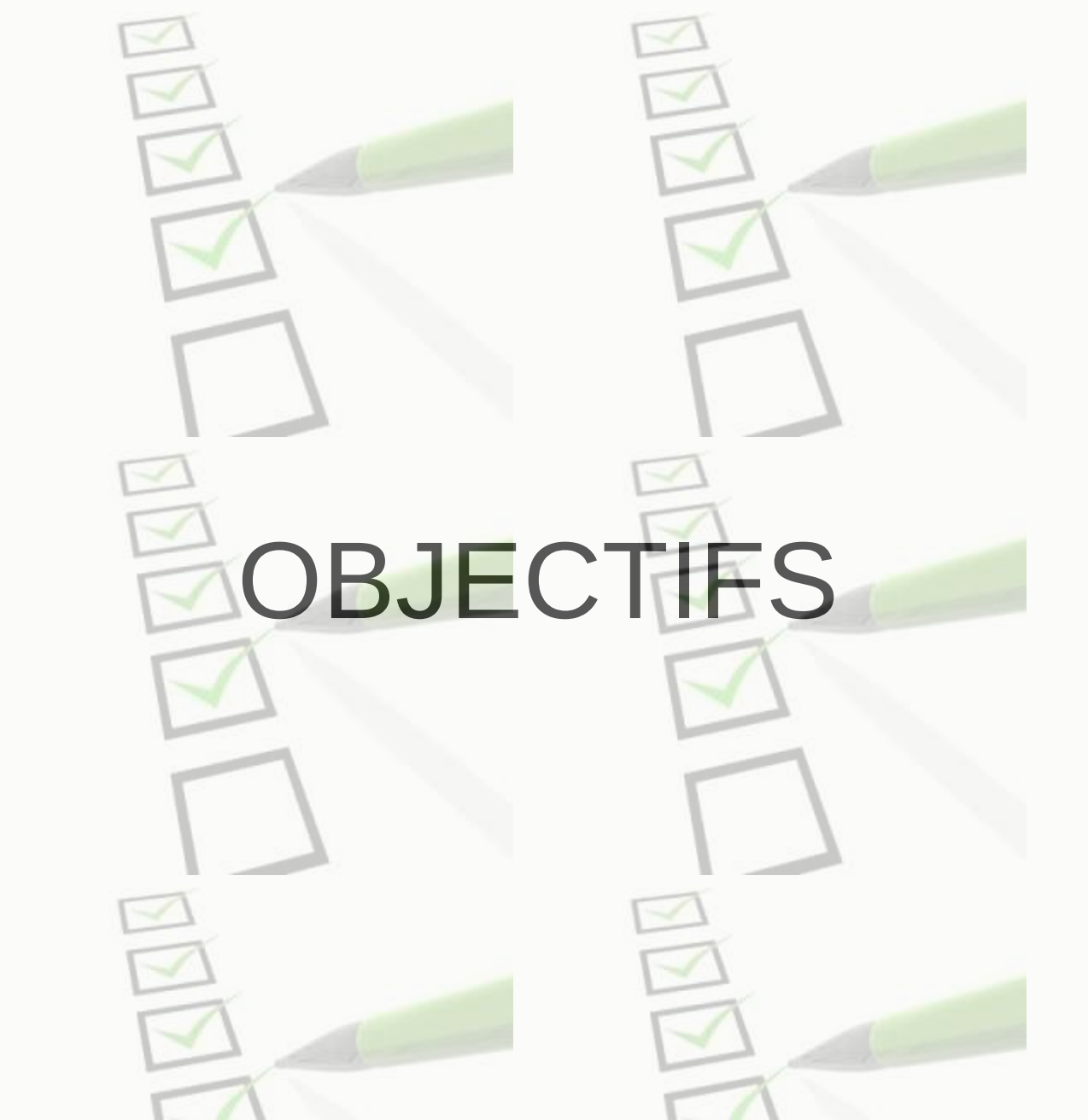
B/ Études précliniques

Seulement deux études précliniques ont exploré les conséquences à long terme de l'exposition prénatale au MPH chez la souris (McFadyen-Leussis et al, 2004 ; Lloyd et al, 2013), toutes deux comportementales. Le but de la première étude a été d'observer si l'administration de MPH pendant la gestation pouvait être néfaste pour le fœtus et de détailler les changements comportementaux qui résultent de cette administration à des moments distincts au cours du développement embryonnaire (McFadyen-Leussis et al, 2004). Le MPH a été injecté par voie sous-cutanée à la dose de 5 mg/kg à des souris femelles CD-1. Le psychostimulant a été administré quotidiennement sur trois périodes de trois jours : G8 à G10, G12 à G14 et G16 à G18 (G : jour de gestation) qui correspond à l'apparition précoce de la DA et de la NE pour G8 à G10, et de l'épinéphrine et la 5-HT pour G12 à G14. Pour la dernière exposition (G16-G18), le système dopaminergique est la plupart du temps en place. Comme le MPH est plus facilement métabolisé chez la souris par rapport à l'homme (Faraj et al, 1974), la dose de 5 mg/kg est à peu près équivalente à une dose clinique chez l'homme, qui varie de 0,3 à 1 mg/kg (Gerasimov et al, 2000 ; Solanto, 2000). Les changements physiques et moteurs ainsi que le comportement des animaux ont été évalués entre P3 et P11 (P : jour postnatal). À l'âge adulte (> P60), les souris ont été testées dans différentes expériences comportementales : open-field, croix surélevée, water maze ainsi qu'après un challenge aigu au MPH afin de déterminer si l'exposition prénatale a modifié ou non la réponse au MPH à cet âge. Très peu d'effets de l'exposition au MPH ont été observés sur les variables développementales (seulement pour la période d'exposition de G16 à G18, avec des résultats plutôt incohérents). Par contre, à l'âge adulte, les souris exposées au MPH durant la période G8 à G10 présentaient une diminution générale du comportement

d'anxiété et de peur et une augmentation concomitante du comportement exploratoire. Cependant, l'exposition prénatale au MPH n'a pas eu d'effet sur la réponse au challenge aigu de MPH. Ce paradigme expérimental de l'exposition prénatale au MPH a modélisé les effets à long terme du MPH lorsqu'il est administré pendant des périodes restreintes liées au développement des neurones dopaminergiques, norépinephrinergeriques et sérotoninergiques.

Dans l'étude la plus récente (Lloyd et al, 2013), le MPH a été administré chez la souris par voie i.p. à la dose de 10 mg/kg de G8 au jour de mise bas, soit durant toute la période de développement des systèmes dopaminergique et norépinéphrinergerique. L'analyse comportementale des animaux adultes a été effectuée à l'âge de 3 mois à l'aide d'un test mesurant l'attention et l'impulsivité ("5-Choice Serial Reaction Time Task"). Les animaux exposés au MPH ont montré des augmentations de leur impulsivité et motivation pour une récompense par rapport aux témoins. Cependant, dans cette étude, la dose administrée est supérieure aux doses cliniques (McNamara et al, 1993 ; Gerasimov et al, 2000) et les modifications comportementales observées sont la conséquence d'altérations neurobiologiques qui n'ont pour l'instant pas été identifiées.

Ces 2 études se sont focalisées sur les effets comportementaux à long terme d'une exposition prénatale au MPH. Ainsi, il n'y a toujours pas de données précliniques relatives à la modélisation d'une exposition prénatale au MPH et ses conséquences sur le fonctionnement cérébral à l'âge adulte.



OBJECTIFS

Le MPH est utilisé depuis des décennies pour traiter les symptômes narcoleptiques et surtout du TDA/H. Sa prescription qui va de l'âge de 6 ans à l'âge adulte est en constante augmentation (Robinson et al, 2002). Par conséquent, les risques d'exposition pendant la grossesse le sont également. Cependant, il n'y a encore aucune information concernant les modifications neurobiologiques consécutives à une exposition prénatale au MPH. Ainsi, l'objectif de cette étude est de mieux comprendre les conséquences à long terme d'une exposition prénatale au MPH. Pour cela, nous avons utilisé un modèle animal qui permet d'avoir un environnement contrôlé et des méthodes d'investigation complémentaires telles que l'imagerie cérébrale en TEP chez l'animal vivant, l'immunohistochimie, la microdialyse et le comportement.

Les cibles préférentielles du MPH sont les systèmes dopaminergique et norépinéphrinergique puisqu'il se lie au DAT et au NET (Sadasivan et al, 2012). Ces systèmes apparaissent tôt durant le développement (Lauder et Bloom, 1974). En effet, les neurones dopaminergiques et norépinéphrinergique apparaissent entre le 11^{ème} et le 17^{ème} jour de gestation chez le rat (Lauder et Bloom, 1974) et les éléments pré- et post-synaptiques apparaissent au début de la vie embryonnaire (Thompson et al, 2009). Ces données suggèrent un rôle central de ces deux systèmes dans le développement cérébral (Olsen et al, 1973 ; Lauder et Bloom, 1974 ; Levitt et al, 1997 ; Song et al, 2002 ; Ohtani et al, 2003). Comme le MPH traverse la barrière fœto-placentaire (Hackett et al, 2005) et compte tenu du mécanisme d'action du MPH sur la DA et la NE, nous avons supposé que l'exposition prénatale au MPH perturbe le développement des systèmes dopaminergique et norépinéphrinergique. De plus, puisque le MPH agit majoritairement au niveau du système dopaminergique (Gatley et al, 1996), nous avons fait l'hypothèse que l'exposition prénatale au MPH provoque des altérations structurales et fonctionnelles dopaminergiques. Enfin, comme le MPH est un psychostimulant et au vu du rôle du système dopaminergique (Rushworth et al, 2004 ; Di Chiara, 2002 ; Salamone et Correa; 2012), nous avons fait l'hypothèse d'une perturbation à l'âge adulte des circuits dopaminergiques impliqués dans les circuits de récompense et donc d'une apparition d'altérations comportementales impliquant l'activité de ce système dopaminergique vis-à-vis de récompenses naturelles et synthétiques.

Les objectifs de notre étude visent donc à vérifier ces hypothèses. Premièrement, nous avons cherché à déterminer quelles zones cérébrales ont été altérées à long terme à la suite de la prise de MPH au cours du développement par une méthode d'imagerie scintigraphique dédiée au petit animal. Deuxièmement, nous avons étudié les dysfonctionnements dopaminergiques sur le plan structural à l'aide de l'immunomarquage de la tyrosine hydroxylase (TH) et sur le plan fonctionnel avec des expériences de microdialyse *in vivo* afin de quantifier le taux extracellulaire de DA, d'immunohistochimie c-Fos, reflet de la plasticité post-synaptique et d'imagerie TEP. Ces études du plan fonctionnel ont été réalisées à l'état basal et suite à une stimulation du système dopaminergique par la cocaïne. Troisièmement, nous avons essayé de savoir si les anomalies neurobiologiques observées se traduisaient par des déficits comportementaux. Pour cela, nous avons ciblé nos expérimentations sur la fonctionnalité et la réactivité des circuits de récompense face à des renforçateurs naturel comme le sucre ou synthétique comme la cocaïne. Des tests de préférence et de réponse opérante au sucre ainsi que des tests d'auto-administration à la cocaïne et d'activité locomotrice ont ainsi été effectués.



MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - Animaux et protocole d'exposition au MPH

A/ Animaux

Toutes les expérimentations ont été réalisées chez le rat adulte (entre 70 et 90 jours de vie postnatale, P70 et P90 respectivement) provenant de femelles gestantes de souche Wistar (CERJ, Le Genest, France), arrivées au laboratoire à 6 jours de gestation (G6). Ces animaux ont été hébergés dans des cages individuelles et ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de la salle était maintenue à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, l'hygrométrie à $40 \pm 5\%$ et le cycle jour/nuit sous une alternance lumière/obscurité de 12 heures (lumière 7h-19h/obscurité 19h-7h).

La durée de gestation du rat est de 21 jours et nous avons considéré le jour de mise bas comme le premier jour de vie postnatale (P1) de la progéniture. À ce stade, le nombre de petits par portée a été relevé. Le sevrage a eu lieu à 21 jours (P21) et le sexage des animaux a été réalisé à ce moment. Les animaux ont alors été pesés chaque semaine jusqu'à l'âge adulte. Pour cette étude, seuls les mâles ont été conservés, les femelles et les mères ont donc été sacrifiées au sevrage. La progéniture mâle a été replacée dans de nouvelles cages par 3 ou 4 individus de même portée. Afin d'éviter tout stress postnatal, nous n'avons pas fait de portées croisées (Koehl al, 2001).

Dans cette étude, l'unité statistique a été la portée, c'est-à-dire qu'il n'a été utilisé qu'un seul animal par portée par expérimentation (OECD, Developmental neurotoxicity study, 2007), d'où de nombreuses sessions d'exposition. Au total, 8 sessions d'exposition et un total de 80 rates gestantes (35 exposées au MPH et 45 témoins) ont été nécessaires pour réaliser l'ensemble des expérimentations.

B/ Protocole d'exposition au MPH

Ces expérimentations ont été réalisées en accord avec les directives européennes 2010/63/EU pour le soin aux animaux de laboratoire ainsi qu'avec l'autorisation du comité régional d'éthique en expérimentation animale CREEA n°INSERM37-003. Pour chaque expérimentation, les rates gestantes ont été assignées au hasard à un groupe MPH ou à un groupe témoin exposés au MPH ou au sérum physiologique (véhicule du MPH), respectivement. Les traitements ont eu lieu en chronique une semaine après l'arrivée des femelles gestantes (à 6 jours de gestation : G6) au laboratoire tous les jours du 13^{ème} au 20^{ème} jour de gestation (G13 à G20) à 10 heures $\pm$ 1 heure par injection sous-cutanée de D-thréo-MPH hydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) à la dose de 10mg/kg/jour ou de sérum physiologique à volume équivalent (cf **Figure 15**).

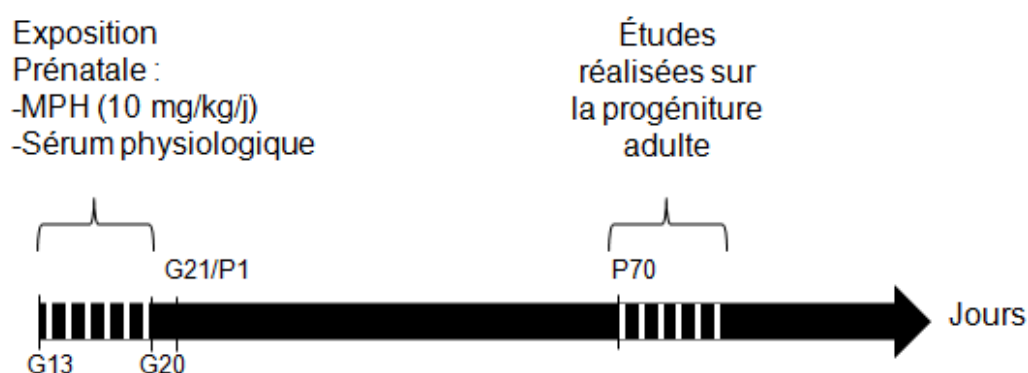


Figure 15 : Déroulé temporel du protocole d'exposition au MPH sur les rates gestantes et des expérimentations sur la progéniture adulte.

Cette période de 8 jours de G13 à G20 est la dernière semaine de gestation chez le rat et correspond à la fin du premier et une partie du second trimestre de grossesse chez la femme (Rice et Barone, 2000) (cf **Figure 16**). Des études ont suggéré que la meilleure façon de modéliser l'exposition humaine au MPH chez le rat consistait en l'administration de MPH à la dose de 2 mg/kg en i.p. ou 5 mg/kg per os (Gerasimov et al, 2000). Dans ces protocoles, les concentrations plasmatiques de MPH étaient malgré tout atteintes et éliminées plus rapidement que chez l'homme (Gerasimov et al, 2000). De plus, ces voies d'administration n'étaient pas adaptées à

notre étude en raison du risque de mauvaises injections chez les femelles gestantes en utilisant la voie i.p. et du stress induit par un gavage, seule méthode permettant la délivrance de quantités reproductibles entre les animaux. Il nous était donc nécessaire d'utiliser une autre voie d'administration pour notre étude. D'autres travaux menés chez le rat avaient montré qu'une administration sous-cutanée diminuait les taux d'absorption et la hauteur de pic plasmatique de drogues (Nayak et al, 1976) et résultait en une biodisponibilité et une durée d'action plus longues avec un pic plasmatique considérablement plus long comparé à la voie i.p. (Benetz et al, 1996). Ainsi, nous avons délivré du MPH aux rates gestantes par voie sous-cutanée à la dose de 10 mg/kg, qui est considérée comme étant dans la limite supérieure des doses utilisées en clinique quand elle est administrée en i.p., afin de mimer le plus précisément possible les conditions cliniques, d'améliorer la reproductibilité et de minimiser le stress des animaux (Gerasimov et al, 2000 ; Levi et al, 2012). Pour ces traitements, le point d'intromission de l'aiguille au niveau de la nuque a été différent chaque jour afin de limiter l'irritation due au traitement chronique.

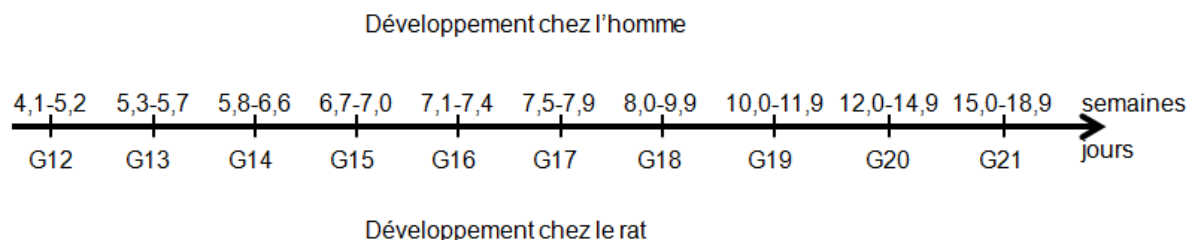


Figure 16 : Correspondance entre les périodes de développement chez l'homme et chez le rat (d'après Rice et Barone, 2000).

II - Imagerie scintigraphique : TEP

Afin de déterminer le métabolisme cérébral chez les animaux adultes, une étude en Tomographie par Émission de Positons (TEP) en utilisant du 2-deoxy-2- (^{18}F) fluoro-d-glucose (^{18}F FDG) a été réalisée chez les animaux exposés en prénatal au MPH et chez les animaux témoins. La TEP est une méthodologie qui nécessite un radiotraceur et qui permet de quantifier de manière non invasive et longitudinale des

processus physiologiques chez l'homme mais également chez le petit animal à l'aide de caméras spécifiques appelées microTEP. Le ^{18}F FDG est un analogue du glucose radiomarké qui est transporté du plasma sanguin vers les tissus. Comme le glucose est la principale source d'énergie des neurones dans le système nerveux central, le ^{18}F FDG s'accumule dans les cellules du cerveau car son métabolisme est bloqué à un stade précoce dans la glycolyse du fait de sa structure. Il devient alors facilement quantifiable grâce à son rayonnement et reflète le taux de glucose métabolique cérébral local (CMRglucose) (Sokoloff et al., 1977 ; Phelps et al., 1979) (cf **Figure 17**). Il est donc considéré que les différences de captation du ^{18}F FDG sont similaires aux différences de métabolisme cérébral et sont un reflet de l'activité neuronale. Ainsi, dans cette étude, le profil métabolique cérébral des animaux adultes exposés en prénatal au MPH a été déterminé par rapport aux témoins.

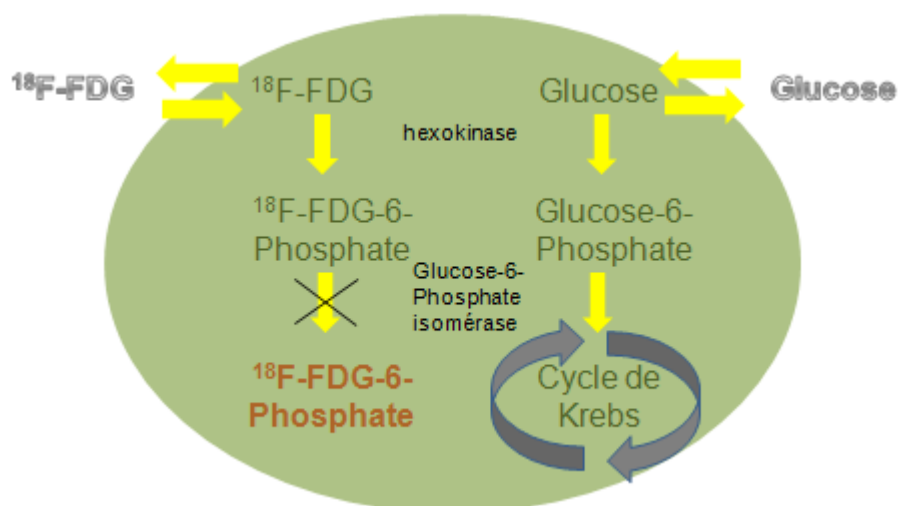


Figure 17 : Schéma du métabolisme cellulaire du FDG. Le ^{18}F -FDG s'accumule au sein de la cellule car son métabolisme est bloqué à un stade précoce de la glycolyse, et son accumulation devient alors facilement détectable de l'extérieur grâce à l'émission de son rayonnement.

A/ Protocole d'imagerie TEP

Pour cette expérimentation, 7 animaux témoins et 6 animaux adultes exposés en prénatal au MPH ont été utilisés. Les animaux ont été pesés le jour de l'expérimentation puis anesthésiés avec de l'isoflurane (Baxter, Maurepas, France)

(5% pour l'induction de l'anesthésie puis maintien à environ 2% durant le scan). Un cathéter a été placé dans la veine de la queue pour l'administration de ^{18}F FDG. Chaque animal a été placé dans un lit thermorégulé (Minerve, Esternay, France) et centré dans le champ de vue de la caméra microTEP eXplore VISTA-CT (GE Healthcare, France) (cf **Figure 18**).



Figure 18 : Photographie de la caméra microTEP eXplore VISTA-CT (GE Healthcare, France).

Durant tout le temps de l'expérimentation, l'animal a été maintenu à température ($37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) et rythme respiratoire constants (60 ± 10 inspirations par minute). Un scan CT ou scanner X (cf **Figure 19**) a été premièrement réalisé afin de générer une carte pour la correction d'atténuation des images TEP. Puis, une acquisition TEP en list-mode (permettant une mesure de la radioactivité par les détecteurs de la caméra à chaque seconde) a été lancée pour 60 minutes après l'injection d'un bolus de ^{18}F FDG à une dose de $18,5 \text{ MBq}/100 \text{ g}$ suivi d'une injection du véhicule. Cette dose est optimale pour l'imagerie métabolique chez le rongeur (Schiffer et al, 2007). En list-mode, les coïncidences détectées par le scanner sont retranscrites dans un fichier binaire, ce qui réduit la taille des données sans avoir à les compresser. Les scans en list-mode ont ensuite été réorganisés en 38 images : 10 images de 1 seconde chacune suivie de 2 images de 5 secondes, 4 de 10 secondes, 6 de 20 secondes, 2 de 60 secondes, 5 de 120 secondes et 9 de 300 secondes. Chaque scan a été corrigé des coïncidences aléatoires, de l'atténuation et de la diffusion et les images ont été reconstruites en images de captation de ^{18}F FDG à l'aide d'un algorithme 2D OSEM (GE Healthcare, Velizy, France) en voxels de $0,3875 \times 0,3875 \times 0,775 \text{ mm}^3$.

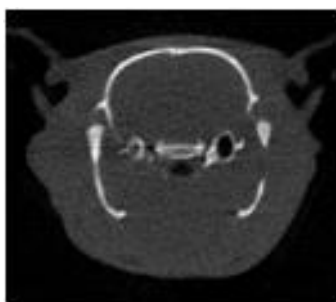


Figure 19 : Coupe coronale d'un cerveau du rat vu au scanner X.

B/ Analyse d'image

Les images brutes ont été traitées grâce aux logiciels PMOD v3.2 (PMOD Technologies LTD, Zurich, Suisse) et MATLAB (The MathWorks, USA). Comme l'anatomie du cerveau est très proche chez les animaux de même poids, le traitement des images a été effectué en réalisant une transformation rigide, sans aucune déformation ou mise à l'échelle (Rubins et al, 2003). Chaque scan a été individuellement lissé à l'aide d'un filtre gaussien afin de réduire les distorsions et d'améliorer le rapport signal sur bruit. Pour ce lissage, un noyau de $0,6 \times 0,6 \times 0,6 \text{ mm}^3$ FWHM a été utilisé. Les images ont ensuite été recalées en utilisant une fonction de similarité d'informations mutuelles avec la méthode de convergence d'optimisation de Powell (Schiffer et al. 2006) vers un référentiel commun qui est un template TEP- ^{18}FDG . Ce template a été recalé dans les coordonnées de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos et Watson, 1986) implémenté dans le logiciel PMOD. La transformation obtenue pour chaque animal a été sauvegardée et appliquée de nouveau sur les images sommées de la 30^{ème} à la 60^{ème} minute. Ces images sont utilisées pour l'analyse statistique afin d'éviter d'éventuels biais causés par l'activité initiale qui est plus dépendante du débit sanguin. Un masque du cerveau entier a été créé à partir des régions d'intérêts (ROI) de Schiffer fusionnées à l'atlas de Paxinos et Watson. Pour normaliser la fixation du ^{18}FDG , l'activité de chaque tissu a été divisée par l'activité cérébrale totale, représentée comme l'activité moyenne dans le masque du cerveau entier. Les zones extracérébrales ont été exclues avant l'analyse statistique par l'application d'un masque du cerveau sur les scans TEP. L'analyse de ces images a été réalisée par un mathématicien spécialiste du traitement du signal dans l'équipe.

III - Études des altérations dopaminergiques sur le plan structural et sur le plan fonctionnel à l'état basal et après stimulation du système dopaminergique

A/ Sur un plan structural : immunomarquage de la tyrosine hydroxylase

1- Protocole

La TH joue un rôle important dans la physiologie des neurones catécholaminergiques. Elle est essentielle dans le métabolisme de la L-tyrosine et donc dans la synthèse de la DA et la NE. En effet, à la suite de son activation par la phosphorylation produite par une protéine kinase A, cette enzyme cytoplasmique catalyse la transformation de la L-tyrosine en L-DOPA. Cette dernière est ensuite convertie en DA par l'enzyme dopa-décarboxylase, qui est ensuite transformée en NE par l'enzyme DA-bêta-hydroxylase et qui est finalement elle-même convertie en épinéphrine par l'enzyme phényléthanolamine-N-méthyltransférase. La TH est l'enzyme limitante de ce processus car elle est présente en quantité limitée. La TH est donc un marqueur des neurones DA et NE (cf **Figure 20**).

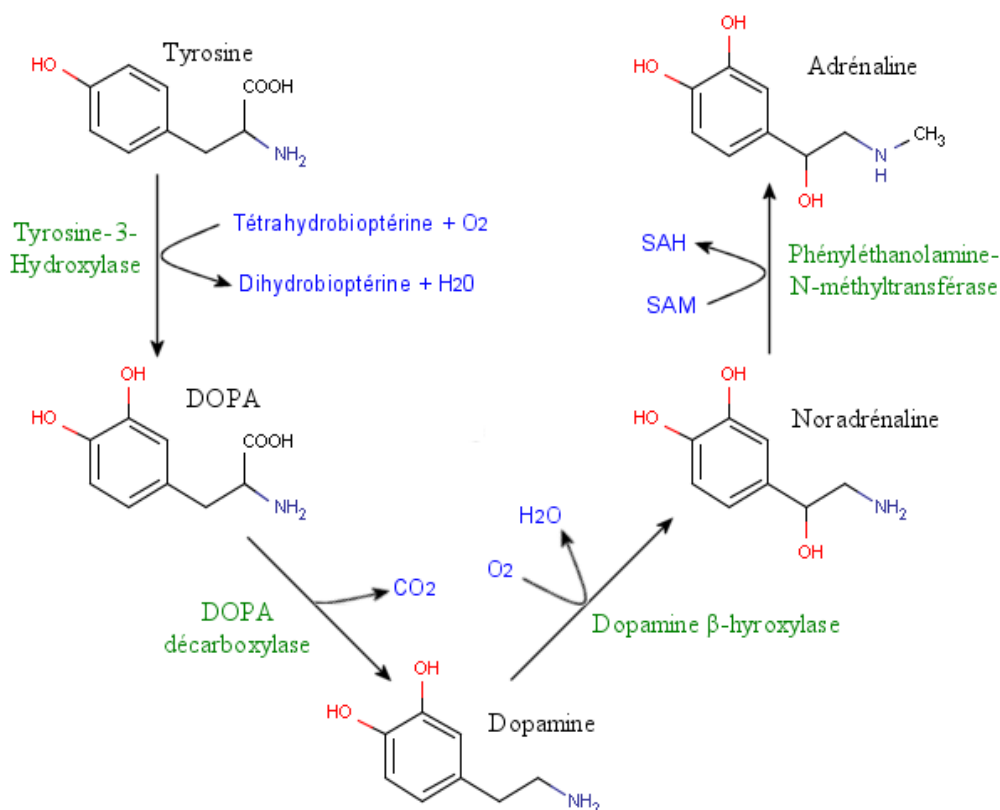


Figure 20 : Synthèse des catécholamines.

Les expérimentations ont été réalisées sur des animaux exposés en prénatal au MPH (n=8) ou au sérum physiologique (témoin) (n=5) (cf **Figure 21**). Les animaux utilisés pour ce marquage sont les mêmes que ceux utilisés pour l'immunohistochimie c-Fos (voir chapitre III B/ 2-1). Une injection de sérum physiologique (véhicule de la cocaïne) a eu lieu 90 minutes avant la perfusion intracardiaque, afin d'être dans les mêmes conditions que les animaux qui ont reçu une stimulation à la cocaïne.

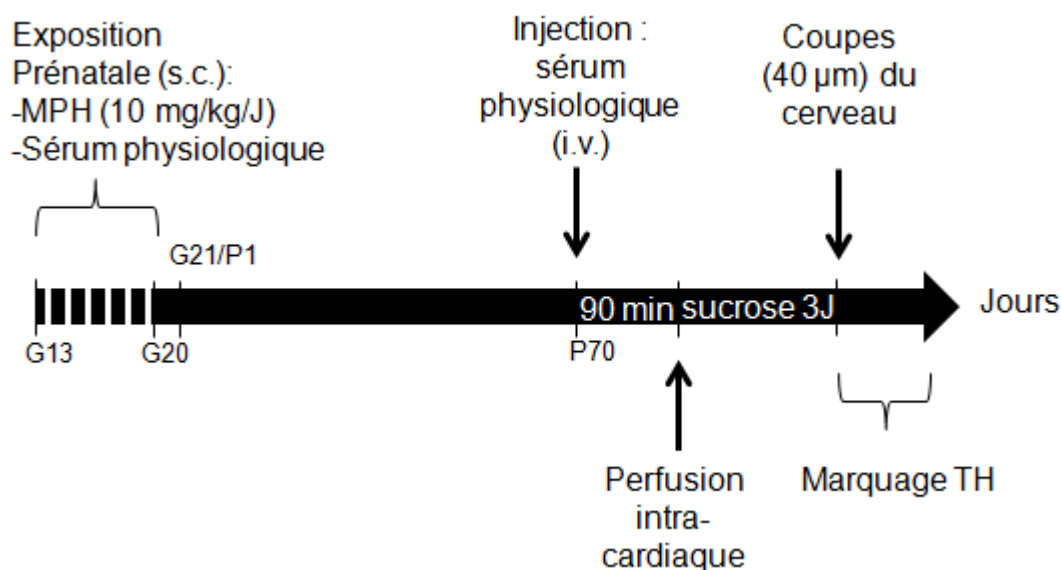


Figure 21 : Déroulement temporel du protocole d'immunohistochimie TH.

2- Préparation des tissus et réalisation des coupes

Quatre vingt dix minutes après l'injection de sérum physiologique (voir chapitre III B/ 2-1), l'animal a été profondément anesthésié avec 5% d'isoflurane puis maintenu à 2,5% durant la perfusion intra-cardiaque. L'animal a été placé sur le dos et sa cage thoracique est découpée afin de pouvoir atteindre le cœur. Une canule de perfusion a été implantée par l'apex du ventricule gauche et l'oreillette droite est perforée pour ainsi perfuser l'ensemble du système circulatoire avec 200 ml de sérum physiologique frais hépariné (20 UI/ml). Les tissus ont ensuite été fixés par perfusion de 200 ml d'une solution de PBS (tampon phosphate salin) 0,1 M (pH 7,4)-PFA (paraformaldéhyde) 4% fraîche et filtrée. Enfin, le cerveau est récupéré et laissé dans un bain de PB (tampon phosphate) 0,1 M (pH 7,4)-sucrose 30% durant 3 jours.

Des coupes de cerveau de 40 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome refroidissant (Leica Microsystems, Ile Saint Martin Nanterre, France) et disposées dans un mélange cryoprotecteur composé de 50% de PBS 0,01 M, 30% d'éthylène glycol et 20% de glycérol. Les coupes de cerveau ont été conservées au congélateur (-20°C). Il est à noter que chez un animal MPH, la partie des coupes les plus

postérieures n'a pas été récupérée et le comptage de la TH au niveau de la substance noire pars compacta (SNc) et VTA a donc été effectué sur 4 animaux.

3- Protocole de marquage

Après avoir été préalablement sélectionnées pour n'utiliser que des coupes entières, les coupes flottantes sont rincées trois fois dans du PBS 0,1 M durant 5 minutes. Après avoir bloqué les peroxydases endogènes pendant 10 minutes (solution de PB - H₂O₂ 3% - méthanol 10%) puis effectué 3 nouveaux rinçages dans du PB - Tween 0,2%, les coupes ont été incubées pendant 2 heures dans du PB (0,1 M) - Tween 0,2% et 5% de NGS (sérum normal de chèvre) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Les tissus ont ensuite été incubés pendant 24 heures avec un anticorps polyclonal anti-TH fait chez le lapin (AB152, Santa Millipore, MA, USA) dilué au 1:500 dans une solution contenant du PB 0,1 M, 2% de NGS et 0,2% de Tween. Puis, les coupes ont été rincées dans du PB - Tween 0,2% (3 fois 5 minutes) et à nouveau incubées durant 2 heures avec un anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de lapin (Vector Laboratories) dilué au 1:400 dans du PB 0,1 M - Tween 0,2% - NGS 2%. Après 3 nouveaux rinçages de 5 minutes dans du PB 0,1 M, les coupes ont été incubées pendant 1 heure avec le complexe avidine-peroxydase biotinylé (ABC kit, Vector Laboratories) pour amplifier le signal du complexe antigène/anticorps primaire et secondaire. Les tissus ont été rincés une fois dans du PB 0,1 M durant 5 minutes puis la révélation du marquage se fait par incubation des coupes pendant 1 minute dans une solution de 3,3'-diaminobenzidine diluée au 1:2 (DAB ; Vector Laboratories). Pour terminer la réaction avec le DAB, les coupes ont été rincées trois fois avec du PB 0,01 M. Toutes les coupes ont été montées sur lames silanisées et gélatinées, séchées puis déshydratées dans des bains à concentrations croissantes en alcool (50/70/96/96/100/100%) et xylène. Une dernière étape de séchage sous hotte a été nécessaire puis les coupes ont enfin été protégées par lamelle avec pour milieu de montage de l'Eukitt (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

4- Comptage

La quantification du marquage TH a été réalisée sous microscope optique (Leica DMLB, Leica Microsystems, Allemagne) à un grossissement x10 pour le comptage des corps cellulaires dopaminergiques au sein de SNc et de la VTA et un grossissement x2,5 pour la mesure d'absorbance des fibres catécholaminergiques au sein du striatum et du Nac. Cette quantification a été menée à l'aveugle. L'image est transmise à un système informatique par une caméra vidéo 3CCD (Sony Corporation, Tokyo, Japon) et analysée à l'aide du logiciel Histolab (Microvision Instruments, Evry, France). Les corps cellulaires marqués à la TH dans la SNc et la VTA ont été dénombrés sur les sections situées entre -5,04 et -6,48 mm par rapport au bregma (Atlas Paxinos et Watson). Ce comptage de cellules immunomarquées a été rapporté à la surface et a été moyenné pour chaque animal. Le marquage de la TH des fibres catécholaminergiques a été évalué sur toutes les coupes contenant le striatum et le Nac. Il est quantifié par soustraction automatique de l'absorbance au niveau du corps calleux (zone non immunoréactive pour laquelle l'absorbance correspond au bruit de fond) à celle des régions d'intérêts : striatum dorsomédial (DM), striatum dorsolatéral (DL) et les 2 régions du Nac (shell (NacSh) et core). Pour chaque région d'intérêt, la mesure de l'absorbance a été effectuée dans une aire de 0,5 mm² au niveau du striatum DM et DL et de 0,4 mm² au niveau du Nac et les différents comptages ont été moyennés afin d'obtenir une moyenne d'absorbance par mm² pour une région donnée (cf **Figure 22**).

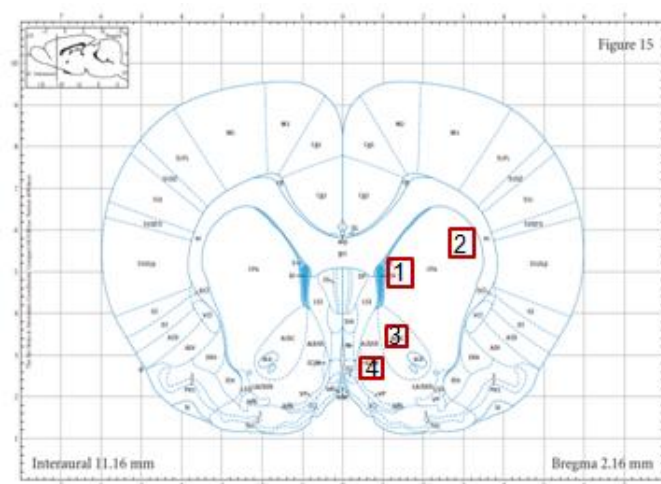


Figure 22 : Localisation des 4 aires au sein des régions cérébrales analysées pour la mesure de l'absorbance : (1 : striatum DM ; 2 : striatum DL ; 3 : core du Nac ; 4 : NacSh).

B/ Sur un plan fonctionnel

La stimulation du système dopaminergique a été réalisée par la cocaïne. Ce psychostimulant bloque le DAT comme le MPH et inhibe la recapture de la DA, prolongeant entre autres son effet dans la synapse (Beuming et al, 2008 ; Katzung et al, 2009) (cf **Figure 23**). La cocaïne est connue pour stimuler les régions du système de la récompense en bloquant la recapture de la DA notamment au niveau du Nac (Koob et Nestler, 1997). Ainsi, l'étude des altérations dopaminergiques sur le plan fonctionnel a été réalisée à l'état basal et après une stimulation pharmacologique à la cocaïne.

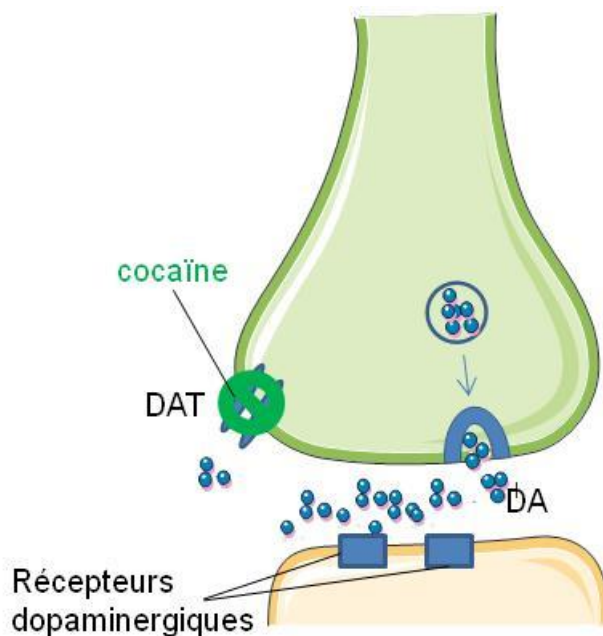


Figure 23 : Illustration du blocage de la recapture de la DA par la cocaïne au niveau pré-synaptique.

1- Quantification de la DA - Microdialyse intracérébrale en double implantation chez le rat anesthésié

Le principe de la microdialyse intracérébrale consiste à perfuser en continu une sonde de dialyse par une solution iso-osmotique (tampon phosphate modifié pour mimer la composition du liquide cébrospinal) contenant différents ions en concentrations physiologiques. Cette technique permet de recueillir les neurotransmetteurs présents au niveau cérébral dans la région d'intérêt. Les

concentrations de DA libérées en condition basale puis après stimulation pharmacologique ont été quantifiées par la suite par HPLC couplée à un détecteur électrochimique.

Pour cette expérimentation, les concentrations de DA ont été quantifiées dans le NacSh et dans le cortex cingulaire, chez 7 animaux adultes exposés en prénatal au MPH ainsi que 7 animaux adultes témoins. Ces deux régions cérébrales font partie du système limbique (Kötter et Stephan, 1997 ; Di Chiara, 2002).

1-1 Chirurgie

L'animal a été endormi dans la cage à induction pendant 3 à 4 minutes sous oxygène + isoflurane 5% (Baxter, Maurepas, France) puis a été placé dans un appareil à stéréotaxie (Stoelting, USA). Le rat a été maintenu anesthésié par inhalation à l'aide d'un masque (isoflurane 2%, volume d'air : 2 L/min). La température corporelle de l'animal a été maintenue à $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant toute la durée de l'expérimentation grâce à un banc thermostaté (CMA 150, CMA/microdialysis, Stockholm, Suède) (cf **Figure 27**). Un cathéter 24 gauges a été placé dans une des veines de la queue de l'animal, il va permettre l'administration de cocaïne (2 mg/kg) pour la stimulation pharmacologique (cf **Figure 27**). Il a été montré que cette dose de cocaïne augmentait la concentration de DA au niveau du CPF et du Nac chez le rat (Moghaddam et Bunney, 1989). La surface crânienne a été mise à jour et le Bregma, situé à l'intersection des sutures crâniennes coronales et sagittales, a été localisé (cf **Figure 24**).

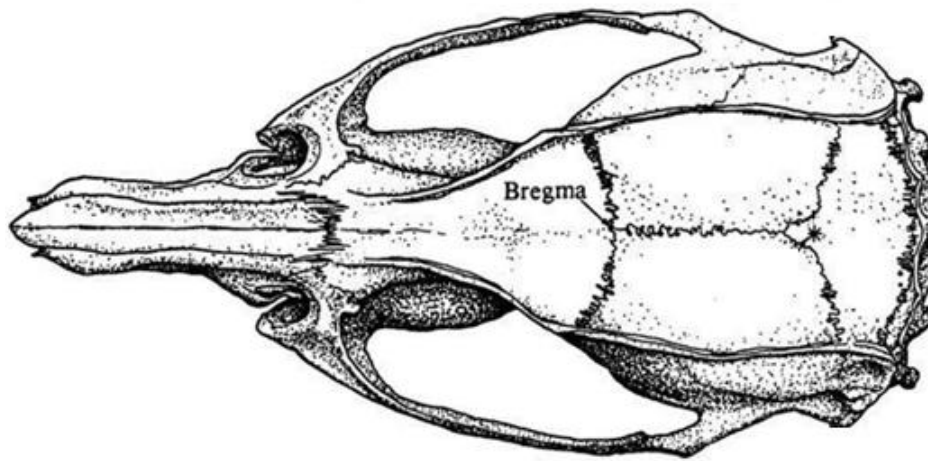


Figure 24 : Schématisation de la localisation du Bregma à l'intersection des sutures crâniennes coronales et sagittales chez le rat.

Un trou a été percé au niveau de chaque site d'implantation des sondes de microdialyse. Les coordonnées de localisation de ces sondes ont été déterminées à partir de l'atlas de Paxinos et Watson (1986). Elles sont pour le cortex cingulaire : AP = +4,6 mm avec un angle d'inclinaison de 26,5°, ML = +0,65mm et DV = -4,4 mm et pour le NacSh : AP = +1,6 mm, ML = +0,75 mm et DV = -7,6 mm (cf **Figure 25**).

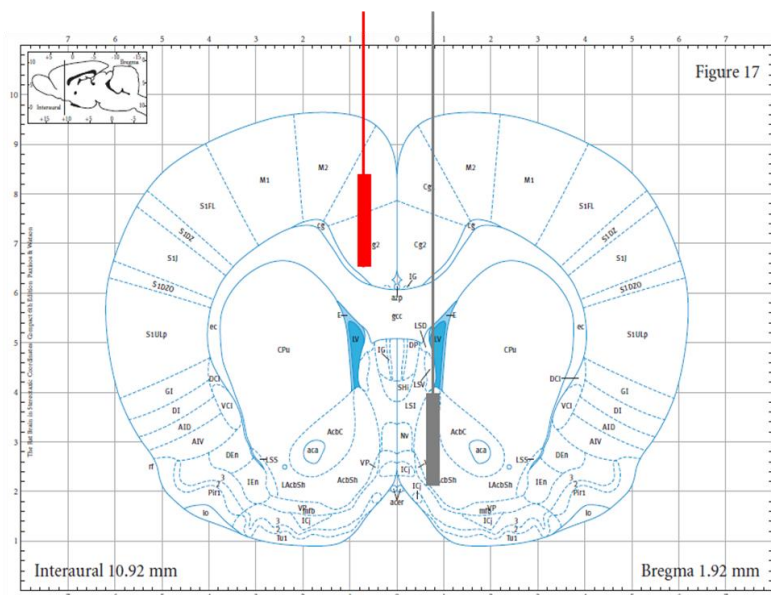


Figure 25 : Coupe d'atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson) illustrant la localisation de l'implantation des deux sondes de microdialyse au niveau du cortex cingulaire (en rouge) et du NacSh (en gris).

1-2 Les sondes et l'implantation

Les sondes de microdialyse utilisées dans cette étude sont des CMA 11 (CMA/Microdialysis, Kista, Suède). Celles-ci sont adaptées pour des expérimentations du cerveau chez des petits animaux. À l'une des extrémités se trouve la membrane semi-perméable de dialyse en cuprophane. La longueur de la membrane utilisée de 2 mm permet un recueil maximal au sein des structures d'intérêts et cette membrane est caractérisée par un seuil de "cut-off" qui permet de capter les molécules inférieures à 6000 Daltons. À l'autre extrémité se trouvent les tubules d'entrée et de sortie de la sonde (cf **Figure 26**). Celle-ci a été continuellement perfusée à un flux de 2,2 µl/min par une solution iso-osmotique ou tampon phosphate modifié à l'aide d'un pousse-seringue (CMA/microdialysis, Stockholm, Suède) (cf **Figure 27**). Il est composé de Na_2HPO_4 (2 mM), NaCl (145 mM), KCl (5 mM), MgCl_2 (1,2 mM) et CaCl_2 (1,2 mM) à pH = 7,4.

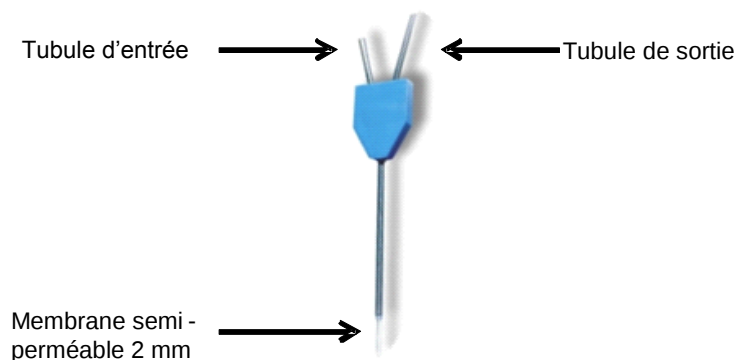


Figure 26 : Illustration d'une sonde de microdialyse.

Les sondes de microdialyse ont été implantées dans le cerveau grâce à des guides (MAB 6.14.IC, Microbiotech, Sweden) dans lesquels les sondes sont insérées. Ces guides vont permettre de rigidifier et donc de guider la sonde au travers des tissus cérébraux. Une fois les sondes en place, une période de 90 minutes a été attendue avant le recueil des microdialysats afin d'attendre l'équilibration du niveau basal de DA.

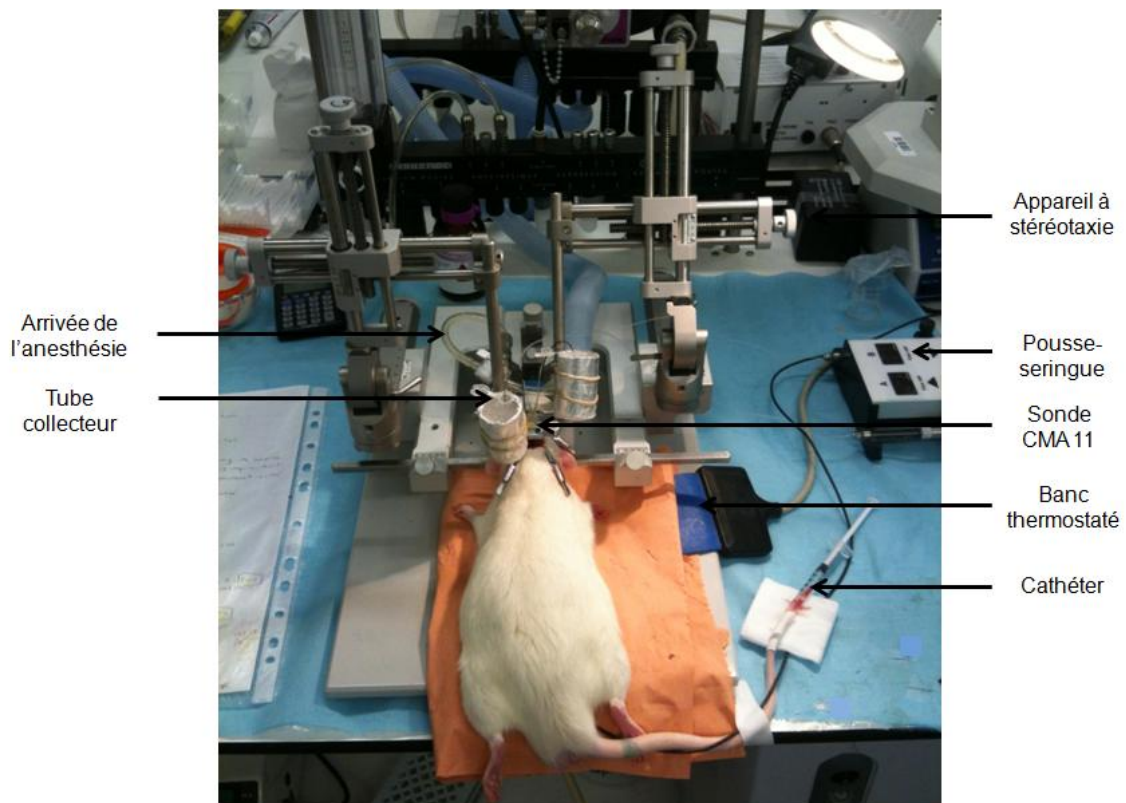


Figure 27 : Photographie illustrant la mise en œuvre de la microdialyse intracérébrale chez le rat.

1-3 Recueil des microdialysats

Durant la période de recueil, la pièce a été placée dans la quasi-obscurité pour que les microdialysats soient le moins possible au contact de la lumière, ceci pour minimiser au maximum la dégradation des monoamines. Dans cette même optique, il a été placé dans chaque tube collecteur 5 μ l d'acide ascorbique (200 μ M) (Khalid et al., 2011).

Après la période de 90 minutes d'équilibration, le recueil des microdialysats (25 μ l) a été effectué toutes les 10 minutes. Leur dosage permet de mesurer précisément la concentration des différentes molécules recherchées. Néanmoins, la sonde de microdialyse ne laisse passer qu'une petite fraction d'une substance donnée. Il est donc nécessaire de calculer le rendement des sondes. Ce rendement a été déterminé avant l'expérience par une calibration *in vitro* antérieure à

l'expérimentation *in vivo*. Pour cela, la sonde perfusée a été placée dans un milieu contenant une substance à doser avec une concentration connue (DA 10^{-8} M qui correspond à la quantité de DA censée être présente dans les échantillons). Deux dialysats ont été recueillis dans les mêmes conditions que l'expérimentation *in vivo* puis dosés. Le rapport des valeurs de la concentration théorique et de la concentration mesurée permet d'établir le rendement de la sonde. Ce rendement varie en fonction du débit de perfusion choisi, de la concentration de la substance dosée, de la température, de la composition du fluide de perfusion, des interactions possibles entre la substance et la membrane de dialyse (Westerink, 1995). Il est donc nécessaire de travailler dans des conditions strictement identiques pour chaque expérimentation (Benveniste et Huttemeier, 1990).

Les cinq premiers recueils vont contenir des concentrations de DA correspondant aux concentrations extracellulaires de cette molécule en condition basale. La concentration basale est la moyenne des concentrations déterminées à partir de ces premiers microdialysats. Après ces cinq recueils a été effectuée l'injection de cocaïne à la dose de 2 mg/kg en i.v. pour la stimulation pharmacologique et 6 nouveaux recueils ont été réalisés. Les microdialysats, une fois récoltés, ont été aussitôt placés dans la glace et à l'abri de la lumière jusqu'au dosage par HPLC.

À la fin de l'expérimentation, les sondes sont retirées. L'animal a ensuite été sacrifié et le cerveau a été prélevé et placé directement à -80°C . La correcte implantation des sondes de microdialyse a été vérifiée histologiquement (cf **Figure 28**) sur des coupes coronales de 20 μm réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica, Allemagne).

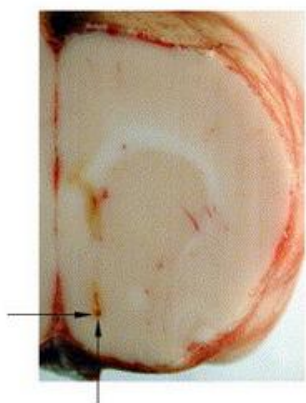


Figure 28 : Photographie illustrant le trajet de la sonde de microdialyse au sein du NacSh chez le rat. Les flèches indiquent la pointe de la sonde.

1-4 Quantification de la DA des échantillons par HPLC

Les taux de DA en condition basale ou après stimulation pharmacologique ont été dosés, à partir des microdialysats recueillis, par HPLC couplée à un détecteur électrochimique Coulochem III (Thermoscientific - Dionex, USA) (cf **Figure 29**).

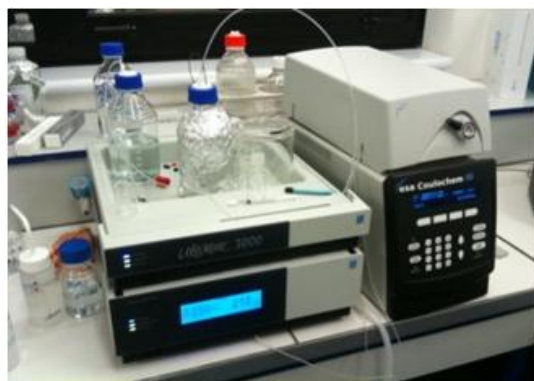


Figure 29 : Photographie de l'HPLC. À gauche : la pompe UltiMate 3000. À droite : le détecteur électrochimique Coulochem III.

Chaque échantillon a été injecté à l'aide d'une seringue Hamilton de 25 μ l dans une boucle d'injection de 20 μ l (Rheodyne 7725i injector valve). La seringue Hamilton servant à l'injection a été soigneusement rincée entre chaque utilisation afin d'éliminer toute trace de l'injection précédente. La phase mobile permettant la séparation optimale des monoamines est composée de 80% d'une phase aqueuse (150 mM d'acétate d'ammonium, 140 μ M EDTA) et de 20% d'une phase organique (15% de méthanol et 5% d'acétonitrile) à pH $6,0 \pm 0,1$. Cette phase mobile est ensuite doublement filtrée, sur filtre (pore de 0,45 μ m) (Sartorius stedim biotech, Allemagne) puis à l'aide d'une colonne Sep-Pak C18 (Waters, USA) puis elle va subir un dégazage par passage dans une cuve à ultrasons. La phase est ensuite incorporée dans le système HPLC où elle est entraînée par une pompe UltiMate 3000 (Thermoscientific - Dionex, USA) au débit de 0,2 ml/min. La séparation des composés est réalisée à l'aide d'une colonne de chromatographie ESA MD-160 (Shiseido, Tokyo, Japon ; 1,5 mm x 250 mm) maintenue à 32°C. La détection et la quantification des différentes monoamines sont assurées par un détecteur électrochimique de type ampérométrique. Les différentes catécholamines séparées par HPLC passent successivement dans la cellule analytique 5041 (ESA, USA) du détecteur au niveau de laquelle est imposé un potentiel constant de 220 mV qui induit leur oxydation (sensibilité : 20 nA). Cette cellule permet d'avoir une sensibilité de détection maximale (cf **Figure 30**). Les concentrations en DA ont été calculées en

comparant les aires sous les pics obtenus pour chaque échantillon à une courbe d'étalonnage. Cette courbe a été réalisée à partir d'une gamme de concentrations de DA de 10^{-6} M à 10^{-10} M (les concentrations attendues pour la DA étant de l'ordre du nM, Weiss et al, 1992 ; Hedou et al, 1999).

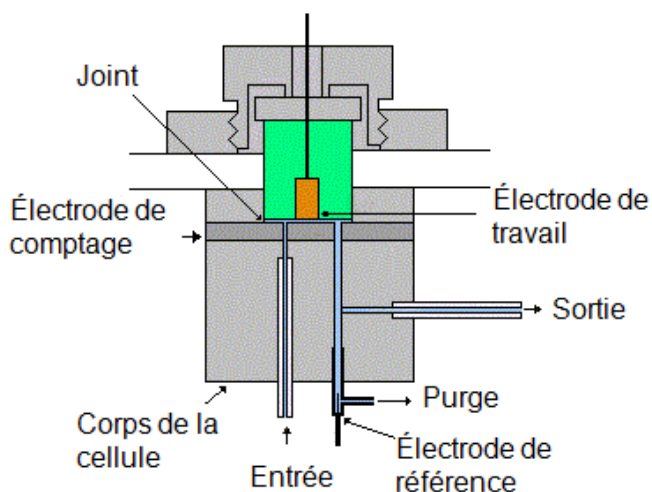


Figure 30 : Illustration de la cellule ampérométrique analytique 5041 (ESA).

2- Marquage immunohistochimique c-Fos

2-1 Protocole

Le gène *c-fos* codant la protéine du même nom (380 acides aminés) est un gène d'activation précoce, c'est-à-dire qu'il est activé rapidement et de façon transitoire en réponse à un stimulus cellulaire. Son activité, dans la plupart des tissus non stimulés est généralement faible mais celle-ci augmente fortement en présence de nombreux stimuli comme le stress, les facteurs de croissance ou bien une stimulation pharmacologique (cf **Figure 31**). Comme la protéine c-Fos est très fréquemment utilisée comme marqueur d'activité neuronale et est le reflet des adaptations post-synaptiques, cette réactivité neuronale post-synaptique à la cocaïne a donc été testée chez les animaux exposés en prénatal au MPH et chez les animaux témoins (Herrera et Robertson, 1996).



Figure 31 : Signalisation cellulaire conduisant à une activation rapide de la transcription de c-Fos (Adapté de Karin et al, 1995).

Les expérimentations ont été réalisées sur des animaux adultes (P70) exposés en prénatal au MPH ou au sérum physiologique (témoin) dans diverses conditions : (i) basale, (ii) cocaïne aiguë (1 mg/kg i.v.) et (iii) cocaïne répétée (15 mg/kg/jour i.p. pendant 4 jours + 1 mg/kg i.v.) (cf **Figure 32**). L'i.p. a été utilisée pour cette administration répétée afin de minimiser le stress des animaux. La dose de 15 mg/kg a déjà été montrée comme stimulant l'activité locomotrice des animaux (Lau et al, 1991). Les animaux ont ainsi été répartis en 6 groupes : animaux exposés en prénatal au MPH et recevant du sérum physiologique en i.v. (MPH/phy) (n=5) ; animaux exposés en prénatal au MPH et recevant une stimulation aiguë de cocaïne en i.v. (MPH/aiguë) (n=12) ; animaux exposés en prénatal au MPH et recevant une administration répétée de cocaïne en i.p. puis une stimulation en i.v. (MPH/répétée) (n=6) ; animaux témoins recevant du sérum physiologique en i.v. (phy/phy) (n=8) ; animaux témoins recevant une stimulation aiguë de cocaïne en i.v. (phy/aiguë) (n=8) et enfin un groupe avec des animaux témoins et recevant une administration répétée de cocaïne en i.p. puis une stimulation en i.v. (phy/répétée) (n=8).

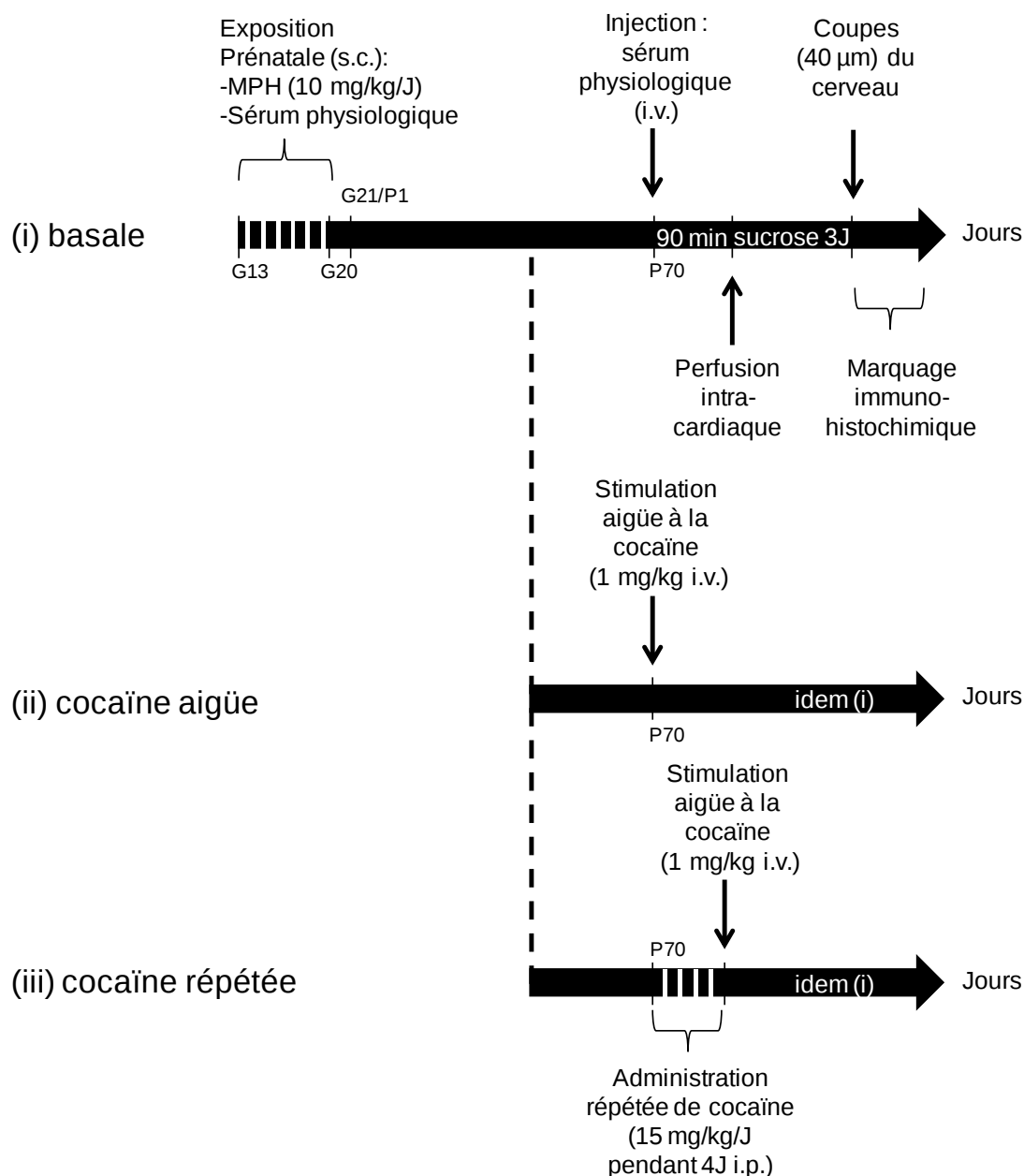


Figure 32 : Déroulement temporel du protocole d'immunohistochimie dans les diverses conditions : (i) basale, (ii) cocaïne aiguë ou (iii) cocaïne répétée.

2-2 Préparation des tissus et réalisation des coupes

Quatre vingt dix minutes après la stimulation pharmacologique à la cocaïne ou l'injection de sérum physiologique, l'animal a été profondément anesthésié avec 5% d'isoflurane puis maintenu à 2,5% durant la perfusion intra-cardiaque. Cette période

de 90 minutes va permettre une augmentation significative au niveau cérébral de l'expression de la protéine Fos (Kufahl et al, 2009). L'animal a été placé sur le dos et sa cage thoracique est découpée afin de pouvoir atteindre le cœur. Une canule de perfusion a été implantée par l'apex du ventricule gauche et l'oreillette droite est perforée pour ainsi perfuser l'ensemble du système circulatoire avec 200 ml de sérum physiologique frais hépariné (20 UI/ml). Les tissus ont ensuite été fixés par perfusion de 200 ml d'une solution de PBS (tampon phosphate salin) 0,1 M (pH 7,4)-PFA (paraformaldéhyde) 4% fraîche et filtrée. Le cerveau a ensuite été récupéré et disposé dans un bain de PB (tampon phosphate) 0,1 M (pH 7,4)-sucrose 30% durant 3 jours.

Des coupes de cerveau de 40 μ m ont par la suite été réalisées par l'intermédiaire d'un microtome refroidissant (Leica Microsystems, Ile Saint Martin Nanterre, France) et disposées dans un mélange cryoprotecteur composé de 50% de PBS 0,01 M, 30% d'éthylène glycol et 20% de glycérol. Les coupes de cerveau sont conservées au congélateur (-20°C).

2-3 Protocole de marquage

Après avoir été préalablement sélectionnées pour n'utiliser que des coupes entières, les coupes flottantes sont premièrement rincées trois fois dans du PBS 0,1 M durant 5 minutes. Après avoir bloqué les peroxydases endogènes pendant 20 minutes (solution de PB - H₂O₂ 3%) puis effectué 3 nouveaux rinçages dans du PB-Tween 0,1%, les coupes ont été incubées pendant 2 heures dans du PB (0,1 M)-Tween 0,1% et 3% de NGS (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Les tissus sont ensuite incubés pendant 24 heures avec un anticorps polyclonal anti-Fos fait chez le lapin (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) dilué au 1:10000 dans une solution contenant du PB 0,1 M, 1% de NGS et 0,1% de Tween. Puis, les coupes sont rincées dans du PB 0,1 M (3 fois 5 minutes) et à nouveau incubées durant 2 heures avec un anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de lapin (Vector Laboratories) dilué au 1:400 dans du PB - Tween 0,1% - NGS 1%. Après 3 nouveaux rinçages de 5 minutes dans du PB 0,1 M, les coupes ont été incubées

pendant 1 heure avec le complexe avidine-peroxydase biotinylé pour amplifier le signal du complexe antigène/anticorps primaire et secondaire. Les tissus sont rincés une fois dans du PB 0,1 M durant 5 minutes puis la révélation du marquage se fait par incubation des coupes pendant 40 secondes dans une solution de DAB. Pour terminer la réaction avec le DAB, les coupes sont rincées trois fois avec du PB 0,01 M. Toutes les coupes ont été montées sur lames silanisées et gélatinées, séchées puis déshydratées dans des bains à concentrations croissantes en alcool (50/70/96/96/100/100%) et xylène. Une dernière étape de séchage sous hotte est nécessaire puis les coupes sont enfin protégées par lamelle avec pour milieu de montage de l'Eukitt.

2-4 Comptage

La quantification du marquage immunohistochimique c-Fos a été réalisée sous microscope optique (Leica DMLB, Leica Microsystems, Allemagne) à un grossissement x10 et menée en aveugle en ce qui concerne les différentes conditions. L'image est transmise à un système informatique par une caméra vidéo 3CCD (Sony Corporation, Tokyo, Japon) et analysée à l'aide du logiciel Histolab (Microvision Instruments, Evry, France). Les localisations anatomiques de chaque région d'intérêt ont été déterminées en utilisant un atlas de cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1998). Plusieurs régions cérébrales impliquées dans les systèmes limbique et dopaminergique ont été analysées : les 2 régions du Nac (shell et core) ou striatum ventral, le striatum dorsal, le cortex cingulaire, le cortex prélimbique, le cortex infralimbique, le cortex orbitaire et le cortex insulaire (cf **Figure 33**). Pour chaque région d'intérêt, le comptage a été effectué dans une aire de 0,88 mm² et les différents comptages ont été moyennés afin d'obtenir un nombre moyen de cellules Fos positives par mm² pour une région donnée.

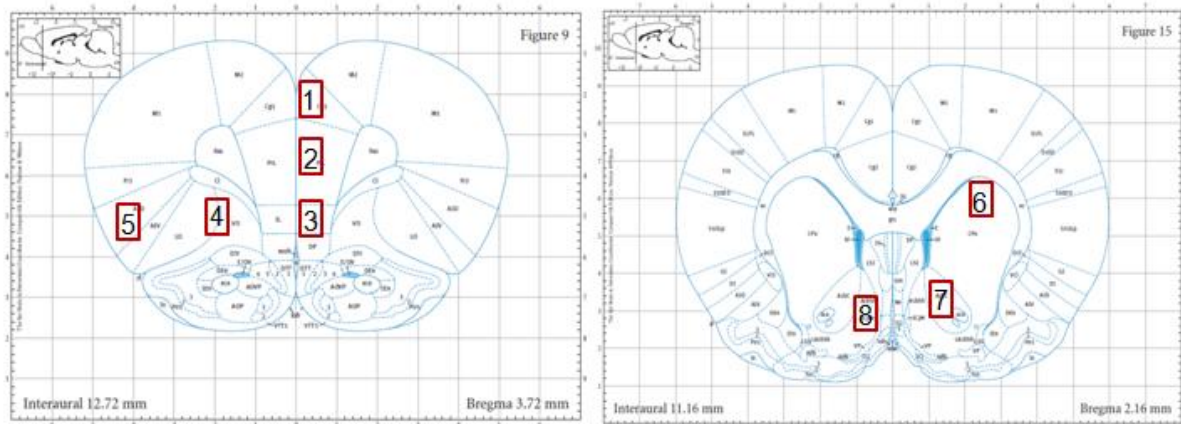


Figure 33 : Localisation des 8 aires de 0,88mm² au sein des régions cérébrales analysées (1 : cortex cingulaire ; 2 : cortex prélimbique ; 3 : cortex infralimbique ; 4 : cortex orbitaire ; 5 : cortex insulaire ; 6 : striatum dorsal ; 7 : core du Nac ; 8 : NacSh) pour la quantification du marqueur c-Fos, représentée sur des coupes d'atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson).

3- Imagerie scintigraphique : TEP

3-1 Protocole de l'imagerie TEP

L'étude de cette activité cérébrale a d'abord été menée en condition basale (voir chapitre II). Puisque le striatum est un territoire de projection dopaminergique, nous avons évalué la réactivité de cette région après une stimulation aiguë ou répétée à la cocaïne. Pour cette expérimentation, 7 animaux adultes témoins et 6 animaux exposés en prénatal au MPH ont été utilisés au total. Au total, les animaux ont donc 3 scans : un en condition basale (métabolisme basal) (voir chapitre II), et deux réalisés 10 minutes après une stimulation à la cocaïne (1 mg/kg, i.v.). Cette dose administrée en i.v. permet d'obtenir une activation psychomotrice chez le rat (Samaha et al, 2002). Le pic de concentration de DA est observé 10 minutes après une administration i.v. de cocaïne chez le rat (Hurd et Ungerstedt, 1989). Le premier scan après stimulation à la cocaïne (métabolisme stimulation aiguë) a été réalisé chez les animaux environ une semaine après le scan de la condition basale et le second scan (métabolisme stimulation répétée) a été réalisé après une administration répétée de cocaïne à l'animal éveillé dans sa cage durant 3 jours (15

mg/kg/J i.p.). Ici encore, l'i.p. a été utilisée pour cette administration répétée afin de minimiser le stress des animaux. La dose de 15 mg/kg a déjà été montrée comme stimulant l'activité locomotrice des animaux (Lau et al, 1991). Le second scan a donc été conduit après 5 jours consécutifs d'administration de cocaïne (cf **Figure 34**).

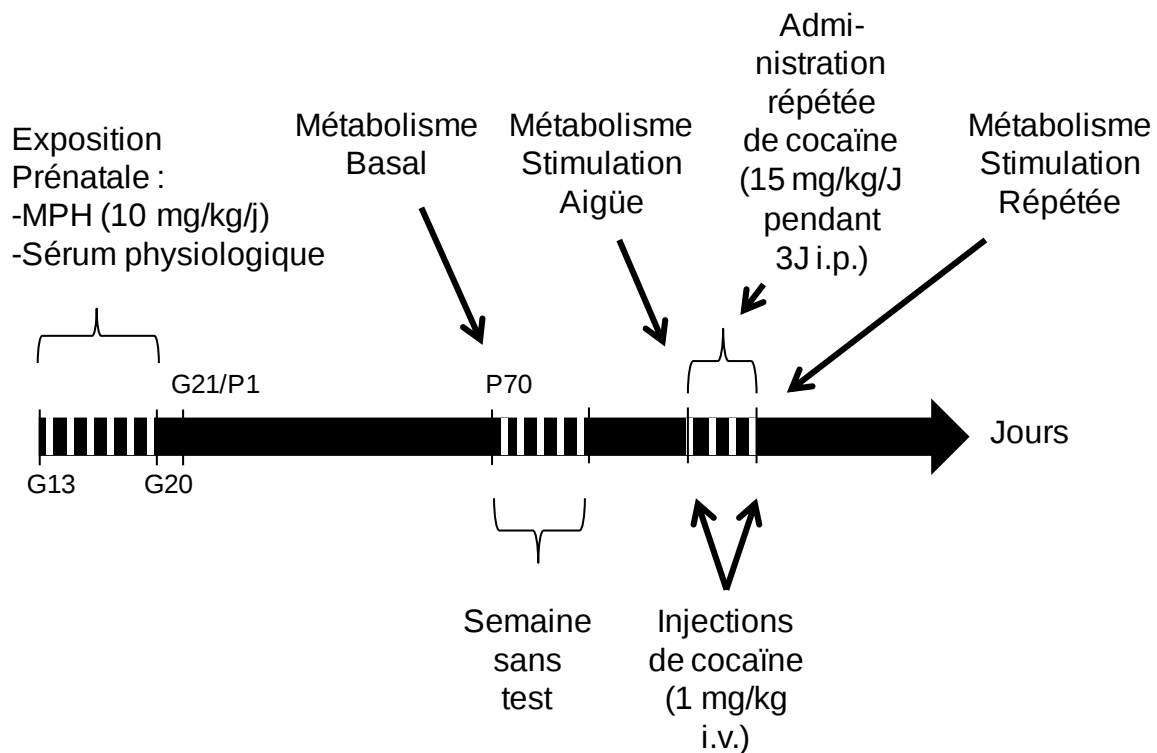


Figure 34 : Déroulé temporel de l'étude du métabolisme cérébral par imagerie TEP. Au total, 3 scans TEP ont été réalisés sur chaque animal : un scan en condition basale (métabolisme basal), un scan après une stimulation pharmacologique aigüe à la cocaïne (métabolisme stimulation aigüe) et un scan après une administration répétée de cocaïne (métabolisme stimulation répétée).

3-2 Analyse des images TEP

L'analyse de ces images TEP a été réalisée de la même façon que pour les scans en condition basale (voir chapitre II).

IV - Études des altérations comportementales

A/ Renforteur naturel

1- Test de préférence au sucre

Le principe de ce test est que les animaux et en particulier les rats ont une préférence accrue pour une solution sucrée par rapport à l'eau, cette préférence étant contrôlée par les systèmes dopaminergique et sérotoninergique (Sills et Crawley, 1996 ; Gray et Cooper, 1996 ; Hajnal et Norgren, 2001 ; Harro et al., 2001 ; Shimura et al., 2002). Ce test a été réalisé sur la progéniture mâle adulte (P70) exposée en prénatal au MPH (n=6) ou au sérum physiologique (témoin) (n=6).

Ce test de préférence au sucre se décompose en 2 phases, une phase d'habituation et une phase de challenge (cf **Figure 35**). Durant la phase d'habituation qui a pour but de familiariser les animaux au nouvel environnement, chaque rat est placé dans une cage individuelle pendant toute la durée de l'expérience. Durant 5 jours, chaque rat se voit proposer une solution d'eau sucrée (2%) dans deux pipettes de 10 mL pendant une heure en début de cycle (une heure après début de la phase d'activité) et en fin de cycle (une heure avant le début de la phase de repos).

La deuxième phase consiste en un choix (challenge) entre deux pipettes graduées de 10 mL, l'une contenant de l'eau et l'autre contenant une solution d'eau sucrée. Ces deux pipettes sont laissées pendant 30 min à la disposition de l'animal, une heure après le début et une heure avant la fin de la phase d'activité. À chaque session, la position des pipettes est alternée à gauche ou à droite d'un jour sur l'autre pour éliminer les biais liés à la position. Ceci a été réalisé pendant 3 jours, et à chaque fin d'expérience, les consommations d'eau et d'eau sucrée ont été mesurées afin de calculer le pourcentage de préférence au sucre correspondant au volume d'eau sucrée consommé divisé par le volume total de liquide consommé, le tout multiplié par 100. Le poids des animaux a été vérifié durant toute la durée de l'expérimentation.

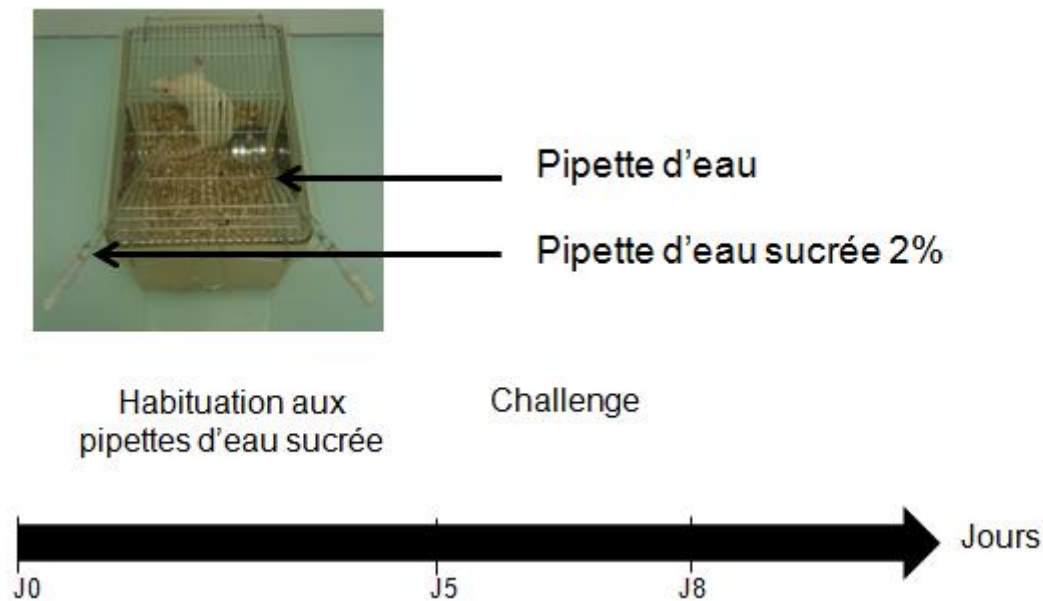


Figure 35 : Photographie illustrant le principe du test de préférence au sucre 2% ainsi que le dérours temporel du test.

2- Réponse opérante au sucre

Ce test de renforcement est un modèle expérimental de prise d'une récompense. Il est basé sur l'apprentissage par l'animal d'une réponse opérante, dans le cas présent l'appui sur un levier afin d'obtenir une récompense, le sucre. Le but de ce test est d'examiner si les animaux MPH acquièrent plus ou moins rapidement un comportement opérant ainsi que contrôler leur motivation pour obtenir du sucre par rapport aux animaux témoins.

2-1 Préparation préalable

Pour ce protocole, les animaux (7 exposés en prénatal au MPH et 7 au sérum physiologique) ont été hébergés un par cage une semaine avant le début des sessions. Durant les 7 jours avant le 1er jour d'expérimentation, les animaux ont été manipulés tous les jours et sont en restriction alimentaire (et ceci jusqu'à la fin du

protocole) : 15g/J/rat. De plus, durant les 4 derniers jours d'habituation et de restriction alimentaire, les animaux ont été mis en présence de 4 pastilles de sucre (45 mg par pastille) (TestDiet, Richmond, USA). Enfin, ils ont eu libre accès à l'eau.

2-2 Protocole

Toutes les sessions de "renforcement" au sucre ont lieu dans des chambres expérimentales Coulbourn (Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA, www.coulbourn.com) équipées de 2 leviers placés de chaque côté de la mangeoire (cf **Figure 36**). Cette dernière est connectée à un distributeur de pastilles de sucre. Les conditions d'expérimentation étaient telles que les bruits extérieurs ont été atténués. Durant les sessions, les chambres étaient éclairées. La chambre expérimentale est contrôlée par des interfaces et logiciel Graphic State (Coulbourn Instruments). Chaque chambre est donc équipée de deux leviers, l'un est actif car il est à l'origine de la délivrance de la pastille de sucre dans la mangeoire, l'autre est inactif et n'engendre aucune conséquence. Les appuis sur les deux leviers ont été comptabilisés. Lorsque l'animal appuie sur le levier actif, une pastille de sucre tombe dans la mangeoire, une lumière à l'intérieur de celle-ci s'allume pendant 5 secondes puis s'éteint. Une période de "time-out" de 10 secondes va suivre, temps pendant lequel l'activité de l'animal n'est pas enregistrée et la chambre est plongée dans le noir.

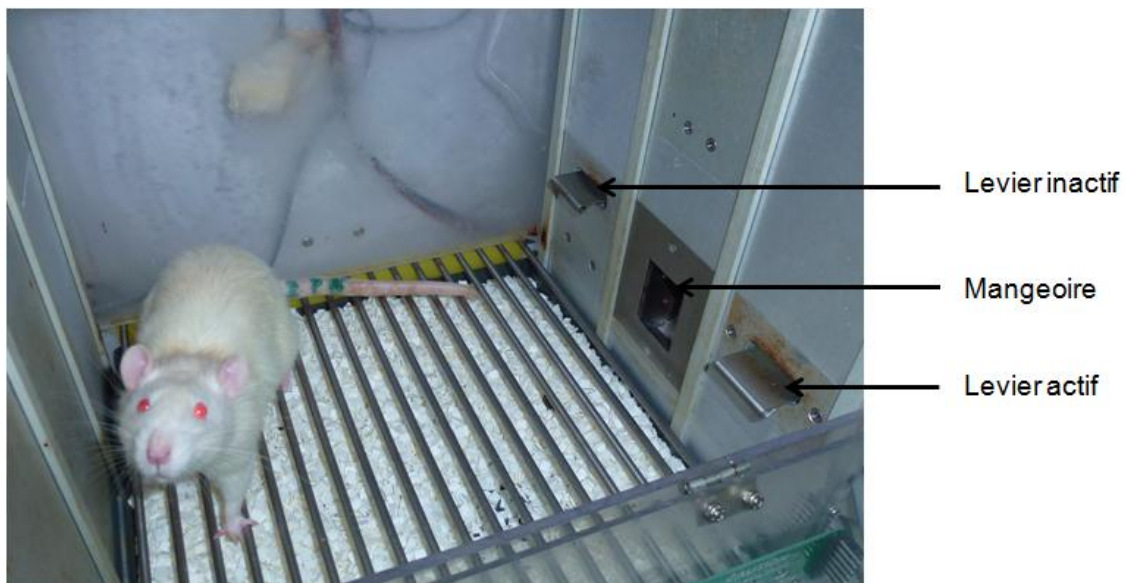


Figure 36 : Photographie illustrant la chambre expérimentale utilisée pour la réponse opérante au sucre.

2-2.1 Ratio fixe (FR1)

Les rats ont effectué 10 sessions de FR1, une fois par jour pendant 30 minutes. Dans ce protocole de FR1, chaque pression du levier actif, en dehors de la période réfractaire de 5 secondes et la période de "time-out" de 10 secondes, induit la distribution d'une pastille de sucre. Aucune limite concernant le nombre de pastilles de sucre que le rat reçoit pendant une session de 30 minutes n'a été instaurée.

2-2.2 Ratio progressif (PR)

Trois sessions de tests de PR ont également été réalisées pour ce renforcement. La motivation de l'animal pour obtenir sa récompense est mesurée avec le même principe que pour le PR de l'auto-administration (AA) de cocaïne (voir chapitre IV B/1-2.3). Pour ce protocole de PR, le nombre d'appuis sur le levier actif requis pour obtenir une pastille de sucre supplémentaire croît selon l'équation

exponentielle (Richardson et Roberts, 1996) suivante, où n représente le rang du nombre de pastilles de sucre successifs :

$$NP(n) = [5 \times e^{0,2n}] - 5$$

Concrètement, lorsque l'animal effectue un appui sur le levier actif, il reçoit une pastille de sucre. Il devra ensuite appuyer deux fois pour obtenir une pastille supplémentaire, puis 4 fois, 6, 9, 12, 15, 20... (cf **Figure 37**). La motivation de l'animal pour l'obtention de sa récompense va être mesurée par ce test de PR. Ces tests de PR durent 180 minutes. Si l'animal n'appuie pas suffisamment sur le levier actif afin d'obtenir une pastille supplémentaire en 30 minutes, le test s'arrête. Il n'y a pas de modification de dose (pas de modification de la distribution du nombre de pastilles). Le breakpoint ou point de rupture, c'est-à-dire le nombre de réponses opérantes ou nombre d'appuis pour obtenir une $n^{\text{ième}}$ pastille de sucre, va être mis en évidence (autrement dit, cela représente l'effort maximal que l'animal va faire pour obtenir la pastille de sucre).

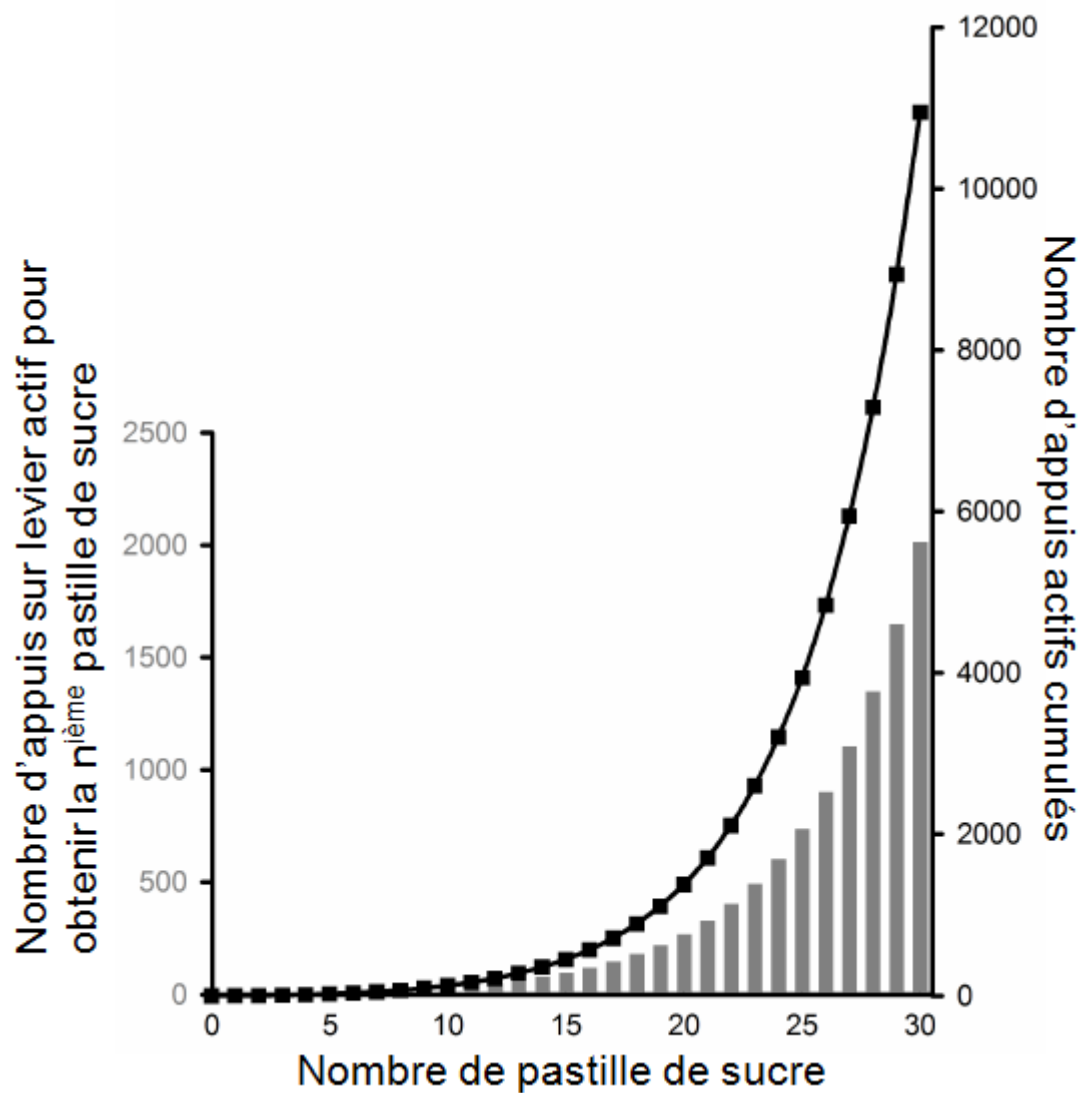


Figure 37 : Protocole de Ratio Progressif. Les histogrammes (axe de gauche) représentent le nombre d'appuis sur le levier actif que l'animal doit effectuer pour obtenir une pastille de sucre supplémentaire (d'après la relation de Richardson et Roberts, 1996 ; $NP(n) = [5 \times e^{0,2n}] - 5$). La courbe noire (axe de droite) renseigne sur le nombre cumulé d'appuis actifs (ou *last ratio completed*) que le rat doit réaliser sur l'ensemble de la session pour obtenir le nombre de pastilles de sucre n .

B/ Renforteur synthétique

1- Auto-administration de cocaïne

L'AA de cocaïne est un modèle expérimental de prise de drogue. Il est basé sur l'apprentissage par l'animal d'une réponse opérante, dans le cas présent l'insertion du museau dans un orifice afin d'obtenir une récompense, la cocaïne. Celle-ci va être administrée par voie intraveineuse par le biais d'un cathéter implanté dans la veine jugulaire droite. Cette technique est considérée comme l'un des modèles expérimentaux le plus valide pour étudier la consommation de drogue (Deroche et al, 1999 ; Koob et Le Moal, 2005). Plus l'animal va réaliser le conditionnement opérant, plus il sera récompensé. On va étudier si les animaux exposés en prénatal au MPH acquièrent plus ou moins rapidement un comportement d'AA par rapport aux témoins. Le principe de ce test est le même que le précédent concernant la réponse opérante au sucre sauf que la récompense naturelle est remplacée par une récompense synthétique, la cocaïne.

1-1 Chirurgie

Les 16 animaux (8 exposés en prénatal au MPH et 8 au sérum physiologique) utilisés pour cette expérimentation ont été tout d'abord anesthésiés par une injection i.p. d'hydrate de chloral (400 mg/kg ; Fluka, Sigma-Aldrich, Allemagne). Une incision au niveau de la clavicule de l'animal a été réalisée afin de dégager la veine jugulaire droite de l'animal. Le cathéter d'une longueur de 12 cm est incéré dans la veine sur une longueur de 4 cm. Une fois fixé à la veine, une deuxième incision a été réalisée au niveau du haut du dos et l'extrémité du cathéter est ressortie à ce niveau. Une nouvelle incision au niveau du dos a été réalisée, juste en-dessous de la sortie du cathéter, afin de mettre en place un système de pas de vis qui va permettre de relier l'animal au dispositif expérimental. La semaine suivant la chirurgie est sans expérimentation pour permettre aux animaux de récupérer. Les animaux ont été

placés par cage individuelle pour limiter la perte du cathéter. Pendant 4 jours et ceci tous les jours, ces animaux ont reçu 0,1 ml de gentamicine (40 mg/ml ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), 0,1 ml d'héparine (9 mg/15 ml ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) et enfin 0,1 ml de solution physiologique. Ils ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau.

1-2 Protocole d'auto-administration de cocaïne

Toutes les sessions d'AA ont lieu dans des chambres expérimentales Imetronic (Imetronic, Pessac, France, www.imetronic.com) équipées de 2 orifices, placés sur les murs opposés où le rat peut introduire son museau (cf **Figure 38**). Les conditions d'expérimentation étaient telles que les bruits extérieurs étaient atténués. De plus, durant les sessions, les chambres étaient éclairées. La chambre ainsi que la pompe (Razel, Saint-Albans, Vermont, USA) portant une seringue de 10 ml sont contrôlées par des interfaces et logiciel Imetronic. Chaque chambre est équipée de deux orifices, l'un est actif car il est à l'origine de la délivrance de la drogue, l'autre est inactif. Lorsqu'un rat introduit son museau dans un des orifices, on dit qu'il fait un "nose-poke" (NP). Les NP dans les deux orifices ont été enregistrés. Les NP dans l'orifice inactif n'ont pas d'effet. Les NP dans l'orifice actif induisent l'injection de 50 µl sur une durée de 2 secondes d'une solution de cocaïne. Un stimulus lumineux situé au dessus de l'orifice actif clignote de façon contingente avec l'injection de la drogue durant 5 secondes, c'est la période réfractaire : tout NP est comptabilisé mais un NP actif n'induit pas d'injection supplémentaire de drogue. Une période de "time-out" de 5 secondes débute ensuite. Durant cette période de "time-out", la chambre est totalement dans le noir et aucun NP n'est comptabilisé.

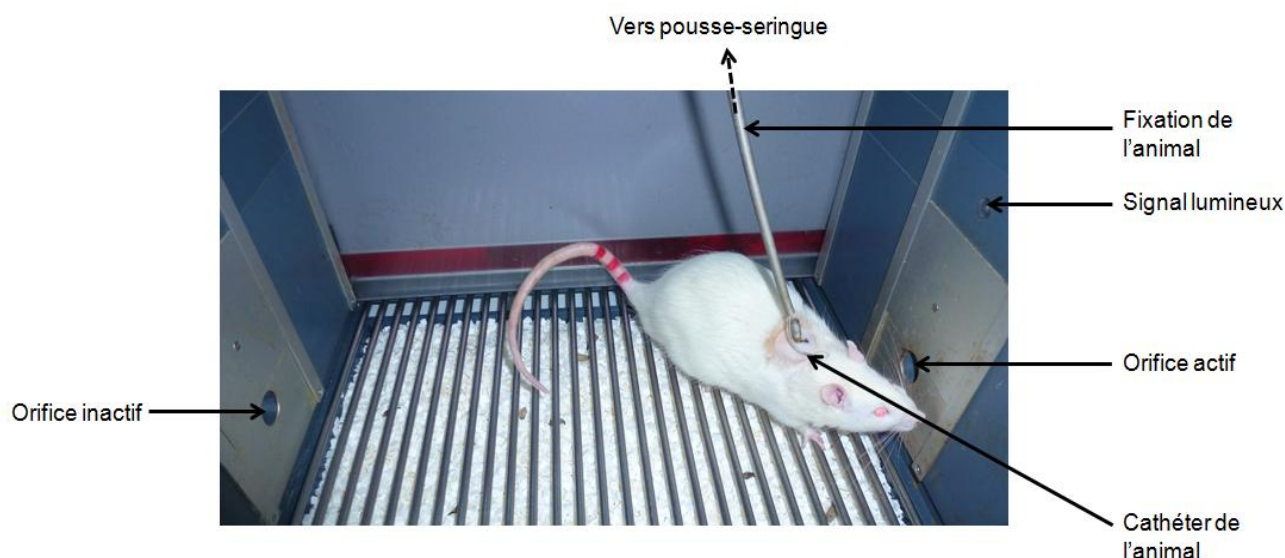


Figure 38 : Photographie illustrant la chambre expérimentale utilisée pour l'auto-administration de cocaïne.

1-2.1 Ratio fixe : FR1

Avant chaque début d'expérimentation, 0,1 ml de solution physiologique a été injectée par le cathéter de l'animal. Les rats ont effectué 10 sessions de FR1, une fois par jour pendant 2 heures. Dans ce protocole de FR1, chaque NP actif, en dehors de la période réfractaire de 5 secondes et de la période de "time-out" de 5 secondes, induit une injection i.v. de cocaïne (50 µl). La dose de cocaïne injectée était de 0,3 mg/kg. Cette dose est couramment utilisée dans les protocoles d'AA chez le rat (Corrigall et Coen, 1991 ; Stairs et al, 2010). Aucune limite concernant le nombre d'injections pendant une session de 2 heures n'a été instaurée. À la fin de la session, 0,1 ml d'héparine puis 0,1 ml de solution physiologique ont été injectés à l'animal par le cathéter.

1-2.2 Ratio Fixe : FR5

Deux sessions de FR5 ont été menées à la suite du FR1. Dans ce protocole, l'animal doit réaliser 5 NP actif pour induire une injection de cocaïne (0,3 mg/kg). L'animal doit donc produire plus de travail pour avoir sa récompense. La même dose injectée que dans le FR1 a été utilisée. Dans ce FR5, les mêmes caractéristiques que pour le protocole FR1 sont retrouvées.

1-2.3 PR

Dans le protocole de PR, le nombre de NP requis pour obtenir une injection supplémentaire à la précédente croît également selon l'équation exponentielle de Richardson et Roberts. Là encore, si l'animal effectue un NP actif, il reçoit une dose de cocaïne. Il devra ensuite appuyer deux fois pour obtenir l'injection supplémentaire, puis 4 fois, 6, 9, 12, 15, 20... Ces tests de PR durent 4 heures mais ils peuvent se terminer avant si l'animal n'effectue pas le nombre de NP requis pour l'obtention d'une injection supplémentaire de cocaïne pendant un laps de temps de 60 minutes. Plusieurs sessions ont été réalisées avec des volumes différents de cocaïne (0,3 mg/kg) administrés par injection. Deux sessions avec un volume équivalent au FR1 (50 µl) ont premièrement été réalisées puis deux sessions avec un volume double (100 µl), deux sessions avec un volume quatre fois supérieur au premier (200 µl) et enfin une session avec un volume deux fois inférieur (25 µl). Ici encore, au début puis à la fin du test PR, le cathéter de l'animal a été vérifié avec 0,1 ml de solution physiologique et/ou 0,1 ml d'héparine. Le breakpoint ou point de rupture, c'est-à-dire le nombre de réponses opérantes pour obtenir une $n^{\text{ième}}$ injection, va être mis en évidence (autrement dit, cela représente l'effort maximal que l'animal va faire pour obtenir l'injection).

2- Test de l'activité locomotrice

La cocaïne à concentrations modérées est un psychostimulant qui augmente l'activité locomotrice chez les rongeurs (Uzbay et al, 2000). Le but du test, outre de visualiser l'activité locomotrice dans des conditions basales des animaux exposés en prénatal au MPH, était de voir si cette exposition pouvait modifier les effets locomoteurs de la cocaïne chez le rat adulte.

Durant toute la période de ce test d'activité locomotrice, les animaux étaient hébergés en cage individuelle selon un cycle inversé alternant 12 heures d'obscurité et 12 heures de luminosité (8h-20h/20h-8h). Pour cela, une semaine d'habituation à ce nouveau cycle a été nécessaire. Le test a été réalisé durant la phase d'obscurité (quasi-totale, seule une lumière rouge était allumée dans la pièce et orientée vers le plafond), c'est-à-dire durant la phase d'éveil des animaux. En effet, il avait été démontré que ces animaux nocturnes avaient une plus grande activité dans le noir plutôt qu'en plein jour (Kallman et Isaac, 1975 ; Gaytan et al, 1996). L'activité locomotrice des rats a été mesurée dans une enceinte circulaire appelée "cyclotron" ayant un diamètre de 69 centimètres (cf **Figure 39**). L'animal peut se déplacer à sa convenance dans cette arène sans pouvoir en sortir ni voir l'environnement extérieur. Une caméra digitale reliée à un dispositif informatique et au logiciel EthoVision XT 7.0 (Noldus, Paris, France) ont permis de détecter et d'enregistrer les mouvements de l'animal dans l'enceinte et de mesurer la distance parcourue par l'animal pendant un laps de temps choisi de 10 minutes.

Une première phase d'habituation au dispositif durant 3 jours consécutifs a été réalisée en disposant les animaux 10 minutes dans le cyclotron. Après une journée de repos, sans expérimentation, les animaux sont disposés dans l'enceinte, sans injection, afin de mesurer leur activité locomotrice en condition basale. Les animaux ont eu de nouveau 2 jours de repos puis durant 5 jours, ils ont reçu 15 mg/kg/jour de cocaïne (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) en i.p. tous les jours ou une dose équivalente de sérum physiologique pour les animaux témoins. Cette dose de cocaïne a été déjà utilisée dans des études de sensibilisation des effets locomoteurs de la cocaïne (Lau et al, 1991 ; Mattson et al, 2008). Il est à noter que les doses de cocaïne (15 mg/kg) et de sérum physiologique (1 ml/kg) ont été administrées en i.p.

10 minutes avant le début de la mesure de l'activité locomotrice afin d'être dans le pic de concentration maximale de la cocaïne au niveau cérébral qui serait détecté entre 5 à 15 minutes après ce type d'injection (Brian et al., 1999). Une mesure de l'activité locomotrice des animaux a été réalisée à deux temps différents : à la suite de la première injection (test aigu) et suite à la cinquième injection (test répété) afin de tester la réactivité à la cocaïne de ces animaux (cf **Figure 39**).

Les animaux ont donc été répartis en 4 groupes : animaux exposés en prénatal au MPH et recevant du sérum physiologique durant ce test (MPH/phy) ; animaux exposés en prénatal au MPH et recevant 15 mg/kg/jour de cocaïne durant ce test (MPH/coc) ; animaux témoins et recevant du sérum physiologique durant ce test (phy/phy) et animaux témoins et recevant 15 mg/kg/jour de cocaïne durant ce test (phy/coc).

Les animaux ont été classés comme sensibles à la cocaïne lorsque l'injection aiguë de cocaïne a augmenté leur activité locomotrice d'au moins 2SD de la valeur basale moyenne. Au total, ce test d'activité locomotrice a nécessité 13 rats Wistar mâles adultes du groupe témoin et 11 rats MPH.

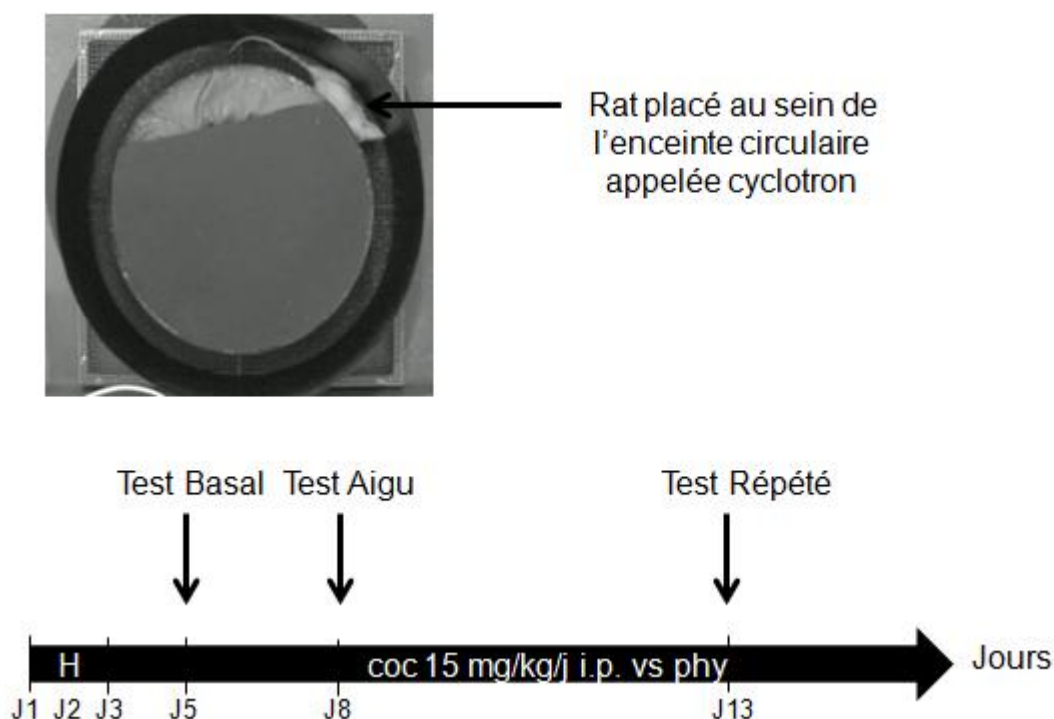


Figure 39 : Déroulement temporel du test et photographie illustrant le cyclotron dans lequel la mesure de l'activité locomotrice de l'animal est réalisée (H : habituation ; coc : injection de cocaïne).

V - Analyses statistiques

Le résultat de l'effet de l'exposition au MPH sur le poids des rates gestantes ainsi que sur le nombre de petits par groupe, le nombre de mâles et femelles par portée et l'évolution du poids des animaux est exprimé en moyenne $\pm$ la déviation standard (SD). Les différences entre le groupe MPH et groupe témoin ont été évaluées à l'aide d'un test *t* de Student.

En ce qui concerne l'imagerie TEP, les résultats quantitatifs sont exprimés en moyenne $\pm$ la déviation standard (SD). Les différences en terme de fixation de ^{18}F FDG entre le groupe MPH et groupe témoin ont été évaluées à l'aide d'un test *t* bilatéral de Student. Une analyse voxel par voxel est ainsi réalisée et les différences sont considérées statistiquement différentes pour un seuil de $P < 0,01$ et sont représentées sur des cartes de z-scores.

Pour le marquage TH, les différences de moyennes de cellules par unité de surface dans la SNc et la VTA ainsi que les différences de moyenne en terme d'absorbance au sein du striatum et du Nac entre les groupes MPH et témoin ont été comparées à l'aide d'un test *t* de Student.

L'analyse statistique des concentrations de DA a été réalisée à l'aide d'un test *t* de Student pour les comparaisons basales entre les groupes MPH et témoin. De plus, une analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs avec un ajustement de Bonferroni a été utilisée pour comparer les deux pourcentages d'augmentation de la DA basale après stimulation.

Une ANOVA à deux facteurs pour évaluer les effets du traitement prénatal et des injections de cocaïne et de leurs interactions sur le nombre de cellules c-Fos ainsi qu'une ANOVA à un facteur avec un ajustement de Dunnett pour les effets intra-groupes des injections de cocaïne ont été utilisées.

Le traitement statistique du test de préférence au sucre a été réalisé à l'aide d'un test *t* de Student pour la comparaison entre le groupe MPH et le groupe témoin.

L'analyse statistique de la réponse opérante au sucre a été effectuée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'une analyse de Dunnett afin de

comparer le nombre de pastilles de sucre pour chaque session et d'une ANOVA à 2 facteurs pour comparer les moyennes de breakpoint pour les groupes MPH et témoin.

En ce qui concerne l'AA de cocaïne, un test t de Student pour comparer le nombre d'injections pour chaque session et un test t de Student pour comparer les moyennes de breakpoint pour les groupes MPH et témoin ont été utilisés.

Enfin, l'analyse statistique du test de l'activité locomotrice a été réalisée à l'aide d'un test t de Student pour les comparaisons entre les groupes MPH et témoin pour l'activité basale ainsi que d'une ANOVA à deux facteurs suivie d'un ajustement de Bonferroni pour les comparaisons et les interactions entre les deux groupes en plus d'une ANOVA avec un ajustement de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples entre les conditions.

RÉSULTATS

I - Effets de l'exposition prénatale au MPH sur les paramètres physiologiques

A/ Sur les rates gestantes

L'exposition des femelles gestantes au MPH entraîne une baisse statistiquement significative de la prise de poids au cours de la période d'exposition (G13-G20) de $82,4 \pm 14,0$ à $67,1 \pm 12,6$ grammes ($P < 0,0001$, test t de Student) pour l'ensemble des animaux au cours des différentes sessions d'exposition comme le montre la **Figure 40**.

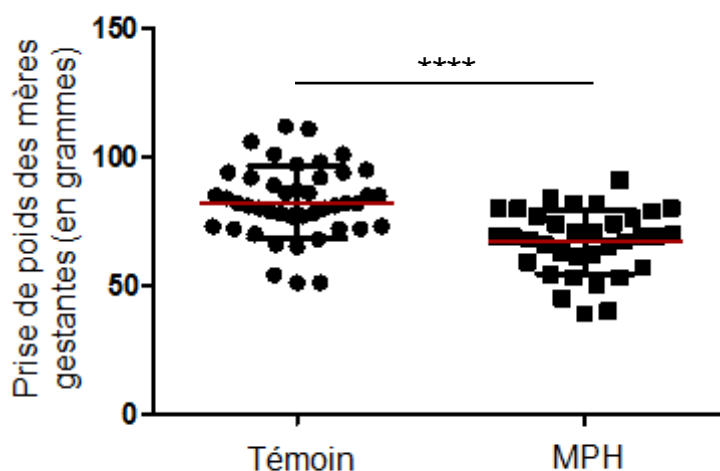


Figure 40 : Effet de l'exposition prénatale au MPH sur la prise de poids des mères gestantes entre le début de l'exposition à G13 et la fin de l'exposition à G20 (témoin : $n=45$; MPH : $n=35$) (**** $P < 0,0001$, test t de Student).

B/ Sur la portée

L'exposition prénatale au MPH ne semble pas avoir d'effet sur la progéniture. En effet, dans les 8 sessions d'exposition, le nombre de petits par portée à terme ne diffère pas entre le groupe témoin ($10,8 \pm 2,0$) et le groupe MPH ($11,3 \pm 2,2$) ($P > 0,05$, test t de Student) (cf **Figure 41**).

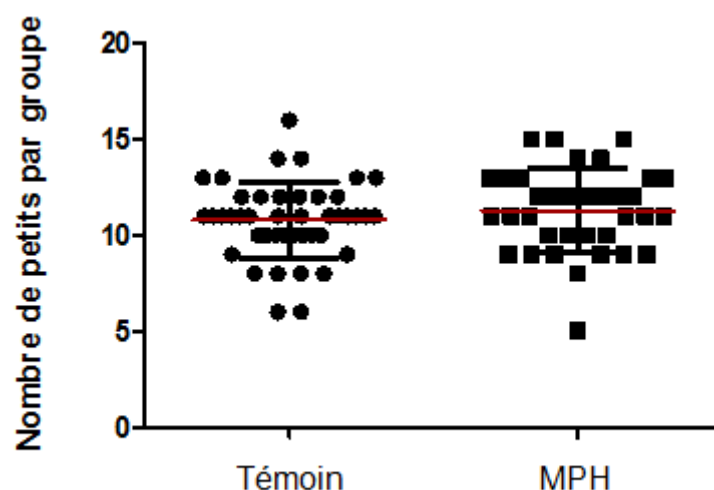


Figure 41 : Effet de l'exposition prénatale au MPH sur le nombre de petits par groupe (témoin : n=43 ; MPH : n=35) ($P>0,05$, test t de Student).

De plus, le nombre de mâles ($5,5\pm2,2$ vs $5,4\pm1,7$) ($P>0,05$, test t de Student) ainsi que le nombre de femelles ($5,3\pm1,7$ vs $5,9\pm2,1$) ($P>0,05$, test t de Student) par portée ne diffèrent pas entre le groupe témoin et le groupe MPH comme le présente la Figure 42.

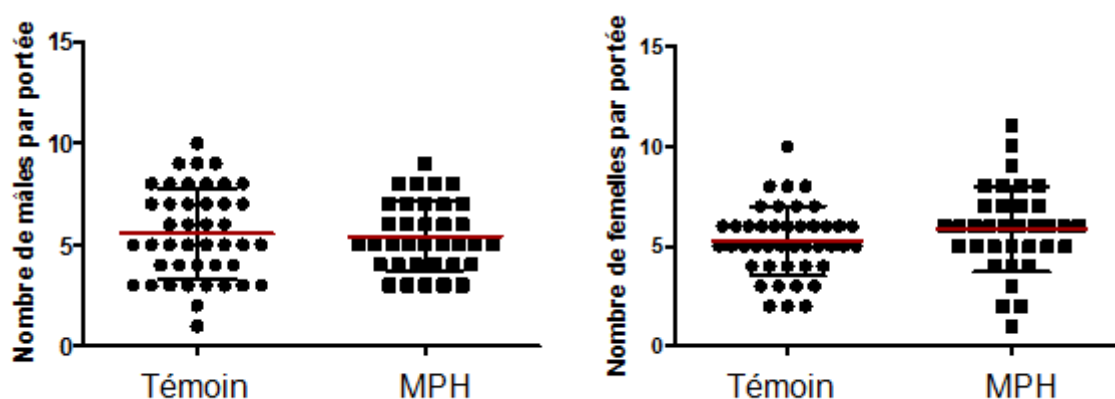


Figure 42 : Effet de l'exposition prénatale au MPH sur le nombre de mâles et de femelles par portée (témoin : n=43 ; MPH : n=35) ($p>0,05$, test t de Student).

Chez les mâles des groupes témoin et MPH, l'évolution de leur poids se fait de manière similaire du sevrage à l'âge adulte. Aucune différence n'est retrouvée entre ces 2 groupes d'animaux à P28, 32, 34, 36, 41, 43, 48, 55 et 62 ($P>0,05$, test t de Student) (cf **Tableau 7**).

	P28	P32	P34	P36	P41
<i>Témoin</i>	85,3±15,7	124,0±8,0	135,9±7,6	150,3±5,1	183,5±14,6
<i>MPH</i>	93,3±8,2	124,2±12,4	140,4±10,3	149,8±10,6	176,5±19,8
	P43	P48	P55	P62	
<i>Témoin</i>	204,3±16,3	238,3±18,0	289,7±23,0	337,3±25,0	
<i>MPH</i>	199,9±19,1	232,6±27,7	284,4±26,1	330,5±37,3	

Tableau 7 : Évolution du poids des nouveau-nés du sevrage à l'âge adulte en fonction de l'exposition prénatale : sérum physiologique (témoin) ou MPH. Les valeurs représentent la moyenne du poids des animaux en grammes $\pm$ l'écart-type en fonction de l'âge. Pour chaque âge, un test t de Student est réalisé entre les deux groupes et aucune différence significative n'est retrouvée ($P>0,05$).

C/ Sur la progéniture adulte

Le poids moyen de l'ensemble des animaux utilisés pour chacune des expérimentations et dans les différentes conditions ne diffère pas significativement entre les groupes témoin et MPH ($P>0,05$, test t de Student). Ces poids sont présentés dans le **Tableau 8**.

		Poids (en grammes)	
Expérimentation		Témoin	MPH
TEP	Basale	434,1±28,4	523±97,5
	Aigue	519,7±60,8	540,6±75,8
	Répétée	502,1±47,6	517,0±81,9
TH/c-fos	Basale	441,3±71,9	464,0±46,5
	Aigue	479,6±52,2	470,8±51,8
	Répétée	478,7±22,1	430,1±44,1
DA		422,1±25,6	445,4±53,4
Préférence au sucre		327,1±37,1	316,8±29,4
Réponse opérante au sucre		443,5±27,0	430,8±40,9
AA de cocaïne		449,3±36,1	465,7±62,4
Activité locomotrice		429,9±47,3	422,9±31,1

Tableau 8 : Poids moyen des animaux en grammes $\pm$ l'écart-type en fonction de l'exposition prénatale : sérum physiologique (témoin) ou MPH, utilisés dans les diverses expérimentations. Des tests t de Student ont été réalisés entre les deux groupes pour chaque expérimentation et pour chaque condition et aucune différence significative n'a été retrouvée ($P>0,05$).

II - Imagerie scintigraphique : TEP

Les résultats de l'étude du métabolisme cérébral basal par imagerie TEP sont présentés sur des cartes de z-scores (**Figure 43**). Celles-ci comparent les animaux exposés en prénatal au MPH aux animaux témoins et montrent des différences significatives au moins à $P < 0,01$ en termes de fixation de ^{18}F FDG entre les 2 groupes. On constate des différences dans de nombreuses régions mais pas dans l'ensemble du cerveau des animaux. Outre les disparités et hétérogénéités d'accumulation au sein du cortex sensorimoteur, on observe des augmentations de métabolisme dans une zone regroupant l'aire tegmentale ventrale (VTA) et la substance noire (SN), régions contenant les neurones dopaminergiques (+4,1 SD et +3,4 SD; respectivement à gauche et à droite) et dans l'hypothalamus latéral gauche (LHyp) (+3,9 SD). Des diminutions dans la fixation de ^{18}F FDG ont été retrouvées dans le cortex frontal droit (-3,9 SD et -3,4 SD, dans le cortex prélimbique/cingulaire ainsi que dans le cortex insulaire, respectivement), au niveau du striatum centro-dorsal (-3,4 SD à gauche et -5,6 SD à droite), dans le NacSh droit (-4,2 SD) et dans une région contenant le thalamus médio-dorsal, centro-latéral et l'habénula latérale droite (-4,0 SD). Aucune modification de fixation de ^{18}F FDG n'est détectée dans d'autres régions corticales ou sous corticales (cf **Figure 43**).

Ainsi, l'imagerie TEP au ^{18}F FDG révèle des anomalies métaboliques focales dans les cerveaux de rats adultes exposés en prénatal au MPH.

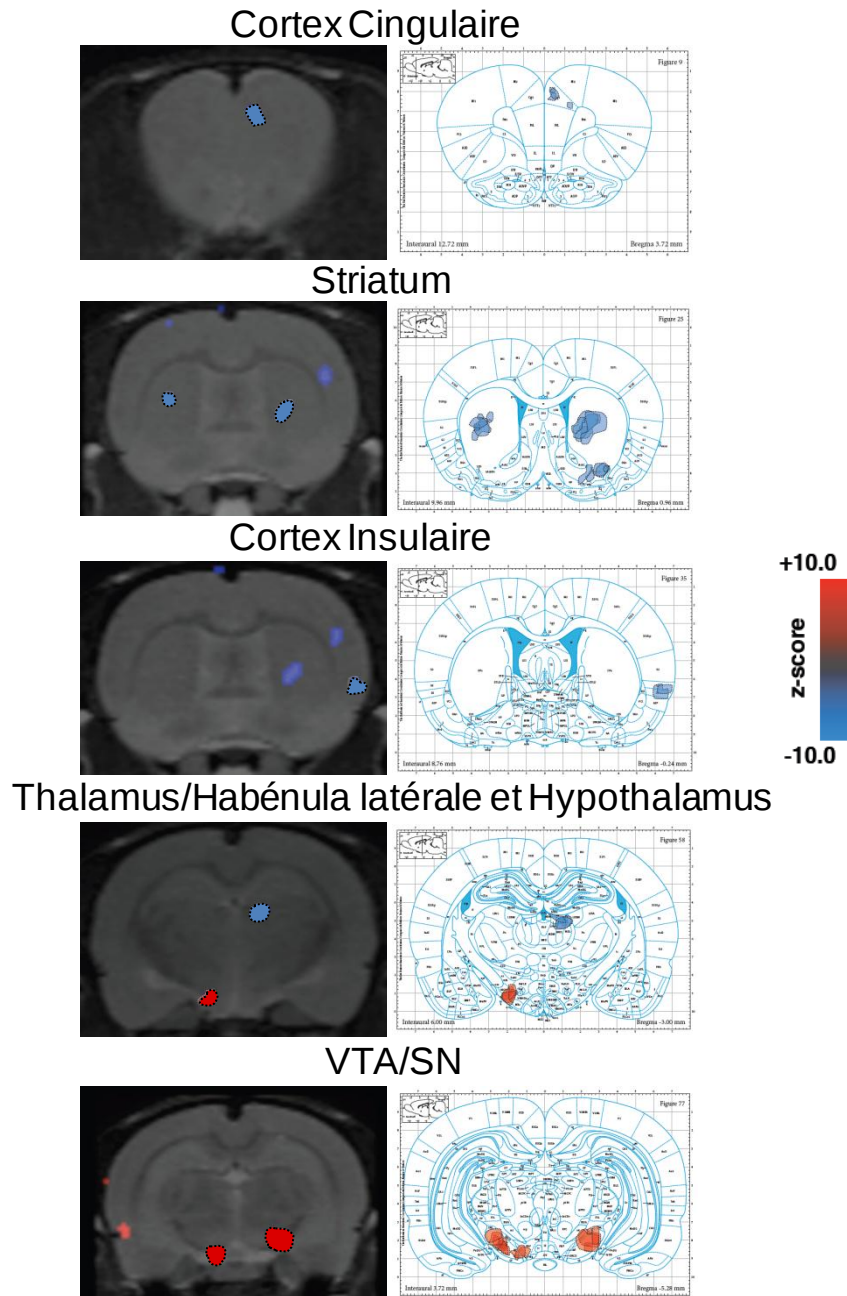


Figure 43 : Représentation des régions cérébrales affichant des changements significatifs dans l'accumulation du ^{18}F FDG chez les rats adultes exposés en prénatal au MPH vs sérum physiologique en condition basale (n=6 et 7, respectivement). Pour chaque région, les images des cartes de z-scores générées sont fusionnées avec un template IRM et sont présentées à gauche. Un résumé de l'ensemble des modifications de l'accumulation de ^{18}F FDG observé est représenté à droite sur des coupes coronales d'atlas de Paxinos et Watson (augmentation en rouge, diminution en bleu, $P < 0,01$, test t de Student).

III - Études des altérations dopaminergiques sur le plan structural et sur le plan fonctionnel à l'état basal et après stimulation

Nous avons cherché à savoir si l'augmentation du métabolisme détectée précédemment au niveau des zones des corps cellulaires dopaminergiques se traduisait par une modification du nombre de neurones dopaminergiques au sein de cette région VTA/SN et au niveau striatal.

A/ Sur un plan structural : immunomarquage de la tyrosine hydroxylase

L'immunomarquage de la TH a été réalisé au niveau des corps cellulaires des neurones dopaminergiques au sein de la SNc et de la VTA. L'exposition prénatale au MPH induit chez le rat adulte une augmentation significative de l'expression de la TH dans la SNc ($367,6 \pm 109,0$ vs $236,9 \pm 44,0$ cellules TH positives/mm², respectivement chez les MPH et les témoins ; $P < 0,05$, test *t* de Student) et seulement une tendance dans la VTA ($298,7 \pm 81,9$ vs $199,6 \pm 56,4$ cellules TH positives/mm², respectivement chez les MPH et les témoins ; $P = 0,07$, test *t* de Student) (cf **Figure 44**).

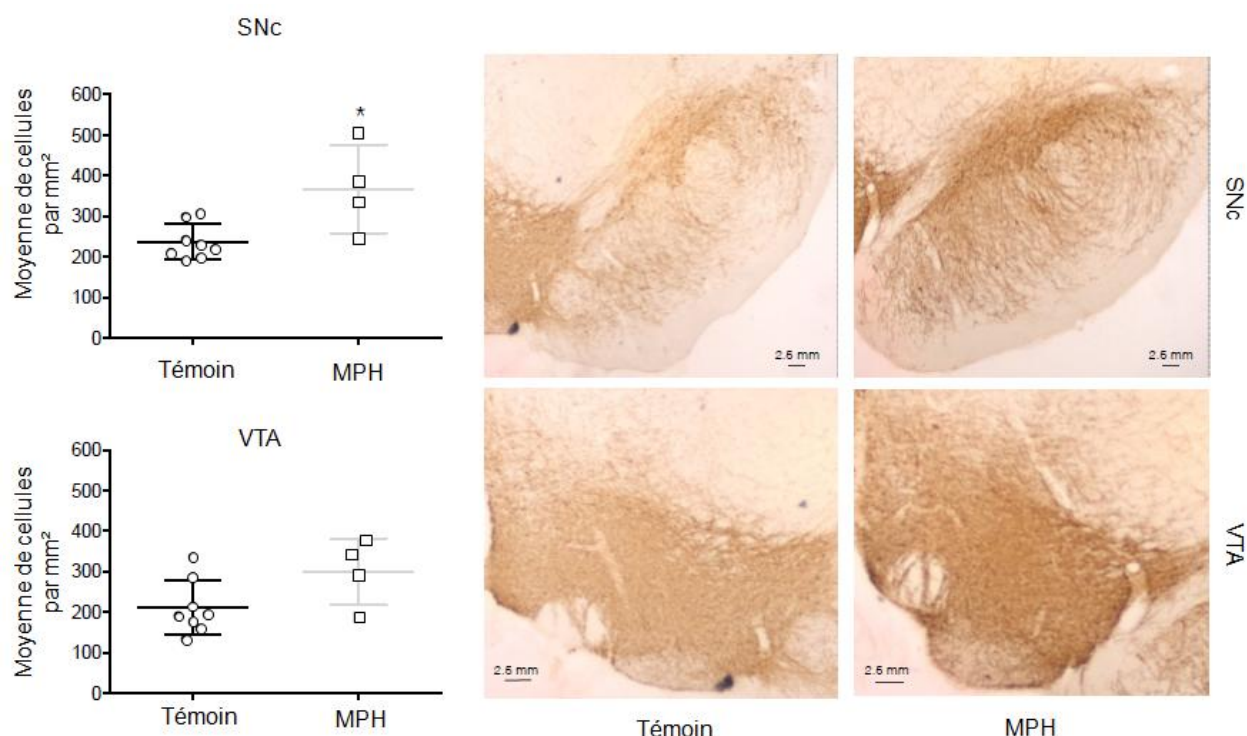


Figure 44 : Quantification de l'immunomarquage de la TH dans la SNc (en haut) et dans la VTA (en bas) chez les rats adultes exposés en prénatal au MPH (n=8) ou au sérum physiologique (témoin) (n=4). Pour chaque région, les graphiques présentant les moyennes de cellules par mm² sont présentés sur la gauche. Des photographies d'immunomarquages TH pour chaque région et pour chaque groupe sont présentées sur la droite. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de tests *t* de Student afin de comparer les moyennes de cellules par mm² entre les 2 groupes (*P<0,05 pour la SNc et P=0,07 pour la VTA).

L'immunomarquage de la TH a également été réalisé au niveau des aires de projections dopaminergiques au sein du striatum et du Nac. Des mesures de l'absorbance par mm² au sein du striatum DM et du striatum DL ainsi que dans le core du Nac et le NacSh ont été effectuées. L'exposition prénatale au MPH induit chez le rat adulte une augmentation significative de l'absorbance par mm² du marquage des fibres TH dans le striatum DM (117,4±8,2 vs 102,3±10,3, respectivement chez les MPH et chez les témoins ; P<0,05, test *t* de Student), dans le striatum DL (124,8±12,6 vs 100,3±12,1, respectivement chez les MPH et chez les témoins ; P<0,01, test *t* de Student), dans le core du Nac (142,3±12,5 vs 106,3±13,0, respectivement chez les MPH et chez les témoins ; P<0,001, test *t* de Student) et

dans le NacSh ($201,6 \pm 28,7$ vs $127,5 \pm 21,3$, respectivement chez les MPH et chez les témoins ; $P < 0,001$, test t de Student) (cf **Figure 45**).

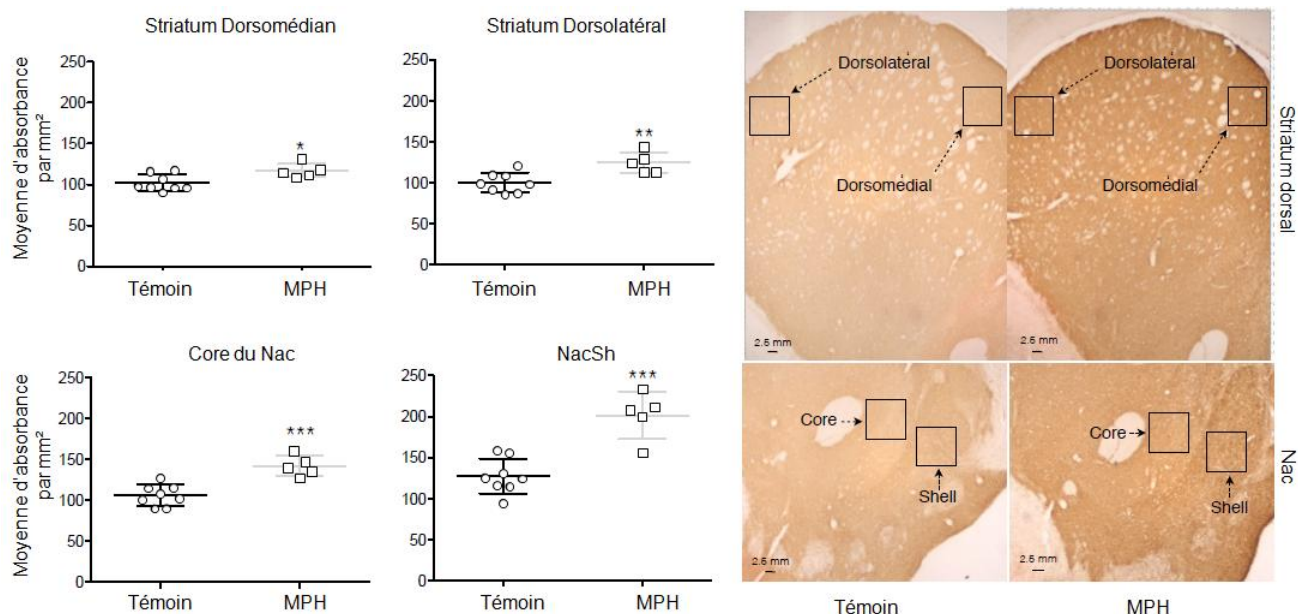


Figure 45 : Quantification de l'immunomarquage de la TH dans le striatum dorsomédian et dorsolatéral (en haut) et dans le core et le shell du Nac (en bas) chez les rats adultes exposés en prénatal au MPH (n=8) ou au sérum physiologique (témoin) (n=5). Pour chaque région, les moyennes d'absorbance par mm² sont présentées sur la gauche. Des photographies d'immunomarquages TH pour chaque région et pour chaque groupe sont présentées sur la droite. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de tests t de Student afin de comparer les moyennes d'absorbance par mm² entre les 2 groupes (* $P < 0,05$ pour le striatum dorsomédian, ** $P < 0,01$ pour le striatum dorsolatéral, et * $P < 0,001$ pour le core du Nac et le NacSh).**

Ainsi, l'exposition prénatale au MPH induit une élévation à long terme de l'expression de la TH dans les régions contenant les neurones dopaminergiques et au niveau du striatum.

B/ Sur un plan fonctionnel

1- Quantification de la DA - Microdialyse intracérébrale en double implantation chez le rat anesthésié

Nous avons cherché à savoir si l'augmentation du métabolisme détectée précédemment au niveau des zones des corps cellulaires dopaminergiques se traduisait également par une modification de la quantité de DA basale au niveau des zones de projections comme le striatum ventral (NacSh), ainsi qu'au niveau cortical (cortex cingulaire).

1-1 Vérification de l'implantation des sondes

La **Figure 46** présente l'ensemble des implantations correctes des sondes de microdialyse au niveau du cortex cingulaire et au niveau du NacSh dans le groupe témoin (n=7) et le groupe MPH (n=7) après vérification histologique sur coupes congelées.

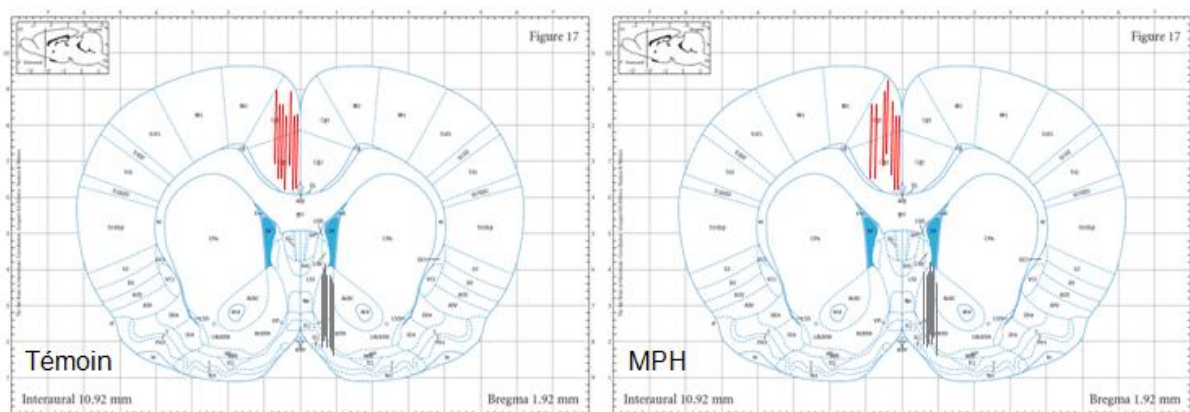


Figure 46 : Coupes d'atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson) illustrant l'ensemble des implantations des deux sondes de microdialyse chez les animaux témoins (à gauche) et chez les animaux MPH (à droite) au niveau du cortex cingulaire (en rouge) et du NacSh en gris).

1-2 NacSh

Comme le présente la **Figure 47** et la **Figure 49, a**, l'exposition prénatale au MPH induit chez le rat adulte une augmentation de la quantité de DA extracellulaire dans le NacSh en condition basale ($16,0 \pm 3,3$ vs $5,3 \pm 2,0$ nM, respectivement chez les MPH et chez les témoins ; $P < 0,001$, test t de Student). La stimulation pharmacologique à la cocaïne (2 mg/kg, i.v.) (cf **Figure 48**) induit une augmentation de la DA chez les animaux témoins et chez les animaux MPH ($P < 0,0001$, ANOVA) avec le même niveau maximal atteint chez les deux groupes. En raison des données observées dans les conditions basales, le rapport signal/bruit du taux de DA est alors réduit chez les animaux MPH par rapport aux animaux témoins (pic d'augmentation de la concentration de DA : 294 ± 129 vs 698 ± 243 % du taux de DA basal, $P < 0,001$, ANOVA, **Figure 49, b**).

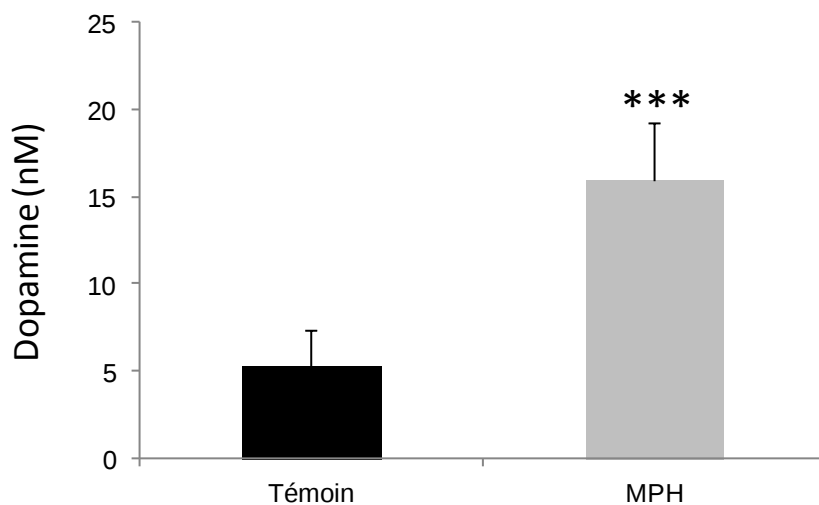


Figure 47 : Quantification de la DA extracellulaire dans le NacSh chez des rats adultes mâles anesthésiés exposés en prénatal au MPH vs sérum physiologique (témoin) dans des conditions basales. La moyenne $\pm$ l'écart-type (SD) des concentrations de DA dans les conditions basales sont représentées pour les animaux témoins (n=7) et MPH (n=7). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test paramétrique t de Student (** $P < 0,001$).

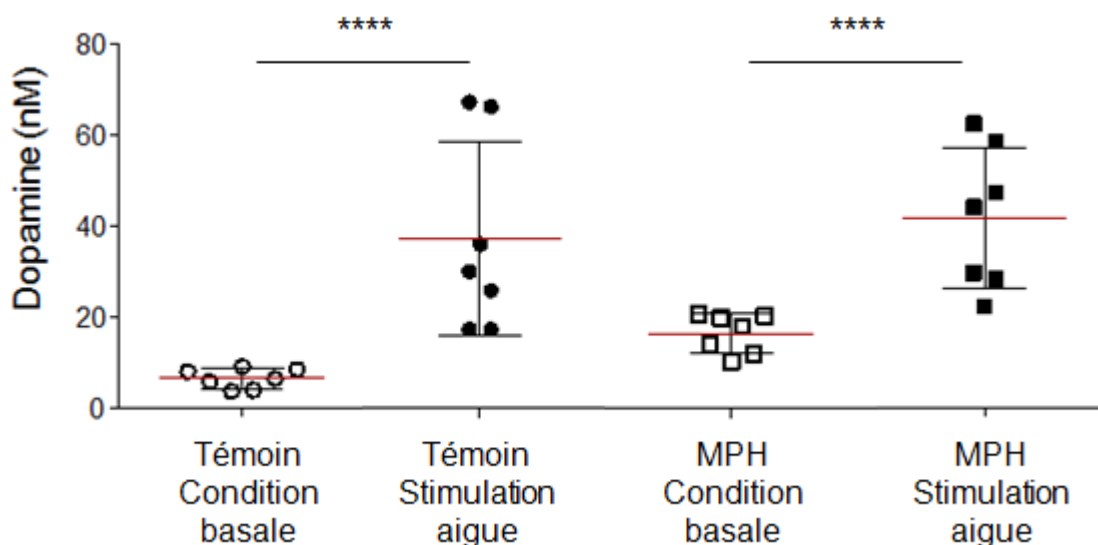


Figure 48 : Quantification de la DA extracellulaire dans le NacSh chez chacun des rats adultes mâles exposés en prénatal au MPH vs sérum physiologique (témoin) après stimulation aiguë à la cocaïne (2 mg/kg, i.v.). La moyenne $\pm$ l'écart-type (SD) des pics de concentration de DA avant et après la stimulation à la cocaïne sont représentés pour les animaux témoins (n=7) et MPH (n=7). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) pour les tests intra-groupe (**** $P < 0,0001$).

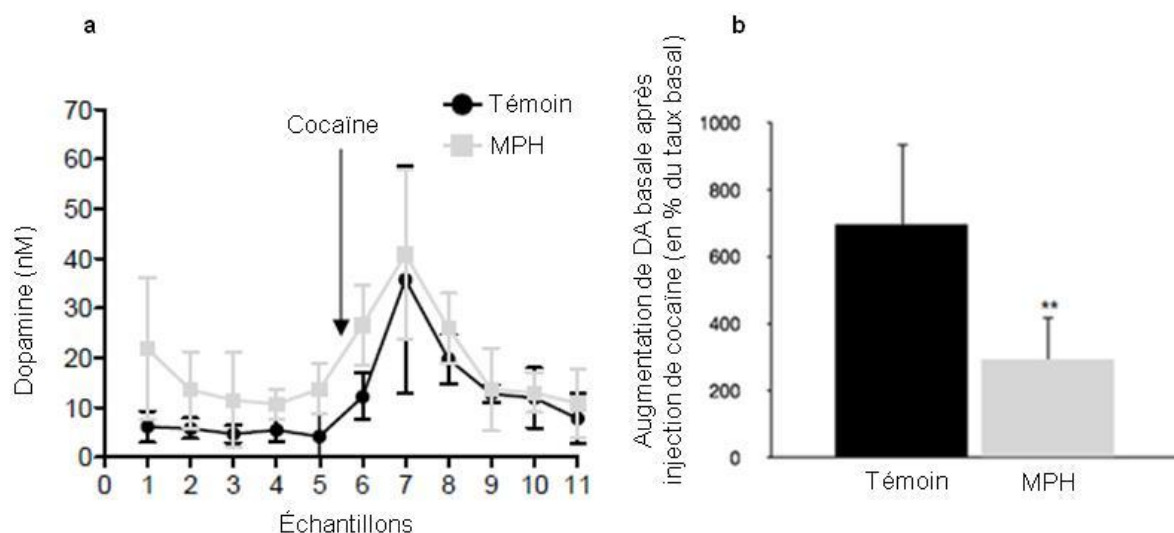


Figure 49 : (a) Décours temporel de la quantité de DA (moyenne $\pm$ écart-type, SD) chez les animaux témoins (n=7) et chez les animaux MPH (n=7) en condition basale (échantillons 1 à 5) et après injection de cocaïne (2 mg/kg, i.v.) (à partir de l'échantillon 6). (b) Représentation du pic d'augmentation de la DA après l'injection de cocaïne chez les animaux témoins (n=7) et chez les animaux MPH (n=7) (en pourcentage du taux de DA basal). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) avec un ajustement de Bonferroni (** $P < 0,001$).

L'exposition prénatale au MPH augmente à long terme la quantité de DA basale et provoque une diminution du rapport signal/bruit de la libération induite de DA dans le NacSh.

1-3 Cortex cingulaire

Dans cette région qui est également une zone de projection dopaminergique, nous n'avons pas constaté de différence en terme de quantité de DA basale entre les animaux témoins et les animaux MPH ($3,9 \pm 2,8$ vs $7,4 \pm 7,9$ nM respectivement, $P > 0,05$, test t de Student). La stimulation pharmacologique à la cocaïne (2 mg/kg, i.v.) n'induit pas d'augmentation de la DA chez les animaux témoins ni chez les animaux MPH ($13,5 \pm 20,6$ vs $17,8 \pm 26,4$ respectivement, $P > 0,05$, ANOVA) (cf **Figure 50**).

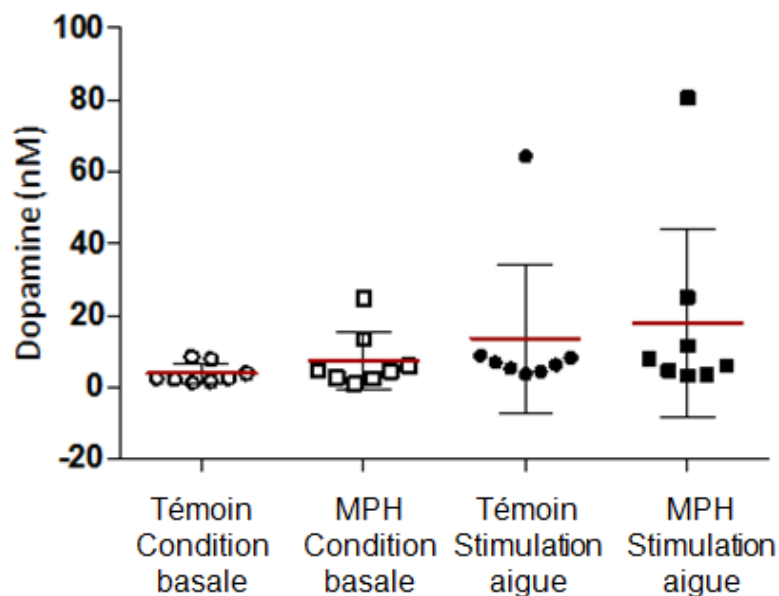


Figure 50 : Quantification de la DA extracellulaire dans le cortex cingulaire chez des rats adultes mâles anesthésiés exposés en prénatal au MPH ou au sérum physiologique (témoin) dans des conditions basales ou après une stimulation aiguë i.v. de cocaïne (2 mg/kg). La moyenne $\pm$ l'écart-type (SD) des concentrations de DA dans les conditions basales ainsi que le pic de concentration de DA après la stimulation à la cocaïne sont représentés pour les animaux témoins (n=7) et MPH (n=7). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test t de Student pour les comparaisons entre témoin et MPH ($P > 0,05$) et à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) pour les tests intra-groupes entre les conditions basales et après stimulation ($P > 0,05$).

L'exposition prénatale au MPH ne semble pas avoir de conséquence sur la quantité de DA au niveau du cortex cingulaire.

2- Marquage immunohistochimique c-Fos

Suite aux modifications de DA extracellulaire que nous avons mis en évidence, nous avons quantifié le nombre de cellules immunoréactives c-Fos dans des régions corticales et striatales impliquées dans les circuits dopaminergiques. Des effets significatifs de l'exposition prénatale au MPH et des stimulations pharmacologiques à la cocaïne ont été observés uniquement dans le cortex cingulaire et dans le NacSh (cf **Tableau 9** et **Figure 51**), avec une interaction entre ces deux traitements. Dans les autres régions corticales étudiées ainsi que dans le striatum dorsal et la partie core du Nac, aucune modification en terme d'expression de c-Fos n'a été observée. En effet, des augmentations significatives du nombre de cellules c-Fos positives dans les conditions basales chez les animaux MPH ont été montrées (NacSh : 196 ± 28 vs 110 ± 41 cellules c-Fos positives, $P < 0,0001$, ANOVA ; Cortex Cingulaire : 401 ± 59 vs 176 ± 50 cellules c-Fos positives, $P < 0,0001$, ANOVA). Il est intéressant de noter que les stimulations aiguës et répétées de cocaïne ont induit une augmentation significative de l'expression de c-Fos dans ces deux régions chez les animaux témoins (NacSh : 163 ± 34 et 170 ± 65 vs 110 ± 41 cellules c-Fos positives pour les conditions aiguë et répétée, $P < 0,05$, ANOVA ; Cortex Cingulaire : 248 ± 80 et 307 ± 136 vs 176 ± 50 cellules c-Fos positives pour les conditions aiguë, $P < 0,05$ et répétée, $P < 0,01$, ANOVA).

	Témoïn			MPH		
	Condition Basale (n=8)	Stimulation Aigüe (n=8)	Stimulation répétée (n=8)	Condition Basale (n=5)	Stimulation Aigüe (n=12)	Stimulation répétée (n=6)
Cortex Cingulaire	176±50	248±80†	307±136††	401±59****	361±109	414±99
Cortex Prélimbique	288±61	323±40	245±87	328±76	264±72	295±57
Cortex Infralimbique	227±47	270±50	236±101	281±49	236±54	245±39
Cortex Orbitaire	246±50	257±68	225±88	284±66	266±63	295±72
Cortex Insulaire	196±44	219±39	169±73	230±31	173±37	223±49
Striatum Dorsal	71±19	71±28	80±58	98±22	87±38	86±35
Noyau Accumbens : Core	90±29	89±40	87±48	101±23	102±35	101±36
Noyau Accumbens : Shell	110±41	163±34†	170±65†	196±28****	202±51	197±20

Tableau 9 : Quantification du nombre de cellules c-Fos immunoréactives dans diverses régions cérébrales chez des rats adultes mâles exposés en prénatal au sérum physiologique (témoïn) ou au MPH dans les conditions basales, après une stimulation aigüe (1 mg/kg, i.v.) ou après une stimulation répétée (15 mg/kg/J i.p. pendant 4 J et 1 mg/kg, i.v.) à la cocaïne. Les moyennes ± écart-type (SD) du nombre de cellules par mm² sont présentées dans les diverses conditions (n=8 pour les témoins pour chaque condition, n=5 pour les animaux MPH dans la condition basale, n=12 pour les animaux MPH après stimulation aigüe et n=6 pour les animaux MPH après stimulation répétée). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec un ajustement de Bonferroni (**P<0,0001) pour évaluer les effets du traitement prénatal et des injections de cocaïne et de leurs interactions ainsi que d'une ANOVA à un facteur avec un ajustement de Dunnett pour les effets intra-groupes des injections de cocaïne vs la condition basale (†P<0,05 ; ††P<0,01).**

La quantification de l'expression de c-Fos dans les deux régions limbiques dans lesquelles nous avons observé des modifications à la suite des différents traitements est détaillée dans la **Figure 51**.

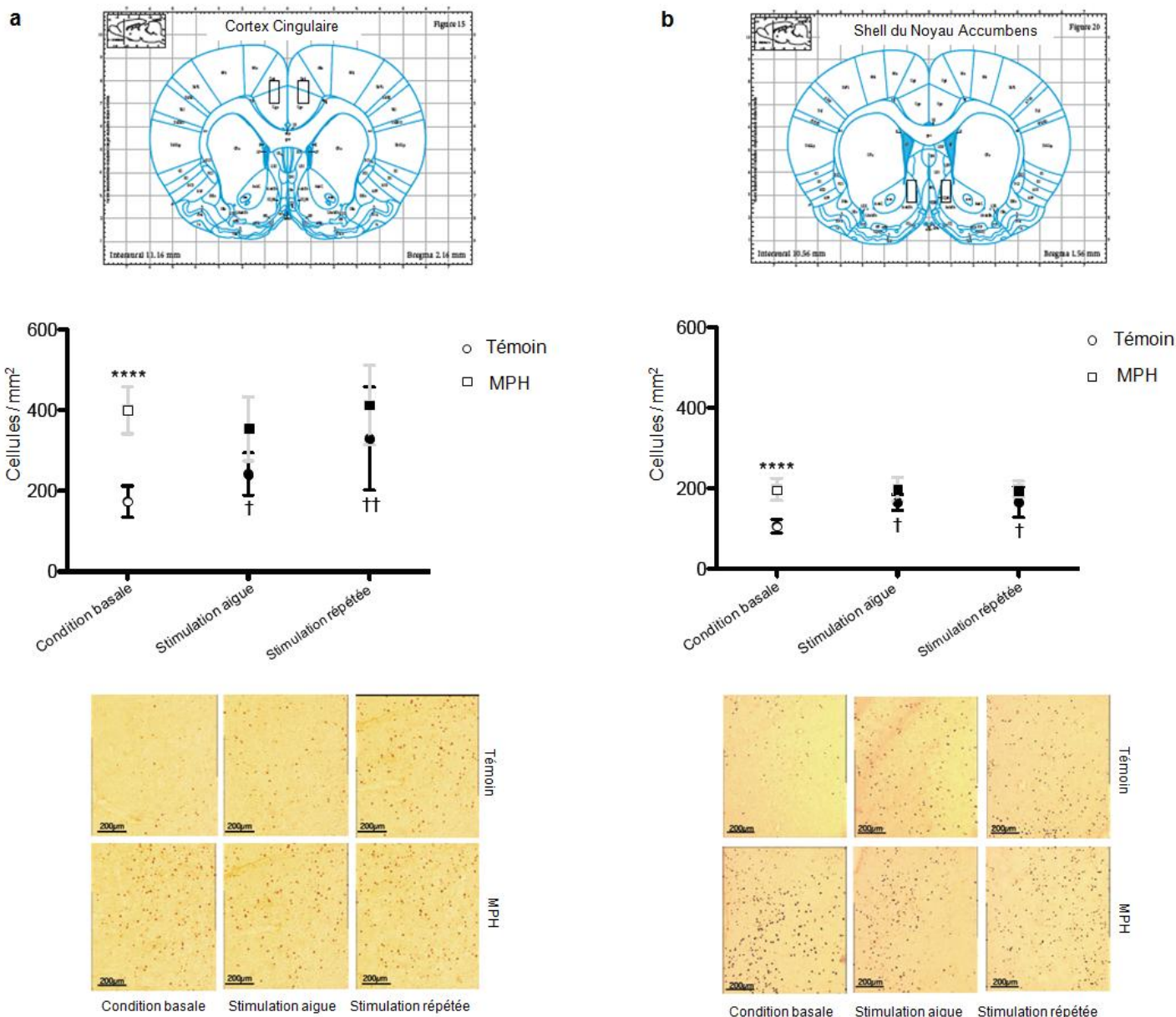


Figure 51 : Quantification de l'expression de c-Fos dans (a) le cortex cingulaire et dans (b) le NacSh chez des rats adultes mâles exposés en prénatal au sérum physiologique (témoin) ou au MPH, dans trois conditions : condition basale, après une stimulation aigüe à la cocaïne (1 mg/kg, i.v.) et après une stimulation répétée à la cocaïne (15 mg/kg/J, i.p. pendant 4J et 1 mg/kg, i.v.). De haut en bas : Coupes d'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson avec les régions d'intérêts (0,88 mm²) ; Nombre de cellules c-Fos immunopositives par mm² dans chaque région d'intérêt chez les animaux témoins ou MPH, dans les conditions basales ou après une stimulation aigüe ou répétée à la cocaïne (données individuelles et moyenne $\pm$ écart-type (SD) ; n=8 pour les témoins pour chaque condition, n=5 pour les animaux MPH dans la condition basale, n=12 pour les animaux MPH après stimulation aigüe et n=6 pour les animaux MPH après stimulation répétée) ; Exemples d'immunomarquage c-Fos dans les deux régions d'intérêt. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec un ajustement de Bonferroni (****P<0,0001) pour évaluer les effets du traitement prénatal et des injections de cocaïne et de leurs interactions ainsi que d'une ANOVA à un facteur avec un ajustement de Dunnett pour les effets intra-groupes des injections de cocaïne vs la condition basale (†P<0,05 ; ††P<0,01).

L'exposition prénatale au MPH induit donc uniquement des modifications à long terme de l'expression du facteur de transcription c-Fos dans le NacSh et le cortex cingulaire. L'augmentation de l'expression de c-Fos en condition basale mettrait en avant une modification des voies de transduction du signal en réponse à l'élévation de la quantité de DA extracellulaire.

3- Imagerie scintigraphique : TEP

Nous avons utilisé la stimulation pharmacologique aiguë ou répétée à la cocaïne afin d'évaluer la réactivité des zones de projection dopaminergique. Comme le striatum reçoit de nombreuses afférences dopaminergiques, nous avons focalisé notre étude sur cette région. Chez les animaux témoins, une stimulation aiguë à la cocaïne induit une diminution de l'accumulation en ^{18}F FDG au niveau du striatum dorsal (-6,9 SD à droite et -8,9 SD à gauche) et une augmentation de cette accumulation au niveau du striatum ventral (+10,3 SD) en unilatéral, à gauche, par rapport à la condition basale ($P < 0,01$, test t de Student). La répétée n'a par contre aucune conséquence sur le métabolisme cérébral. En ce qui concerne les animaux exposés au MPH, un pattern de réponse totalement différent par rapport aux animaux témoins est obtenu, à savoir une augmentation du métabolisme au niveau du striatum dorsal après une stimulation aiguë (+16,0 SD à droite et +11,6 SD à gauche), par rapport à la condition basale, qui se maintient après les stimulations répétées (+12,1 SD et +6,9 SD, respectivement à droite et gauche) ($P < 0,01$, test t de Student). Une diminution du métabolisme est également retrouvée au niveau du striatum latéral (-12,7 SD à droite et -10,4 SD à gauche) (cf **Figure 52**).

Ainsi, la réactivité du striatum des animaux exposés en prénatal au MPH à une stimulation par la cocaïne paraît altérée.

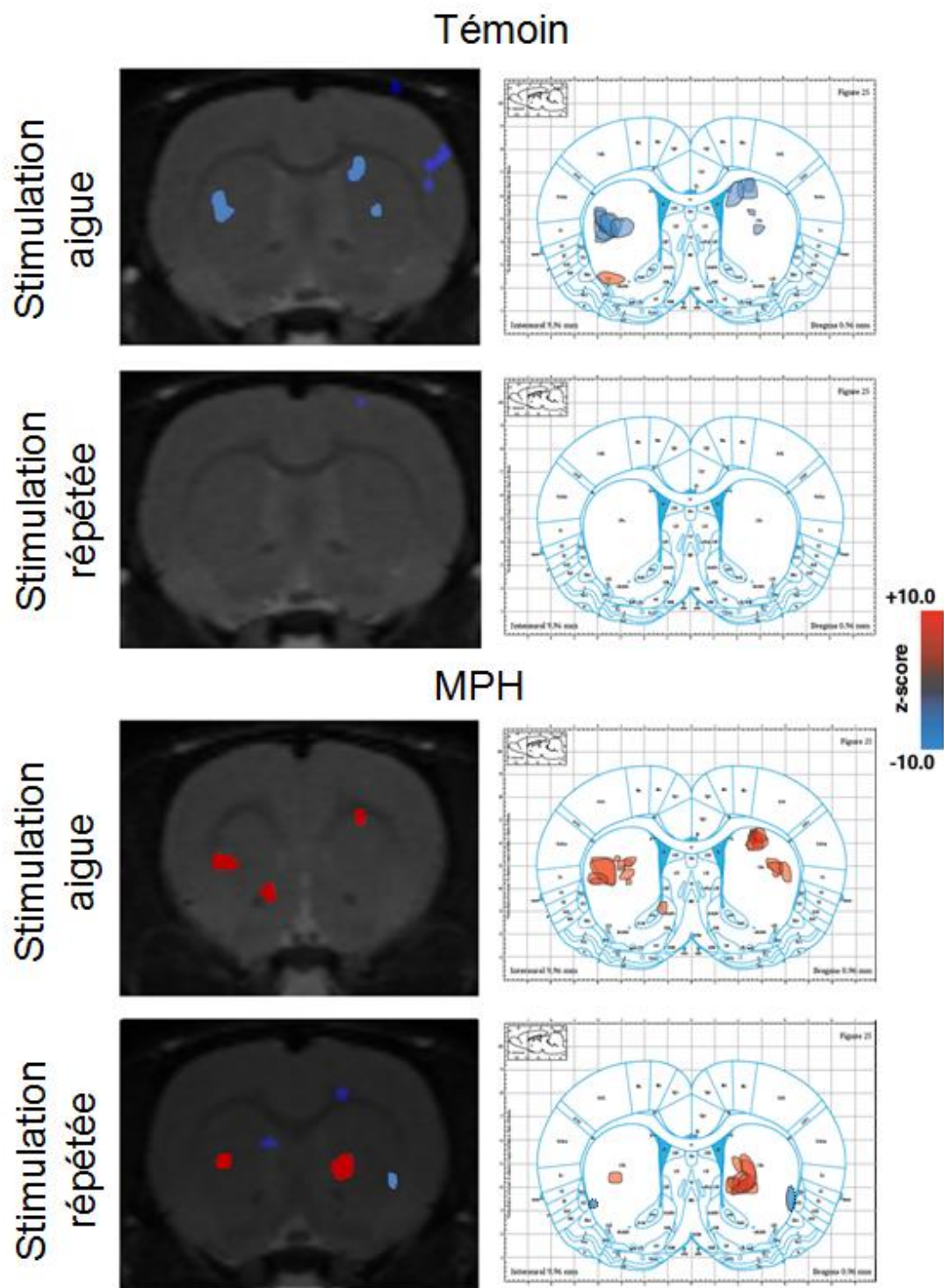


Figure 52 : Représentation des changements significatifs dans l'accumulation du ^{18}F FDG au sein du striatum chez les rats adultes exposés en prénatal au MPH vs sérum physiologique (témoin) ($n=6$ et 7 , respectivement) après stimulation pharmacologique aigüe ou répétée à la cocaïne. Les images des cartes de z-scores générées sont fusionnées avec un template IRM et sont présentées à gauche. Un résumé de l'ensemble des modifications de l'accumulation de ^{18}F FDG observé au sein du striatum est représenté à droite sur des coupes coronales d'atlas de Paxinos et Watson (augmentation en rouge, diminution en bleu, $P<0,01$, test t de Student).

IV - Études des altérations comportementales

A/ Renforteur naturel

Puisque le MPH est un psychostimulant et parce que la DA joue un rôle clé dans les comportements de motivation, nous avons évalué l'effet de l'exposition prénatale au MPH sur la motivation pour une récompense naturelle en utilisant les tests de préférence et de réponse opérante au sucre.

1- Test de préférence au sucre

Les animaux provenant de mères exposées au sérum physiologique (témoin) montrent une préférence au sucre élevée ($93,7 \pm 1,4\%$) alors que les animaux exposés en prénatal au MPH présentent une préférence au sucre significativement moins élevée ($44,1 \pm 2,6\%$) ($P < 0,001$, test *t* de Student) comme le montre la **Figure 53**.

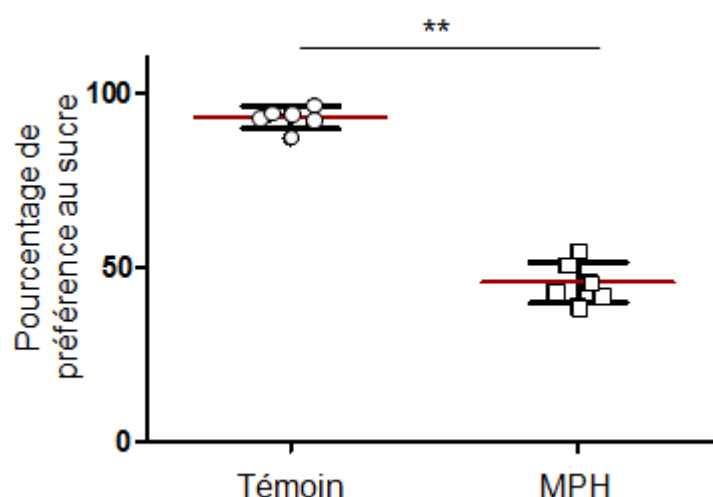


Figure 53 : Effet de l'exposition prénatale au MPH sur la préférence au sucre des animaux mâles adultes (** $P < 0,01$, test *t* de Student) ($n=6$ témoin ; $n=6$ MPH).

L'exposition prénatale au MPH induit à long terme une diminution de la préférence au sucre.

2- Réponse opérante au sucre : FR1 et PR

Nous avons cherché si l'exposition prénatale au MPH provoquait un changement dans l'acquisition d'un comportement renforçateur au sucre grâce à un protocole de FR1. Au cours des 10 sessions de 30 min de FR1, tous les animaux ont acquis un comportement opérant pour l'obtention d'une pastille de sucre. Par contre, on constate que les animaux exposés en prénatal au MPH acquièrent ce comportement plus rapidement que les animaux témoins (**Figure 54, a**, $P < 0,05$ et $P < 0,001$, ANOVA). Tous les rats MPH ont récupéré le maximum de pastille de sucre au bout de la 6^{ème} session alors que les animaux témoins l'ont fait à partir de la 8^{ème} session.

La motivation des animaux à obtenir la récompense naturelle a été étudiée chez les animaux adultes exposés en prénatal au sérum physiologique ou au MPH à l'aide du PR. Le breakpoint pour l'obtention de la n^{ième} pellet de sucre est moyenné sur l'ensemble des 3 sessions de 180 min chez les animaux témoins et MPH. De manière significative, les animaux MPH appuient moins sur le levier actif pour acquérir la pastille de sucre (224 ± 15 vs 337 ± 39 , $P < 0,001$, ANOVA) que les animaux témoins dans ce test de PR (cf **Figure 54, b**).

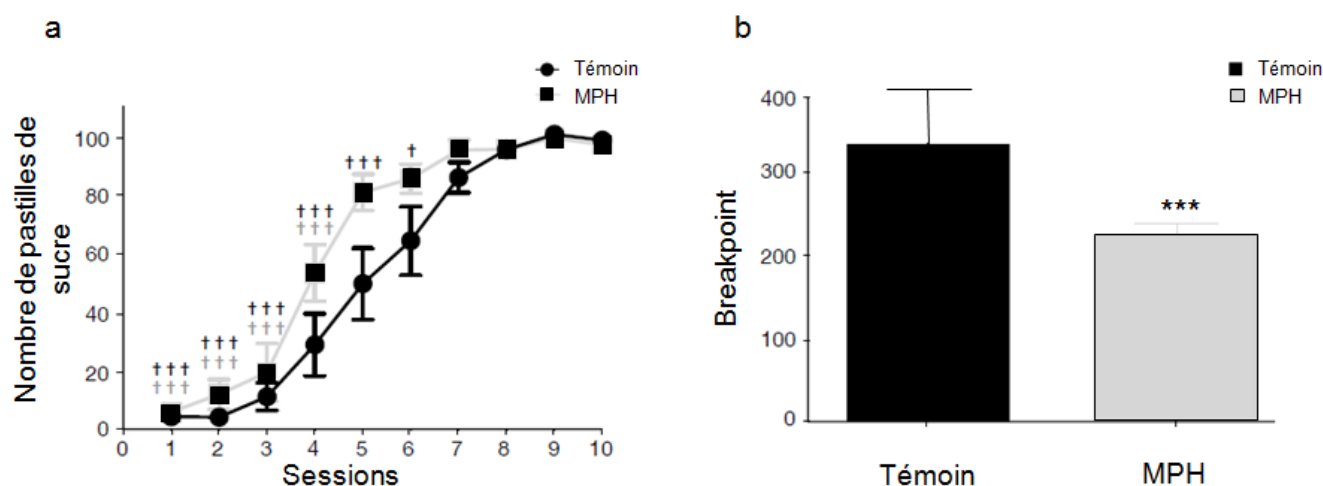


Figure 54 : Réponse opérante au sucre. (a) Variation de la moyenne $\pm$ SEM du nombre de pastilles de sucre absorbé par les animaux mâles adultes exposés en prénatal au sérum physiologique (témoin) ou au MPH (n=8 et 7, respectivement) pendant des sessions de 30 min de FR1 durant 10 jours. (b) Moyenne $\pm$ SEM du breakpoint pour l'obtention de la n^{ième} pastille, qui est défini comme le *last ratio completed* atteint, sur 4 sessions de 180 min chez les animaux témoins ou MPH (n=7 et 8, respectivement). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'une analyse de Dunnett afin de comparer le nombre de pastilles de sucre pour chaque session (†P<0,05 et ‡P<0,001) et d'une ANOVA à deux facteurs (***P<0,001) pour comparer les moyennes de breakpoint pour les groupes témoin et MPH.

L'exposition au MPH induit à long terme une moindre motivation pour l'obtention de la récompense naturelle qu'est le sucre.

B/ Renforteur synthétique

1- Auto-administration de cocaïne : FR1, FR5 et PR

Nous avons cherché si l'exposition prénatale au MPH provoquait un changement dans l'acquisition d'un comportement d'AA à la cocaïne (0,3 mg/kg) grâce à un protocole de FR1. Au cours de ces 10 sessions (cf **Figure 55, a**), aucune différence entre les deux groupes n'est observée (P>0,05, test t de Student). Les

deux groupes d'animaux augmentent leur AA tout au long des sessions jusqu'à une stabilisation vers la 7^{ème} session.

En ce qui concerne le FR5 (test fréquemment réalisé en transition entre le FR1 et un test motivationnel de PR), où l'animal doit réaliser 5 NP pour avoir une récompense, aucune différence entre les animaux témoins et MPH n'est mise en évidence ($P>0,05$, test t de Student) sur les 2 sessions réalisées.

La motivation des animaux à s'auto-administrer cette récompense synthétique qu'est la cocaïne a été étudiée chez les animaux adultes exposés en prénatal au sérum physiologique ou au MPH (ratio progressif). Dans ce test de motivation, différentes doses de cocaïne injectées sont testées afin de réaliser une courbe dose-réponse (cf **Figure 55, b**). La réponse est ici le breakpoint qui correspond au nombre de NP actif qui va permettre d'obtenir la $n^{\text{ième}}$ injection. Les deux groupes d'animaux ont un profil de courbe dose-réponse similaire et aucune différence significative n'est trouvé entre les groupes pour chaque dose ($P>0,05$, test t de Student).

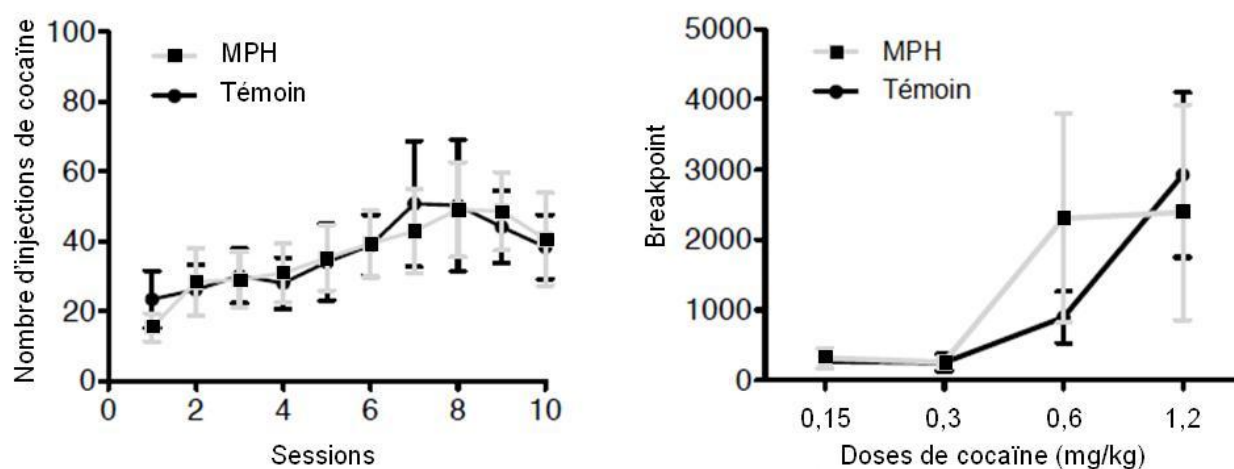


Figure 55 : Auto-administration à la cocaïne. (a) Variation de la moyenne $\pm$ SEM du nombre d'injections de cocaïne (0,3 mg/kg) reçu par les animaux mâles adultes exposés en prénatal au sérum physiologique (témoin) ou au MPH (n=8 pour chaque groupe) pendant des sessions de 2 heures de FR1 durant 10 jours. **(b)** Effets dose de la cocaïne sur le breakpoint du ratio progressif chez les animaux exposés en prénatal au sérum physiologique (témoin) ou au MPH (n=8 pour chaque groupe). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM du breakpoint qui est défini comme le *last ratio completed* atteint. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test paramétrique t de Student ($P>0,05$) pour comparer le nombre d'injections pour chaque session et un test t de Student ($P>0,05$) pour comparer les moyennes de breakpoint pour les groupes témoin et MPH.

Dans nos conditions, l'exposition prénatale au MPH n'induit pas de conséquence à long terme sur la prise et sur la motivation à s'auto-administrer de la cocaïne.

2- Test de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice des animaux mâles adultes exposés en prénatal au sérum physiologique (témoin) ou au MPH a été étudiée. Nous avons montré que cette exposition au MPH n'induit aucun effet sur cette activité en condition basale (cf **Figure 56, a**) ($P > 0,05$, test t de Student). Cependant, les deux groupes d'animaux vont réagir différemment à la cocaïne. Alors que 77% (10 sur 13) des animaux témoins augmentent leur activité locomotrice après une stimulation aigüe, seulement 45% (5 sur 11) des animaux MPH le font (cf **Figure 56, b**).

En ce qui concerne les animaux sensibles à la cocaïne, des effets significatifs ont été observés avec les animaux des deux groupes, montrant une augmentation de l'activité locomotrice après une injection aigüe et une sensibilisation locomotrice après la condition répétée (38 ± 11 vs 62 ± 10 vs 79 ± 27 et 37 ± 10 vs 51 ± 3 vs 65 ± 12 m pour les animaux témoins et les animaux MPH, dans les conditions basale, aigüe et répétée, respectivement, $P < 0,05$ pour témoins ; $P < 0,05$, $P < 0,01$ pour MPH, ANOVA) (cf **Figure 56, c**).

Pour les animaux insensibles à la cocaïne, un effet significatif entre les deux groupes a été observé. Alors que la cocaïne n'a pas d'effet chez les témoins (38 ± 11 vs 22 ± 6 vs 34 ± 24 m pour les conditions basale, aigüe et répétée, respectivement, $P > 0,05$, ANOVA), les animaux MPH ont montré une augmentation de leur activité locomotrice seulement après l'injection répétée (37 ± 10 vs 39 ± 13 vs 58 ± 22 m pour les conditions basale, aigüe et répétée, respectivement, $P < 0,01$, ANOVA) (cf **Figure 56, d**).

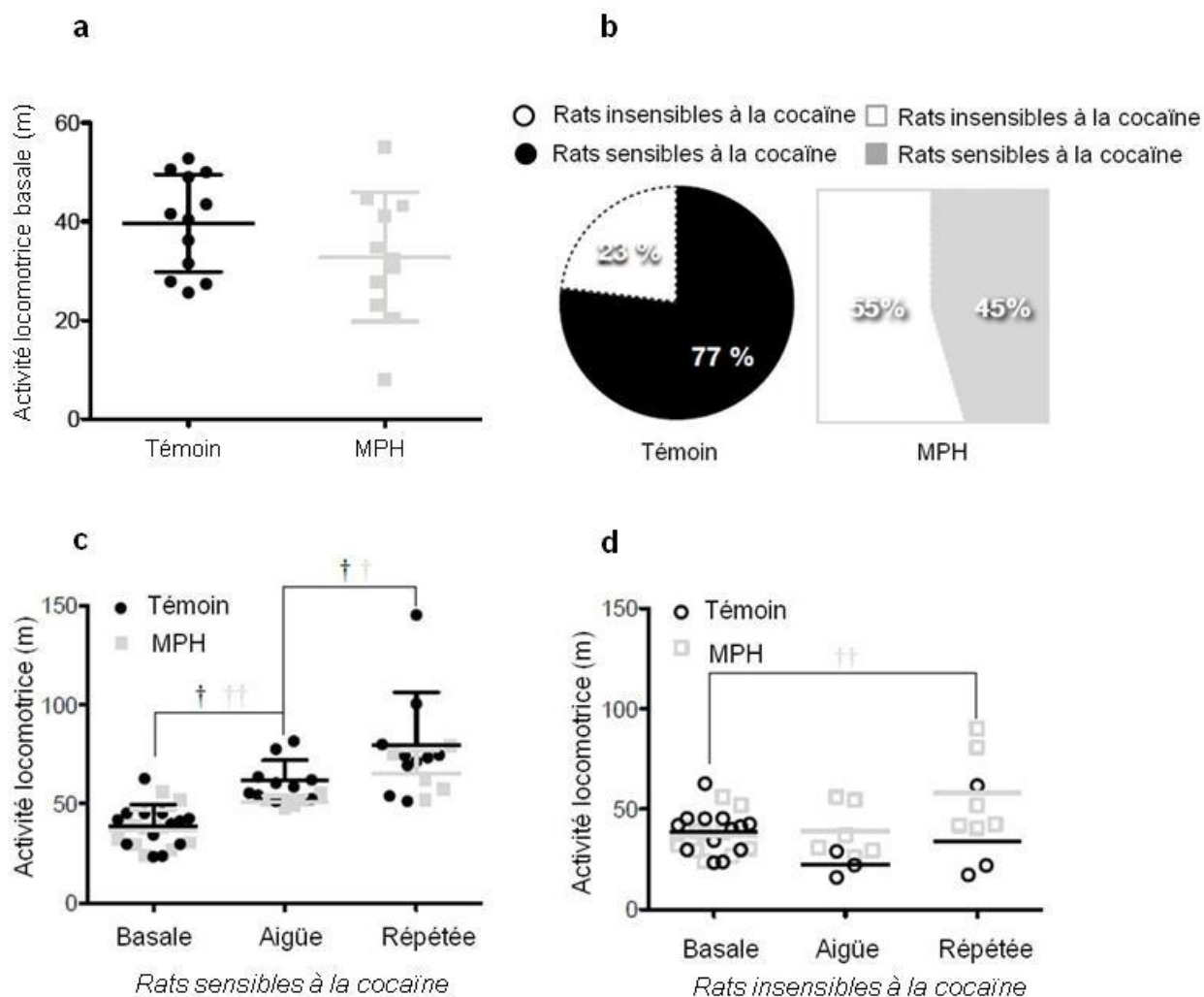


Figure 56 : (a) Activité locomotrice basale (moyenne $\pm$ écart-type (SD)) des rats mâles adultes exposés en prénatal au sérum physiologique (témoin) ou au MPH (n=13 et 11, respectivement). (b) Représentation du pourcentage des animaux témoins et MPH sensibles ou insensibles à une injection aigüe de cocaïne (15 mg/kg, i.p.) vis-à-vis des effets locomoteurs. (c) Activité locomotrice (moyenne $\pm$ écart-type (SD)) des animaux sensibles à la cocaïne dans les conditions basale, aigüe ou répétée (15 mg/kg/J, i.p. pendant 5 jours). (d) Activité locomotrice (moyenne $\pm$ écart-type (SD)) des animaux insensibles à la cocaïne dans les conditions basale, aigüe ou répétée (15 mg/kg/J, i.p. pendant 5 jours). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test t de Student pour les comparaisons entre témoin et MPH ($P > 0,05$) pour l'activité locomotrice basale, puis à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs suivie d'un ajustement de Bonferroni pour les comparaisons et les interactions entre les deux groupes en plus d'une ANOVA avec un ajustement de Newman-Keuls ($\#P < 0,05$ et $\#\#P < 0,01$) pour les comparaisons multiples entre les conditions.

L'exposition prénatale au MPH induit donc à long terme des modifications dans les effets locomoteurs de la cocaïne.



Le MPH est utilisé dans le traitement de la narcolepsie (Hirai et Nishino, 2011) et est le médicament le plus prescrit pour le traitement du TDA/H (Fone et Nutt, 2005). Entre 1990 et 1998, les prescriptions de MPH chez les filles ont augmenté de 2,8 fois (Robinson et al, 2002) et le TDA/H perdurerait à l'âge adulte dans plus de 70% des cas (Biederman, 1998). Ainsi, un nombre non négligeable de femmes TDA/H en âge de procréer peut être confronté à une grossesse et à la question de la poursuite du traitement pendant cette période. Un traitement par MPH durant la grossesse n'est pas conseillé par le corps médical. Cependant, son arrêt n'est dans certains cas pas possible car il peut entraîner une résurgence des symptômes et aboutir à une gêne fonctionnelle (Bolea-Alamanac et al, 2013). Ces dernières années montrent aussi une augmentation importante de l'utilisation de MPH hors indication pour ses propriétés psychostimulantes notamment chez les jeunes adultes (augmentation par 7 de l'abus de MPH entre 1993 et 1999 ; Klein-Schwartz et al, 2003). Le risque d'exposition au MPH du cerveau en développement pendant la grossesse n'est donc pas négligeable et pose différentes questions sur le plan sociétal : (i) un tel traitement induit-il des malformations, des déficits neurologiques, cognitifs et comportementaux ? (ii) cela prédispose-t-il à une naissance prématurée ou à des enfants plus petits que la normale ? (iii) est ce que cela entraîne un syndrome de sevrage chez le nouveau-né ? (iv) ce traitement a-t-il des conséquences à long terme sur le fonctionnement cérébral de ce futur individu ? La question qui nous a particulièrement intéressé lors de ce projet était de savoir si l'exposition au MPH pendant la grossesse pouvait entraîner des altérations neurobiologiques à long terme chez le futur enfant et si la prise de ce psychostimulant durant cette période pouvait modifier à long terme le fonctionnement des circuits de récompense. Il est difficile d'avoir des réponses à ce type de questions dans un contexte clinique pour des raisons éthiques et parce que l'environnement des sujets n'est pas contrôlable. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler à l'aide de modèles animaux d'exposition prénatale au MPH qui même s'ils présentent de nombreuses limitations peuvent apporter des données importantes pour de nouvelles hypothèses en clinique.

Nous avons donc utilisé un modèle d'exposition prénatale au MPH chez le rat afin d'étudier les conséquences à long terme de cette exposition sur le cerveau en développement.

Nos résultats ont montré que les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentaient des altérations neurobiologiques structurales et fonctionnelles associées au système dopaminergique et à sa réactivité suite à une administration de cocaïne. Nos résultats montrent aussi que ces animaux présentent une altération de la préférence au sucre et de la motivation pour obtenir du sucre (renforteur naturel) alors qu'aucune baisse de motivation pour s'auto-administrer de la cocaïne (renforteur synthétique) n'a été décelée. Cependant, ces animaux montrent tout de même une baisse de sensibilité aux effets locomoteurs de la cocaïne.

Nous avons ainsi pu démontrer, grâce à ce modèle, que l'exposition à un psychostimulant exogène au cours d'une fenêtre développementale précoce affecte le fonctionnement cérébral lié à la neurotransmission dopaminergique à l'âge adulte.

I - Une exposition prénatale au MPH induit-elle des conséquences physiologiques sur les rates gestantes et sur la portée ?

L'exposition des rates gestantes au MPH entraîne une diminution de leur prise de poids durant les 8 jours de traitement de G13 à G20. Il est connu que le MPH a un effet anorexigène (Leddy et al, 2009) diminuant donc la prise alimentaire (Elfers et al, 2011), ce qui est cohérent avec nos résultats. Cependant, le mécanisme par lequel le MPH induit l'anorexie n'est pas complètement élucidé. Il pourrait être attribué à un effet du MPH sur le système dopaminergique et notamment dans le contrôle de l'obtention d'une récompense résultant d'une perturbation de la prise alimentaire normale (Elfers et al, 2011). Cette perte de poids pourrait altérer le comportement maternel et participer aux résultats que nous avons obtenus dans cette étude (Baier et al, 2012).

Néanmoins, l'exposition prénatale au MPH que nous avons réalisée n'aboutit à aucun effet tératogène notable sur la progéniture, le nombre de petits par portée à terme ne diffère pas entre le groupe exposé au MPH et le groupe exposé au sérum physiologique et aucune malformation physique n'a été décelée. Ceci est en accord avec la mise en évidence que l'exposition prénatale au MPH chez la femme n'induisait pas d'effet tératogène (Humphreys et al, 2007). De plus, le nombre de

mâles ainsi que le nombre de femelles ne diffère pas entre le groupe témoin et le groupe MPH et le ratio mâle/femelle reste équilibré dans les deux groupes. Ces résultats sont similaires à ceux déjà trouvés au sein du laboratoire ainsi que dans l'étude de Lloyd et collaborateurs (2013) où l'exposition prénatale au MPH n'a pas d'effet sur la durée de la gestation, le ratio mâle/femelle, la taille de la portée et la mortalité fœtale. Enfin, tout comme dans l'étude de McFadyen-Leussis (2003), les poids des nouveau-nés entre les animaux témoins et MPH sont semblables du sevrage jusqu'à l'âge adulte.

II - Une exposition prénatale au MPH entraîne-t-elle des modifications à long terme de l'activité cérébrale ?

Nos études d'imagerie scintigraphique ont révélé des anomalies métaboliques au long terme dans le cerveau des animaux mâles adultes exposés en prénatal au MPH, touchant des régions du système limbique et reliées au système dopaminergique. Notre hypothèse de départ était qu'une exposition prénatale au MPH pouvait induire des altérations fonctionnelles du système catécholaminergique en raison de son action ciblant particulièrement le DAT et le NET (Sadasivan et al, 2012). L'analyse des cartes de z-score après imagerie au ¹⁸FDG a révélé une hyperactivation bilatérale dans une zone incluant la VTA et la SN. Ces résultats suggèrent qu'une telle activation cérébrale pourrait être localisée dans les zones contenant les corps cellulaires dopaminergiques (SNc et VTA) ou dans la substance noire pars reticulata (SNr) qui contient des neurones GABAergiques et est une des structures de sortie des ganglions de la base impliquée dans les boucles cortico-sous-corticales (Alexander et al, 1986). En effet, la résolution spatiale de l'imagerie TEP dans le cerveau du rat ne permet pas de distinguer avec précision ces différentes zones cérébrales.

Les anomalies métaboliques détectées au sein de l'habénula latérale (LHb) et de l'hypothalamus latéral (LHyp) renforcent l'idée de perturbation du système dopaminergique puisque que ces structures peuvent moduler l'activité des neurones dopaminergiques. L'activation de la LHb a été démontrée comme inhibant fortement

les neurones dopaminergiques (Matsumoto et al, 2007 ; Barrot et al, 2012) alors que le LHyp facilite l'excitation glutamatergique de ces neurones et inhibe l'activité du Nac via le système hypocrétine/oréxine (Korotkova et al, 2003 ; Borgland et al, 2006 ; Sesack et al, 2010). Ces réseaux jouent un rôle important dans la régulation des circuits de la récompense et dans des comportements dirigés vers un but (Tsujino et al, 2009). Ainsi, les modifications métaboliques observées dans ces régions sont en accord avec l'hypermétabolisme détecté dans la région VTA/SNc, et supportent l'hypothèse de dysfonctionnements dopaminergiques chez les rats adultes MPH.

Par ailleurs, les modifications métaboliques détectées dans le thalamus médiodorsal et centrolatéral, qui reçoivent des afférences de la SNr et qui projettent vers les aires corticales cingulaire, orbitofrontale, insulaire et sensorimotrice via les boucles cortico-striato-thalamo-corticales (Alexander et al, 1986), suggèrent des altérations de ces circuits. En effet, des modifications métaboliques sont aussi observées dans les cortex cingulaire, prélimbique et insulaire ainsi que les territoires striataux correspondant aux zones de projection des régions cingulaire et insulaire (Steiner et Tseng, 2010). Ainsi, ces résultats fournissent des arguments en faveur de la présence de dysfonctionnements dans ces circuits dopaminergiques limbiques et cortico-striato-thalamo-corticaux à l'âge adulte suite à l'exposition prénatale de MPH.

En outre, on ne constate pas de modification métabolique des zones cérébrales contenant les corps cellulaires norépinéphrinergeriques, à savoir le locus coeruleus et le noyau sous-coeruleus, ni des corps cellulaires sérotoninergeriques, à savoir le noyau du Raphé. Toutes les régions présentant des changements métaboliques chez les animaux MPH sont en lien avec les systèmes dopaminergique, norépinéphrinergerique et sérotoninergerique à l'exception des ganglions de la base qui eux ne sont pas innervés par les fibres NE, hormis le Nac (Berridge et Waterhouse, 2003). Cependant, les altérations corticales retrouvées dans cette étude sont circonscrites à deux régions (cortex cingulaire et insulaire) à l'exception des cortex sensorimoteurs qui reçoivent des projections dopaminergiques alors que les innervations corticales norépinéphrinergerique et sérotoninergerique sont très diffuses (Berridge et Waterhouse, 2003 ; O'Hearn et Molliver, 1984). Ceci suggère que l'exposition prénatale au MPH pourrait principalement altérer la fonctionnalité du système dopaminergique et des boucles cortico-sous-corticales limbiques. Ceci est en accord avec une étude qui montre qu'une administration de

MPH chez le jeune rat induit des changements à long terme du système dopaminergique et aucune modification des systèmes norépinéphrinergerique et sérotoninergique (Moll et al, 2001). Ce résultat peut être expliqué par la plus grande affinité du MPH pour le DAT par rapport au NET et au SERT (Gatley et al, 1996).

III - Les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentent-ils des altérations structurales du système dopaminergique ?

La DA est régulée par l'activité de la TH et l'expression de cette enzyme peut être considéré comme un marqueur des neurones dopaminergiques (Shi et al, 2006).

Nous avons cherché à savoir si l'hyperactivation métabolique bilatérale présente dans la VTA et la SN des rats MPH était reliée à des altérations structurales de cette région. Nos résultats montrent que l'exposition prénatale au MPH induit une élévation chez l'adulte du nombre de neurones exprimant la TH dans la SNc et une tendance dans la VTA, et également une augmentation de l'expression de la TH dans des aires de projections dopaminergiques au sein du striatum et du Nac. Il est important de noter que les expérimentations ont été réalisées avec n=4 animaux dans le groupe MPH, ainsi des effectifs supérieurs auraient pu apporter une significativité des résultats observés dans la VTA. Cette augmentation de l'immunoréactivité TH pourrait s'expliquer soit par une augmentation du nombre de neurones dopaminergiques, soit par une augmentation de l'expression de la TH sans changement dans le nombre de ces neurones (Xavier et al, 2005). Une précédente étude au sein du laboratoire avait montré dans ce même modèle une augmentation du DAT dans le striatum. Il est admis que la densité du DAT représente un bon index de la quantité de neurones dopaminergiques (Horn, 1990). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les animaux adultes exposés en prénatal au MPH pourraient présenter un nombre plus important de neurones dopaminergiques par rapport aux animaux témoins. Néanmoins, d'autres études seraient nécessaires afin d'apporter une réponse à cette suggestion.

IV - Les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentent-ils des altérations fonctionnelles du système dopaminergique ?

Afin d'étudier les potentielles altérations fonctionnelles du système dopaminergique, nous avons évalué le taux de DA extracellulaire par microdialyse au niveau des projections dopaminergiques limbiques, à savoir le NacSh et le cortex cingulaire. L'activité tonique dopaminergique, contrairement à l'activité phasique, assurerait un taux basal de DA extracellulaire de faible concentration, cette DA échappant en grande partie à la recapture par le DAT et diffusant ainsi dans le milieu extrasynaptique. C'est cette DA libérée toniquement qui constitue l'essentiel de la DA extracellulaire détectée en microdialyse. Nos résultats montrent que les taux basaux de DA extracellulaire sont significativement augmentés dans le NacSh chez les animaux exposés en prénatal au MPH. Les animaux témoins présentent un taux basal de DA équivalent à ceux décrits dans la littérature (Hedou et al, 1999 ; Frank et al, 2008). L'élévation de la concentration de DA tonique trouvée dans le NacSh des animaux adultes exposés en prénatal au MPH s'accorde bien avec l'hypothèse d'une augmentation de l'activité dopaminergique dans la région VTA/SN et notamment d'une possible augmentation du nombre de neurones dopaminergiques. Nous avons par la suite stimulé le système dopaminergique par la cocaïne et évalué le relargage phasique de DA dans ce modèle. Les résultats obtenus montrent qu'une injection aiguë de cocaïne chez les animaux MPH n'a pas conduit à des concentrations maximales de DA plus élevées que chez les animaux témoins, mais à des niveaux de DA maximaux similaires. Ceci pourrait indiquer que ces animaux sont moins sensibles aux effets de la cocaïne sur le relargage de DA. Il semble que l'exposition prénatale au MPH ait induit une diminution du rapport signal/bruit de la neurotransmission dopaminergique mésolimbique en raison d'altération de la libération de la DA tonique et phasique. Le fait que l'injection de cocaïne induise un relargage maximal de DA identique dans les deux groupes pose aussi la question de la présence d'un effet plafond qui pourrait être compatible avec les concentrations maximales de DA extracellulaire déjà rapportées dans le NacSh après des injections de cocaïne aiguë chez le rat (Frank et al, 2008). Nos données suggèrent donc une réactivité différente du système dopaminergique à la cocaïne chez les animaux adultes exposés en prénatal au MPH. Il a été montré que la DA tonique joue un rôle

majeur dans la prise de décision ainsi que dans la motivation à effectuer un comportement (Ostlund et al, 2011). De plus, une étude récente suppose que l'augmentation de la DA tonique provoque une diminution de l'impact de précédents renforçateurs sur les futurs comportements dirigés vers un but (Beeler, 2012). Ainsi, nos résultats et ces données suggèrent que ces animaux adultes exposés en prénatal au MPH pourraient présenter des altérations comportementales liées aux circuits motivationnels.

Parallèlement, nous avons aussi quantifié le relargage de DA dans le cortex cingulaire qui joue un rôle important dans le contrôle cognitif et dans les comportements dirigés vers un but (Bush et al, 2000). Les concentrations de DA basales obtenues chez les animaux témoins sont en accord avec la littérature (Hedou et al, 1999). Cependant, et contrairement au NacSh, nos résultats n'indiquent pas de différence entre les animaux exposés en prénatal au MPH et les animaux témoins dans cette zone cérébrale. La stimulation pharmacologique par la cocaïne n'induit pas d'augmentation de la DA extracellulaire que ce soit chez les animaux témoins ou les animaux MPH. Seulement deux animaux, un témoin et un MPH ont répondu positivement à la stimulation. Est-ce que réellement ces deux animaux ont répondu à cette stimulation ou alors cela provient-il d'une erreur de quantification ? Ainsi, il serait judicieux de renouveler cette expérimentation afin de vérifier ces résultats. Néanmoins, il avait été montré qu'une administration de cocaïne résultait en une diminution du taux de DA au niveau du CPF chez le rat (Hedou et al, 1999). Cependant, les coordonnées d'implantation des sondes de microdialyse dans cette étude sont relativement différentes des nôtres et ne visent pas le cortex cingulaire. Ainsi, dans nos conditions, les rats MPH adultes présenteraient des altérations fonctionnelles DA dans le NacSh mais pas dans le cortex cingulaire.

L'augmentation du relargage tonique de DA dans le NacSh des animaux MPH laisse supposer la présence d'altérations post-synaptiques sur la base de théories homéostatiques. La quantification de l'expression de c-Fos nous a permis d'évaluer ces modifications, ce gène d'activation précoce étant sensible à une stimulation dopaminergique (Hiroi et al, 2002). De façon intéressante, notre protocole a permis de montrer que les rats adultes exposés en prénatal au MPH présentaient une augmentation de l'expression basale de c-Fos uniquement dans le cortex cingulaire et dans le NacSh. En outre, les animaux MPH n'ont montré aucune augmentation de

l'expression de c-Fos dans le NacSh ni dans le cortex cingulaire après des injections aiguës ou répétées de cocaïne contrairement à ce qui est observé chez les animaux témoins et dans la littérature (Graybiel et al, 1990 ; Brown et al, 1992). Cette augmentation de l'expression basale de c-Fos pourrait donc être une conséquence de l'augmentation de la quantité de DA tonique observée en microdialyse et mettrait en évidence un phénomène de compensation ayant pour but de conserver l'homéostasie du système. Ainsi, la transmission dopaminergique tonique élevée chez ces animaux MPH devrait induire une plus forte activation des RD2 post-synaptique qui aurait pour conséquence une modification des voies de transduction du signal, y compris l'expression de c-Fos. Cependant, ce dernier devient insensible à une stimulation à la cocaïne. Ces résultats peuvent supporter l'idée d'une réponse émoussée des neurones post-synaptiques en réponse à une stimulation du système dopaminergique à moins qu'il faille une stimulation plus importante pour obtenir une stimulation. Pour répondre à cette question, de nouvelles expériences de quantification de relargage de DA et d'expression de c-Fos avec des doses de cocaïne supérieures à 1 mg/kg i.v. pourraient être envisagées.

La réactivité post-synaptique à la stimulation dopaminergique est donc différente entre les MPH et les témoins. En plus de c-Fos, nous avons évalué le métabolisme cérébral à la suite d'une administration aiguë ou répétée à la cocaïne, au sein du striatum. La stimulation aiguë de cocaïne induit chez les témoins une dichotomie métabolique avec une baisse au niveau dorsal et une augmentation dans le striatum ventral. Cette diminution de métabolisme au niveau dorsal est retrouvée dans la littérature. Une étude sur les souris DAT/KO a montré qu'un traitement à la cocaïne (10 mg/kg, i.p.) induit une baisse de captation de ^{18}F FDG dans les bulbes olfactifs, le cortex moteur, le striatum et le cervelet (Thanos et al, 2008). Ces données sont en accord avec d'autres montrant que la cocaïne induit une baisse de métabolisme dans deux autres souches de souris (Zocchi et al, 2001), par contre cette étude montre aussi que le métabolisme est augmenté chez le rat contrairement aux baisses observées chez le singe (Lyons et al, 1996) et chez l'homme (London et al, 1990). Dans cette dernière étude, une administration i.v. de 40 mg de cocaïne chez l'homme consommateur de drogues induit une baisse du métabolisme chez 26 cas sur 29 dans le cortex, les ganglions de la base, l'hippocampe, le thalamus et le mésencéphale. Cette diminution du métabolisme cérébral pourrait être la

conséquence de la diminution globale du débit sanguin cérébral à cause des effets vasoconstricteurs de la cocaïne (Yonetani et al, 1994 ; Salom et al, 1996 ; Turillazzi et al, 2012). Enfin, la dichotomie métabolique observée chez les animaux témoins n'est pas retrouvée dans la littérature et provient certainement des différences de méthodologies utilisées. Chez le groupe MPH, la stimulation à la cocaïne n'induit pas une moindre activité métabolique mais impacte de façon opposée l'activité métabolique des témoins. Il est difficile de donner une signification à ces résultats et il serait nécessaire de réaliser d'autres expérimentations pour mieux comprendre le sens de ces données. Cependant, ces données suggèrent que les animaux exposés en prénatal au MPH présentent une altération de leur réactivité à une stimulation à la cocaïne, ceci pouvant avoir un impact au niveau comportemental.

V - Les animaux adultes exposés en prénatal au MPH présentent-ils des altérations comportementales ?

Le cortex cingulaire est impliqué dans l'évaluation des différences entre les bénéfices attendus et le coût de la réalisation d'une action qui va contribuer à l'acquisition et au maintien d'un comportement (Rushworth et al, 2004). Il est suggéré que le NacSh a un rôle important dans le traitement d'informations liées à la récompense (Di Chiara, 2002 ; Ostlund et al, 2011). Comme la signalisation striatale dopaminergique semble être impliquée dans plusieurs aspects de contrôle comportemental et que cette DA joue un rôle clé dans la motivation (Beninger et Phillips, 1981 ; Robinson et Berridge, 1993 ; Dickinson et al, 2000 ; Salamone et Correa, 2012), nous avons effectué des tests de préférence et de réponse opérante au sucre chez les animaux exposés en prénatal au MPH afin d'évaluer leur comportement de recherche et de motivation de la récompense naturelle, le sucre ayant été démontré comme stimulant la neurotransmission dopaminergique (Mark et al, 1991). Nos résultats ont montré que les rats adultes exposés en prénatal au MPH n'avaient pas de préférence particulière pour le sucre, ce qui pourrait être interprété par une diminution de la perception du sucré, un phénomène d'anhédonie ou un comportement dirigé vers un but altéré. Or, d'un côté, les résultats de réponse opérante ont révélé que les animaux MPH ont réalisé un apprentissage plus rapide

du test que les animaux témoins, ce qui sous-entend que l'attirance de ces animaux envers le sucre n'est pas affectée. Il avait été démontré chez la souris qu'une exposition prénatale au MPH pouvait mener à une diminution de l'anxiété et par conséquent à une augmentation du comportement exploratoire dans des tests comportementaux d'openfield et de croix surélevée (McFadyen-Leussis et al, 2004), ce qui pourrait expliquer l'acquisition plus rapide du comportement opérant qui a été aussi observée chez la souris exposée en prénatal au MPH dans un autre test comportemental (Lloyd et al, 2013). D'un autre côté, nos résultats du test de PR montrent que les animaux exposés en prénatal au MPH vont faire moins d'effort pour obtenir une pastille de sucre. Ceci est en faveur d'une diminution de la motivation de ces animaux à obtenir du sucre, et par extension une diminution de la motivation vis-à-vis d'une récompense naturelle.

Compte tenu des résultats obtenus sur la réactivité du cerveau des animaux adultes exposés en prénatal au MPH, quelle est la motivation de ces animaux à s'auto-administrer de la cocaïne ? Dans nos conditions, les résultats d'AA n'ont pas montré de différence en terme de rapidité d'apprentissage du test entre les deux groupes d'animaux contrairement au test d'apprentissage pour le sucre, dans lequel les animaux MPH ont acquis un comportement d'AA plus rapidement que les animaux témoins. De plus, les résultats du test de PR ne diffèrent pas entre les deux groupes d'animaux quelque soit la dose de cocaïne administrée, le breakpoint étant strictement identique. La motivation des animaux exposés en prénatal au MPH vis-à-vis de l'auto-administration de cocaïne ne semble donc pas modifiée. Cependant, nous pouvons supposer que cette expérimentation n'a pas correctement fonctionné au vu des SEM assez conséquents observés chez les deux groupes d'animaux pour le nombre d'injections de cocaïne du test d'apprentissage FR1. De plus, en analysant les données individuelles de chaque animal, nous nous sommes rendu compte que très peu d'animaux avaient acquis le comportement d'auto-administration. Il serait alors nécessaire de renouveler cette expérimentation avec notamment un plus grand nombre d'animaux par groupe. De plus, il serait envisageable d'augmenter la dose de cocaïne pour ce protocole FR1 permettant ainsi une potentielle meilleure acquisition du comportement d'auto-administration (Chauvet et al, 2009 ; Freeman et al, 2009).

Le relargage de DA au niveau du NacSh par la cocaïne induit une élévation de l'activité locomotrice (Hedou et al, 1999). Ainsi, nous avons cherché à évaluer si l'exposition prénatale au MPH pouvait induire des modifications de cet effet locomoteur de la cocaïne car la motivation à s'auto-administrer de la cocaïne n'était pas modifiée. Pour cela, nous avons réalisé des mesures de l'activité locomotrice des animaux au sein d'une enceinte circulaire et constaté qu'il n'y avait aucune différence d'activité entre les animaux MPH et les animaux témoins. De plus, aucune stéréotypie particulière n'a été observée dans les deux groupes d'animaux. Aucune étude à ce jour n'a exploré ces effets locomoteurs après une exposition prénatale au MPH mais des études avec des expositions à la cocaïne ou aux amphétamines ont déjà été menées. Des augmentations de l'activité locomotrice se développent au début de la période postnatale chez les animaux exposés en prénatal à la cocaïne durant les deux dernières semaines de gestation à de fortes doses (entre 30 et 60 mg/kg) mais disparaissent à l'âge adulte (Hutchings et al, 1989 ; Spear et al, 1989). Ces données à l'âge adulte sont cohérentes avec nos résultats. Il serait alors intéressant d'étudier l'activité locomotrice des animaux MPH durant l'adolescence. De plus, des animaux exposés en prénatal au MDMA (3,4-méthylènedioxy-N-méthamphétamine) (15 mg/kg) du 14^{ème} au 20^{ème} de gestation ne présentent pas non plus de différence en terme d'activité à l'âge adulte par rapport aux animaux témoins que ce soit dans leurs propres cages ou dans des roues (Thompson et al, 2009). Enfin, une exposition prénatale intermittente (15 mg/kg) au MDMA ne modifie pas l'activité locomotrice ni quelque activité verticale des animaux à l'âge adulte par rapport aux animaux témoins (Adori et al, 2010). Ainsi, une exposition prénatale à un psychostimulant n'induirait pas de modification locomotrice de l'animal à l'âge adulte d'après l'ensemble de ces études, et nos résultats sont en accord avec cette hypothèse. Nos résultats ont aussi mis en évidence que les rats exposés en prénatal au MPH étaient moins sensibles aux effets locomoteurs de la cocaïne que les animaux témoins. En effet, 55% des animaux MPH étaient insensibles à la stimulation aiguë à la cocaïne et avaient seulement une réponse locomotrice après une stimulation répétée alors qu'une stimulation aiguë induisait une élévation de l'activité locomotrice chez les animaux témoins comme il l'a déjà été établi à de nombreuses reprises (Christie et Crow, 1971 ; Sahakian et al, 1975 ; Taylor et Ho, 1977 ; Antoniou et Kafetzopoulos, 1996) et une sensibilisation locomotrice après une stimulation répétée (Robinson, 1984 ; Kalivas et Stewart, 1991 ; Badiani et al, 1995 ;

Vanderschuren et Kalivas, 2000). Cette sensibilisation comportementale est une conséquence des changements neuro-adaptatifs dans les circuits impliquant les interconnexions dopaminergiques et glutamatergiques entre la VTA, le Nac, le CPF et l'amygdale (Vanderschuren et Kalivas, 2000). Le NacSh étant impliqué dans les effets locomoteurs de la cocaïne (Filip et Siwanowicz, 2001), l'hyperactivité dopaminergique engendrée par le MPH au sein de cette structure ainsi que la réponse émoussée des neurones post-synaptiques vont rendre les animaux moins sensibles aux effets locomoteurs de la cocaïne. Une étude récente menée chez le rat après une exposition prénatale à la cocaïne (60 mg/kg) du 8^{ème} au 22^{ème} jour de gestation a exploré les réponses au MPH (10 mg/kg) à l'adolescence (Torres-Reveron et al, 2010). Les résultats obtenus sont cohérents avec les nôtres puisqu'une exposition prénatale à la cocaïne n'induit pas de modification d'activité locomotrice par rapport aux animaux témoins et une stimulation aigüe de MPH avant le test provoque une augmentation de la distance parcourue en 15 minutes par les animaux témoins femelles alors qu'aucune modification n'a été retrouvée chez les animaux exposés à la cocaïne en prénatal.

De toute évidence, nos données neurobiologiques et comportementales sont en faveur d'une moindre réponse des animaux exposés en prénatal au MPH vis-à-vis de récompenses naturelles et synthétiques comme il l'avait déjà été présenté dans des études d'exposition au MPH durant l'adolescence (Bolanos et al, 2003 ; Carlezon et al, 2003) mais est contraire avec la récente étude d'exposition prénatale de Lloyd (2013) suggérant une augmentation de motivation des souris pour une solution de 10% de lait concentré dans un test de "5-Choice Serial Reaction Time Task". Cependant, dans cette étude, les animaux exposés en prénatal au MPH ont également affiché une augmentation de latence face à la récompense, ce qui semble paradoxal avec cette conclusion.

VI - Comparaison entre l'exposition prénatale au MPH, à la cocaïne, aux amphétamines et aux antidépresseurs

Le MPH est souvent considéré comme similaire à la cocaïne en terme de mécanisme d'action. Cependant, les résultats observés dans notre étude suggèrent que l'exposition prénatale à la cocaïne et au MPH pourrait mener à des conséquences à long terme distinctes. En effet, une stimulation à la cocaïne chez des animaux exposés en prénatal à ce psychostimulant a été montrée comme augmentant la quantité de DA dans le Nac (Malanga et al, 2009). De plus, cette exposition prénatale va augmenter la sensibilité des animaux vis-à-vis de la cocaïne (Keller et al, 1996 ; Hecht et al, 1998 ; Rocha et al, 2002 ; Crozatier et al, 2003 ; Malanga et al, 2008) en plus d'un comportement de type anxieux chez l'adulte (Sobrian et al, 2003 ; Salas-Ramirez et al, 2010). Malgré le fait que le MPH et la cocaïne bloquent le DAT et le NET, cette dernière bloque également le SERT alors que le MPH a très peu d'affinité pour ce transporteur (Gatley et al, 1996 ; Rothman et Baumann, 2003). Comme la 5-HT joue également un rôle central dans le développement cérébral (Bowker, 1986 ; Whitaker-Azmitia, 1991 ; Rubenstein, 1998 ; Sodhi et Sanders-Bush, 2004), la présence ou non de ce neurotransmetteur dans les mécanismes d'action de la cocaïne ou du MPH pourrait expliquer les différences de conséquences à long terme entre ces deux psychostimulants.

Les amphétamines, elles, vont inhiber la recapture de la 5-HT essentiellement, ainsi que de la DA et la NE (Gough et al, 1991). De nouveau, les résultats observés dans notre étude ainsi que ceux montrés avec une exposition prénatale aux métamphétamines aboutissent à des conséquences à long terme différentes telles que des augmentations de la quantité de DA dans le Nac ainsi que de la sensibilité des animaux vis-à-vis de l'amphétamine (Bubenikova-Valesova et al, 2009 ; Schutová et al, 2009). Une exposition prénatale au MDMA a également montré une élévation de l'activité locomotrice basale des animaux à l'âge adulte ainsi qu'une absence de sensibilité face à des récompenses naturelles et synthétiques (Thompson et al, 2009). Les antidépresseurs, tels que la fluoxétine, la paroxétine et le bupropion, sont majoritairement des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT pour les deux premiers (Tatsumi et al, 1997), de la DA, de la NE (Stahl et al, 2004) et

également de la 5-HT (Warner et Shoaib, 2005) pour le dernier. Une exposition prénatale à un de ces trois antidépresseurs a été montrée comme induisant un comportement de type anxieux chez l'adulte (Coleman et al, 1999 ; Su et al, 2007 ; Olivier et al, 2011). En outre, l'exposition au bupropion a provoqué une élévation de la sensibilité à la cocaïne à long terme des animaux (Hsiao et al, 2005 ; Su et al, 2007). Enfin, une étude récente avec une exposition prénatale à la paroxétine (Van den Hove et al, 2008) a rapporté une augmentation de la mortalité néonatale de dix fois par rapport aux animaux témoins ainsi qu'une diminution du poids des nouveau-nés.

L'ensemble de ces données souligne la spécificité de l'exposition prénatale au MPH.

VII - Influence dopaminergique sur le développement

Le système dopaminergique apparaît tôt durant le développement. En effet, la différenciation des cellules dopaminergiques a lieu entre le 11^{ème} et le 15^{ème} jour de gestation chez le rat (Lauder et Bloom, 1974) et les éléments pré- et post-synaptiques apparaissent au début de la vie embryonnaire (Jung et Bennett, 1996 ; Galineau et al, 2004). Ces données suggèrent un rôle central du système dopaminergique dans le développement cérébral. En fait, il est impliqué dans la prolifération cellulaire et la migration neuronale (Todd, 1992 ; Schmidt et al, 1996 ; Höglinger et al, 2004), le guidage axonal (Jassen et al, 2006) et la différenciation neuronale (Borta et Höglinger, 2007 ; O'Keeffe et al, 2009).

Basée sur l'hypothèse que notre protocole d'exposition prénatale au MPH modifierait principalement le système dopaminergique, notre étude préclinique aide à mieux comprendre les modifications cérébrales à long terme consécutives aux altérations développementales du système dopaminergique, même si les mécanismes d'action induisant ces modifications restent à déterminer.

En effet, à partir de nos résultats d'imagerie, nous avons focalisé notre étude sur le système dopaminergique que nous avons ensuite restreint à l'étude de la

fonctionnalité mésolimbique. Cependant, les études d'imagerie relatives à la réactivité du striatum à la cocaïne suggèrent que les autres voies dopaminergiques devraient aussi être perturbées. De plus, nous ne pouvons cependant pas exclure l'hypothèse d'un effet de ce traitement sur le système norépinéphrinergique et des expériences supplémentaires devraient être menées pour mieux comprendre dans son ensemble les systèmes de neurotransmission qui sont modifiés dans ce modèle.

Compte tenu du rôle développemental de la DA, il serait aussi intéressant de mener des expériences permettant de mieux comprendre comment l'exposition au MPH durant cette période développementale modifie le développement cérébral pour aboutir aux résultats observés dans ce travail. Ceci permettrait de mieux comprendre l'impact d'altérations fonctionnelles du système dopaminergique pendant des périodes précises du développement cérébral sur la mise en place de ce système ou d'autres systèmes de neurotransmission.



CONCLUSION

L'exposition prénatale au MPH induit à long terme des altérations neurobiologiques structurales et fonctionnelles associées au système dopaminergique et à sa réactivité suite à une administration de cocaïne. De plus, ces animaux présentent une modification de la préférence au sucre et de la motivation pour obtenir du sucre alors qu'aucune modification de motivation pour s'auto-administrer de la cocaïne n'a été détectée. Néanmoins, ces animaux montrent tout de même une baisse de sensibilité aux effets locomoteurs de la cocaïne. L'ensemble de ces effets à long terme est récapitulé dans la **Figure 57**.

À notre connaissance, cette étude préclinique est la première à rapporter les modifications neurobiologiques à long terme du système dopaminergique et des altérations comportementales après une exposition prénatale au MPH. Ces données aident à une meilleure compréhension de la façon dont une perturbation transitoire ou prolongée du système dopaminergique pendant le développement cérébral peut avoir un impact significatif sur des fonctions cérébrales cognitives. En outre, cette étude ouvre la voie à d'autres expériences permettant de mettre en lumière les différents mécanismes d'action par lesquels l'exposition prénatale au MPH entraîne ces modifications à long terme. Bien qu'il soit difficile d'extrapoler les résultats obtenus sur le rat à l'homme, nos modèles animaux peuvent servir à orienter les recherches cliniques et à prédire les conséquences à long terme que peuvent produire l'administration de MPH au cours du développement. De plus, ils pourraient nous permettre d'appréhender les mécanismes potentiellement impliqués dans l'apparition de maladies neurodéveloppementales ou neurodégénératives.

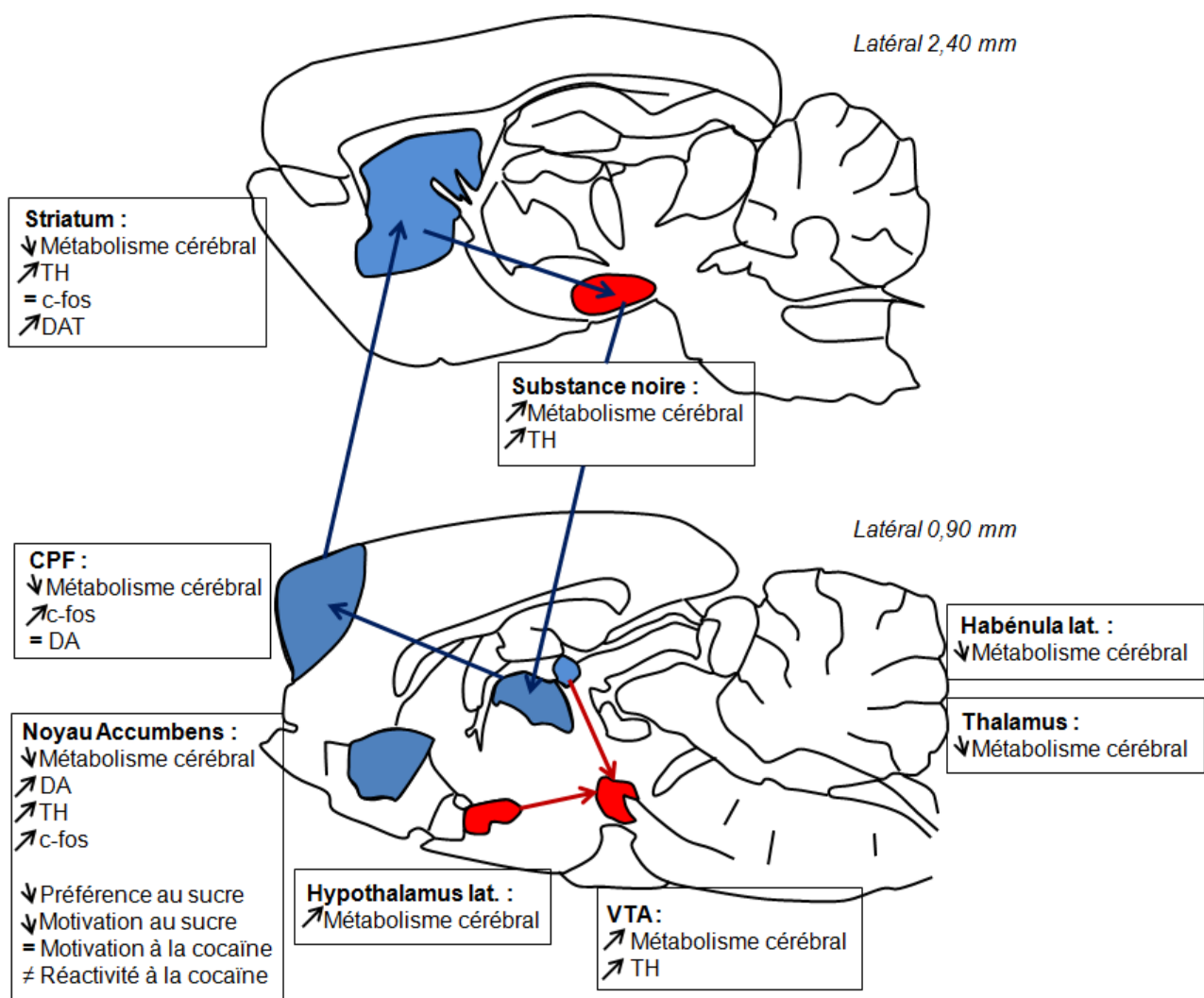
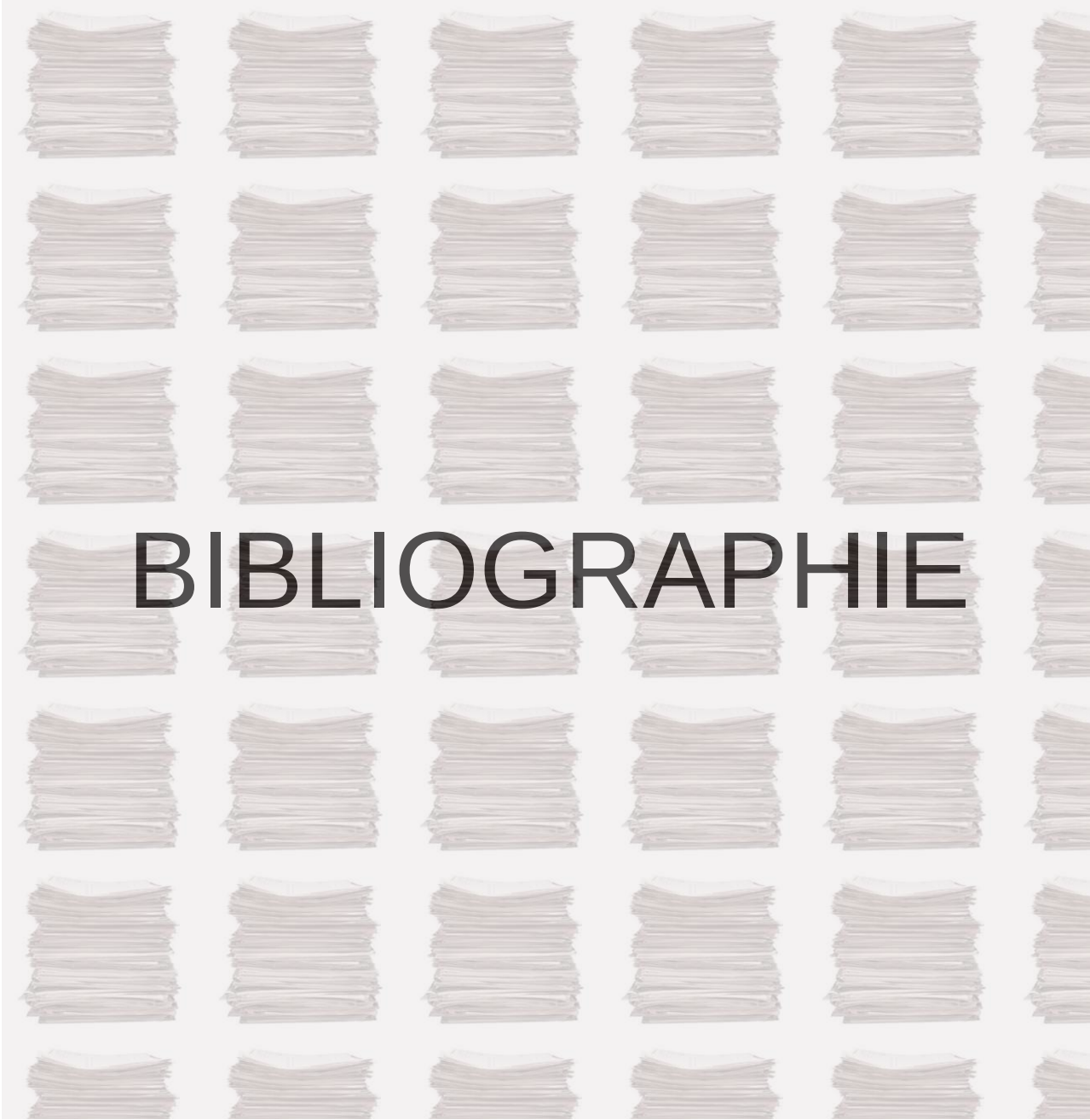


Figure 57 : Effets moléculaires, neurochimiques et comportementaux à long terme de l'exposition prénatale au MPH présentés sur des coupes sagittales de rat. Les flèches bleues représentent l'altération métabolique du réseau cortico-striato-thalamo-cortical et les flèches rouges représentent la modulation positive de l'activité des neurones dopaminergiques.



BIBLIOGRAPHIE

Adler LA, Zimmerman B, Starr HL, Silber S, Palumbo J, Orman C, Spencer T. Efficacy and safety of OROS methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel group, dose-escalation study. *J Clin Psychopharmacol.*, 2009 Jun ; 29(3), 239-47.

Adori C, Zelena D, Tímár J, Gyarmati Z, Domokos A, Sobor M, Fürst Z, Makara G, Bagdy G. Intermittent prenatal MDMA exposure alters physiological but not mood related parameters in adult rat offspring. *Behav Brain Res.*, 2010 Jan 20 ; 206(2), 299-309.

Adriani W, Canese R, Podo F, Laviola G. ¹H MRS-detectable metabolic brain changes and reduced impulsive behavior in adult rats exposed to methylphenidate during adolescence. *Neurotoxicol Teratol.*, 2007 ; 29, 116-25.

Adriani W, Laviola G. Delay aversion but preference for large and rare rewards in two choice tasks: implications for the measurement of self-control parameters. *BMC Neurosci.*, 2006 ; 7, 52.

Adriani W, Laviola G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol.*, 2004 ; 15, 341-52.

Adriani W, Leo D, Greco D, Rea M, di Porzio U, Laviola G, Perrone-Capano C. Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behavior and striatal gene expression. *Neuropsychopharm.*, 2006 ; 31, 1946-56.

Akintomide GS, Rickards H. Narcolepsy: a review. *Neuropsychiatr Dis Treat.*, 2011 ; 7, 507-18.

Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res.*, 1990 ; 85, 119-46.

Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C, Carlezon Jr WA. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci.*, 2002 ; 5, 13-14.

Andrews GD, Lavin A. Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors. *Neuropsychopharm.*, 2006 ; 31, 594-601.

Antoniou K, Kafetzopoulos E. The pattern of locomotor activity after cocaine treatment in the rat. *Behav Pharmacol.*, 1996 May ; 7(3), 237-44.

Aoyama T, Kotaki H, Sawada Y, Iga T. Stereospecific distribution of methylphenidate enantiomers in rat brain: specific binding to dopamine reuptake sites. *Pharm Res.*, 1994 Mar ; 11(3), 407-11.

Arnsten AF, Dudley AG. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: relevance to therapeutic effects in attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct.*, 2005 ; 1, 2.

Arnsten AF. Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biol Psychiatry.*, 2011 Jun 15 ; 69(12), 89-99.

Askenasy EP, Taber KH, Yang PB, Dafny N. Methylphenidate (Ritalin): behavioral studies in the rat. *Int J Neurosci.*, 2007 Jun ; 117(6), 757-94.

Badiani A, Browman KE, Robinson TE. Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. *Brain Res.*, 1995 Mar 20 ; 674(2), 291-8.

Baier CJ, Katunar MR, Adrover E, Pallarés ME, Antonelli MC. Gestational restraint stress and the developing dopaminergic system: an overview. *Neurotox Res.*, 2012 Jul ; 22(1), 16-32.

Banerjee PS, Aston J, Khundakar AA, Zetterstrom TS. Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain derived neurotrophic factor and the immediate-early gene Arc in the juvenile and adult brain. *Eur J Neurosci.*, 2009 ; 29, 465-76.

Barkley RA. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull.*, 1997 ; 121, 65-94.

Barkley RA. Commentary on Blau (1936): mental changes following head trauma in children. *J Atten Disord.*, 2010 Nov ; 14(3), 217-9.

Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Jhou TC. Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J Neurosci.*, 2012 Oct 10 ; 32(41), 14094-101.

Bedard AC, Ickowicz A, Logan GD, Hogg-Johnson S, Schachar R, Tannock R. Selective inhibition in children with attention-deficit hyperactivity disorder off and on stimulant medication. *J Abnorm Child Psychol.*, 2003 Jun ; 31(3), 315-27.

Beeler JA. Thorndike's Law 2.0: Dopamine and the Regulation of Thrift. *Front Neurosci.*, 2012 ; 6, 116.

Beninger RJ, Phillips AG. The effects of pimozide during pairing on the transfer of classical conditioning to an operant discrimination. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1981 ; 14, 101-5.

Benveniste H, Hüttemeier PC. Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol.*, 1990 ; 35(3), 195-215.

Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC. Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry.*, 2006 Nov 15 ; 60(10), 1111-20.

Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.*, 2003 Apr ; 42(1), 33-84.

Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, Newman AH, Javitch JA, Weinstein H, Gether U, Loland CJ. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci.*, 2008 Jul ; 11(7), 780-9.

Beyer CE, Steketee JD. Dopamine depletion in the medial prefrontal cortex induces sensitized-like behavioral and neurochemical responses to cocaine. *Brain Res.*, 1999 Jul 3 ; 833(2), 133-41.

Biederman J, et autres. A Family Study of Patient with Attention Deficit Disorder and Normal Controls. *J Psy Research.*, vol 20, 1986.

Biederman J, Spencer T. Methylphenidate in treatment of adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord.*, 2002 ; 6 Suppl 1, 101-7.

Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a lifespan perspective. *J Clin Psychiatry.*, 1998 ; 59, 4-16.

Bogle KE, Smith BH. Illicit methylphenidate use: a review of prevalence, availability, pharmacology, and consequences. *Curr Drug Abuse Rev.*, 2009 ; 2, 157-76.

Bolanos CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry.*, 2003 ; 54, 1317-29.

Bolanos CA, Glatt SJ, Jackson D. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. *Brain Res.*, 1998 ; 111, 25-33.

Bolea-Alamanac BM, Green A, Verma G, Maxwell P, Davies SJ. Methylphenidate use in pregnancy and lactation, a systematic review of evidence. *BR J Clin Pharmacol.*, 2013 Apr 18.

Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron.*, 2006 ; 49, 589-601.

Borta A, Höglinger GU. Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem.*, 2007 ; 100, 587-95.

Bouffard R, Hechtman L, Minde K, Iaconi-Kassab F. The efficacy of 2 different dosages of methylphenidate in treating adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry.*, 2003 Sep ; 48(8), 546-54.

Bowker RM. Intrinsic 5HT-immunoreactive neurons in the spinal cord of the fetal non-human primate. *Brain Res.*, 1986 Jul ; 393(1), 137-43.

Brandon CL, Marinelli M, Baker LK, White FJ. Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. *Neuropsychopharm.*, 2001 ; 25, 651-61.

Brandon CL, Marinelli M, White FJ. Adolescent exposure to methylphenidate alters activity of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry.*, 2003 ; 54, 1338-44.

Brandon CL, Steiner H. Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur J Neurosci.*, 2003 18, 1584-92.

Breiter HC, Gollub RL, Weisskoff RM, Kennedy DN, Makris N, Berke JD, Goodman JM, Kantor HL, Gastfriend DR, Riorden JP, Mathew RT, Rosen BR, Hyman SE. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron.*, 1997 Sep ; 19(3), 591-611.

Brown EE, Robertson GS, Fibiger HC. Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. *J Neurosci.*, 1992 Oct ; 12(10), 4112-21.

Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. Cocaine-induced increases in vesicular dopamine uptake: role of dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2001 Sep ; 298(3), 1150-3.

Browne RG, Segal DS. Metabolic and experimental factors in the behavioral response to repeated amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1977 ; 5, 545-52.

Bubenikova-Valesova V, Kacer P, Syslova K, Rambousek L, Janovsky M, Schutova B, Hrubá L, Slamberova R. Prenatal methamphetamine exposure affects the mesolimbic dopaminergic system and behavior in adult offspring. *Int J Dev Neurosci.*, 2009 Oct ; 27(6), 525-30.

Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Kooij JJ, Niemelä A, Konofal E, Dejonckheere J, Challis BH, Medori R. Safety and tolerability of flexible dosages of prolonged-release OROS methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.*, 2009 ; 5, 457-66.

Bush G, Luu P, Posner MI. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci.*, 2000 ; vol4, n6.

Bush G. Attention-deficit/hyperactivity disorder and attention networks. *Neuropsychopharm.*, 2010 Jan ; 35(1), 278-300.

Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharm.*, 2002 ; 27, 699-711.

Canales JJ. Stimulant-induced adaptations in neostriatal matrix and striosome systems: transiting from instrumental responding to habitual behavior in drug addiction. *Neurobiol Learn Mem.*, 2005 ; 83, 93-103.

Canese R, Adriani W, Marco EM, De Pasquale F, Lorenzini P, De Luca N, Fabi F, Podo F, Laviola G. Peculiar response to methylphenidate in adolescent compared to adult rats: a pHMRI study. *Psychopharmacology (Berl).*, 2009 Mar ; 203(1), 143-53.

Carlezon Jr WA, Mague SD, Andersen SL. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry.*, 2003 ; 54, 1330-7.

Challman TD, Lipsky JJ. Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin Proc.*, 2000 Jul ; 75(7), 711-21.

Chambers RA, Potenza MN. Neurodevelopment, impulsivity, and adolescent gambling (co-sponsored by National Council on Problem Gambling and Institute for the Study of Gambling and Commercial Gaming). *J Gambl Stud.*, 2003 ; 19, 53-84.

Chan YP, Swanson JM, Soldin SS, Thiessen JJ, Macleod SM, Logan W. Methylphenidate hydrochloride given with or before breakfast: II. Effects on plasma concentration of methylphenidate and ritalinic acid. *Pediat.*, 1983 Jul ; 72(1), 56-9.

Chase T, Carrey N, Soo E, Wilkinson M. Methylphenidate regulates activity regulated cytoskeletal associated but not brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing rat striatum. *Neurosci.*, 2007 Feb 9 ; 144(3), 969-84.

Chase TD, Brown RE, Carrey N, Wilkinson M. Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *Neuroreport.*, 2003 Apr 15 ; 14(5), 769-72.

Chauvet C, Lardeux V, Goldberg SR, Jaber M, Solinas M. Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharm.*, 2009 Dec ; 34(13), 2767-78.

Chechik G, Meilijson I, Ruppin E. Neuronal regulation: a mechanism for synaptic pruning during brain maturation. *Neural Comput.*, 1999 ; 11, 2061-80.

Chiarello RJ, Cole JO. The use of psychostimulants in general psychiatry. A reconsideration. *Arch Gen Psychiatry.*, 1987 Mar ; 44(3), 286-95.

Chong SL, Claussen CM, Dafny N. Nucleus accumbens neuronal activity in freely behaving rats is modulated following acute and chronic methylphenidate administration. *Brain Res Bull.*, 2012 Mar 10 ; 87(4-5), 445-56.

Christie JE, Crow TJ. Possible role of dopamine-containing neurones in the behavioural effects of cocaine. *Br J Pharmacol.*, 1971 Aug ; 42(4), 643-5.

Claussen C, Dafny N. Acute and chronic methylphenidate modulates the neuronal activity of the caudate nucleus recorded from freely behaving rats. *Brain Res Bull.*, 2012 Mar 10 ; 87(4-5), 387-96.

Coleman FH, Christensen HD, Gonzalez CL, Rayburn WF. Behavioral changes in developing mice after prenatal exposure to paroxetine (Paxil). *Am J Obstet Gynecol.*, 1999 Nov ; 181(5 Pt 1), 1166-71.

Corrigall WA, Coen KM. Opiate antagonists reduce cocaine but not nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl.)*, 1991 ; 104(2), 167-70.

Cotterly L, Beverley JA, Yano M, Steiner H. Dysregulation of gene induction in corticostriatal circuits after repeated methylphenidate treatment in adolescent rats: differential effects on zif 268 and homer 1a. *Eur J Neurosci.*, 2007 Jun ; 25(12), 3617-28.

Crawford CA, McDougall SA, Meier TL, Collins RL, Watson JB. Repeated methylphenidate treatment induces behavioral sensitization and decreases protein kinase A and dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in the dorsal striatum. *Psychopharmacology (Berl.)*, 1998 ; 136, 34-43.

Crozatier C, Guerriero RM, Mathieu F, Giros B, Nosten-Bertrand M, Kosofsky BE. Altered cocaine-induced behavioral sensitization in adult mice exposed to cocaine in utero. *Brain Res Dev Brain Res.*, 2003 Dec 30 ; 147(1-2), 97-105.

Debooy VD, Seshia MM, Tenenbein M, Casiro OG. Intravenous pentazocine and methylphenidate abuse during pregnancy. Maternal lifestyle and infant outcome. *Am J Dis Child.*, 1993 ; 147(10), 1062-5.

Denhoff E, Laufer MW, Solomons G. Hyperkinetic impulse disorder in children's behavior problems. *Psychosom Med.*, 1957 Jan-Feb ; 19(1), 38-49.

Deroche V, Le Moal M, Piazza PV. Cocaine self-administration increases the incentive motivational properties of the drug in rats. *Eur J Neurosci.*, 1999 Aug ; 11(8), 2731-6.

Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res.*, 2002 ; 137, 75-114.

Dickinson A, Smith J, Mirenowicz J. Dissociation of pavlovian and instrumental incentive learning under dopamine antagonists. *Behav Neurosci.*, 2000 ; 114, 468-83.

Dideriksen D, Pottegård A, Hallas J, Aagaard L, Damkier P. First trimester in utero exposure to methylphenidate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 2013 Feb ; 112(2), 73-6.

Ding YS, Fowler JS, Volkow ND, Dewey SL, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ, Pappas N. Chiral drugs: comparison of the pharmacokinetics of [11C]d-threo and L-threo-methylphenidate in the human and baboon brain. *Psychopharmacology (Berl.)*, 1997 May ; 131(1), 71-8.

Dixon AL, Prior M, Morris PM, Shah YB, Joseph MH, Young AM. Dopamine antagonist modulation of amphetamine response as detected using pharmacological MRI. *Neuropharm.*, 2005 Feb ; 48(2), 236-45.

Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ. Dopamine transporter, density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.*, 1999 ; 354, 2132-3.

Douglas VI. Stop, look, and listen : The problem of sustained attention and impulse control in hyperactive and normal children. *Canadian J Behav Science.*, 1972 ; 4, 259-82.

Easton N, Shah YB, Marshall FH, Fone KC, Marsden CA. Guanfacine produces differential effects in frontal cortex compared with striatum: assessed by phMRI BOLD contrast. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2006 Dec ; 189(3), 369-85.

Eckerman DA, Moy SS, Perkins AN, Patrick KS, Breese GR. Enantioselective behavioral effects of threo-methylphenidate in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1991 Dec ; 40(4), 875-80.

Eckermann K, Beasley A, Yang P, Gaytan O, Swann A. Methylphenidate sensitization is modulated by Valproate. *Life Sci.*, 2001 ; 69, 47-57.

Economidou D, Theobald DE, Robbins TW, Everitt BJ, Dalley JW. Norepinephrine and dopamine modulate impulsivity on the five-choice serial reaction time task through opponent actions in the shell and core sub-regions of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharm.*, 2012 Aug ; 37(9), 2057-66.

Elfers CT and Roth CL. Effects of Methylphenidate on Weight Gain and Food Intake in Hypothalamic Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).*, 2011 ; 2, 78.

Engert V, Pruessner JC. Dopaminergic and noradrenergic contributions to functionality in ADHD: the role of methylphenidate. *Curr Neuropsychopharmacol.*, 2008 Dec ; 6(4), 322-8.

Evenden JL. Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl.)*, 1999 ; 146, 348-61.

Faraj BA, Israili ZH, Perel JM, Jenkins ML, Holtzman SG, Cucinell SA. Metabolism and disposition of methylphenidate-14C: studies in man and animals. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1974 ; 191, 535-47.

Faraone SV, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Seidman LJ, Mick E, Doyle AE. Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: an overview. *Biol Psychiatry.*, 2000 ; 48, 9-20.

Faraone SV, Lecendreux M, Konofal E. Growth Dysregulation and ADHD: An Epidemiologic Study of Children in France. *J Att Disorders.*, 2012 Oct ; 16(7), 572-8.

Filip M, Siwanowicz J. Implication of the nucleus accumbens shell, but not core, in the acute and sensitizing effects of cocaine in rats. *Pol J Pharmacol.*, 2001 Sep-Oct ; 53(5), 459-66.

Fone KC, Nutt DJ. Stimulants: use and abuse in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *Curr Opin Pharmacol.*, 2005 Feb ; 5(1), 87-93.

Fortinguerra F, Clavenna A, Bonati M. Psychotropic drug use during breastfeeding: a review of the evidence. *Pediatr.*, 2009 Oct ; 124(4), 547-56.

Frank ST, Krumm B, Spanagel R. Cocaine-induced dopamine overflow within the nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis: a meta-analysis. *Synap.*, 2008 ; 62, 243-52.

Freeman KB, Kearns DN, Kohut SJ, Riley AL. Strain differences in patterns of drug-intake during prolonged access to cocaine self-administration. *Behav Neurosci.*, 2009 Feb ; 123(1), 156-64.

Froimowitz M, Patrick KS, Cody V. Conformational analysis of methylphenidate and its structural relationship to other dopamine reuptake blockers such as CFT. *Pharm Res.*, 1995 Oct ; 12(10), 1430-4.

Gadow KD, Sverd J, Nolan EE, Sprafkin J, Schneider J. Immediate-release methylphenidate for ADHD in children with comorbid chronic multiple tic disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 2007 Jul ; 46(7), 840-8.

Galineau L, Kudas E, Guilloteau D, Vilar MP, Chalon S. Ontogeny of the dopamine and serotonin transporters in the rat brain: an autoradiographic study. *Neurosci Lett.*, 2004 ; 363, 266-71.

Gatley SJ, Pan DF, Chen RY, Chaturvedi G, Ding YS. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life Sci.*, 1996 ; 95, 231-9.

Gaytan O, Ghelani D, Martin S, Swann A, Dafny N. Dose response characteristics of methylphenidate on different indices of rats' locomotor activity at the beginning of the dark cycle. *Brain Res.*, 1996 Jul 15 ; 727(1-2), 13-21.

Gaytan O, Ghelani D, Martin S, Swann A, Dafny N. Methylphenidate: diurnal effects on locomotor and stereotypic behavior in the rat. *Brain Res.*, 1997 Nov 28 ; 777(1-2), 1-12.

Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Gifford A, Gatley SJ, Marsteller D, Molina PE, Dewey SL. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2000 ; 295, 51-7.

Gioanni Y, Pirot S. Physiopathologie de la schizophrénie : les hypothèses neurofonctionnelles de Anthony A. Grace. *Neuropsych.*, 2009 ; 36, 35-68.

Gobert A, Rivet JM, Audinot V. Simultaneous quantification of serotonin, dopamine and noradrenaline levels in single frontal cortex dialysates of freely-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control of release. *Neurosci.*, 1998 ; 84, 413-29.

Golub M, Costa L, Crofton K, Frank D, Fried P, Gladen P. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of methylphenidate. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.*, 2005 ; 74(4), 300-81.

Gough B, Ali SF, Slikker W Jr, Holson RR. Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1991 Jul ; 39(3), 619-23.

Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neurosci.*, 1991 ; 41(1), 1-24.

Gray RW, Cooper SJ. d-fenfluramine's effects on normal ingestion assessed with taste reactivity measures. *Physiol Behav.*, 1996 Jun ; 59(6), 1129-35.

Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1990 Sep ; 87(17), 6912-6.

Greenhill L, Kollins S, Abikoff H, McCracken J, Riddle M, Swanson J, McGough J, Wigal S, Wigal T, Vitiello B, Skrobala A, Posner K, Ghuman J, Cunningham C, Davies M, Chuang S, Cooper T. Efficacy and safety of immediate-release methylphenidate treatment for preschoolers with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 2006 Nov ; 45(11), 1284-93.

Greenhill L, Pliszka S, Dulcan MK, Bernet W, Arnold V, Beitchman J. Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. *J Am Acad Child Adolesc Psych.*, 2002 ; 41, 26-49.

Gresch PJ, Sved AF, Zigmond MJ. Local influence of endogenous norepinephrine on extracellular dopamine in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem.*, 1995 ; 65, 111-6.

Gross-Tsur V, Manor O, van der Meere J, Joseph A, Shalev RS. Epilepsy and attention deficit hyperactivity disorder: is methylphenidate safe and effective? *J Pediatr.*, 1997 Apr ; 130(4), 670-4.

Hackett PL, Ilett KF, Kristensen JH, Kohan R, Hale TW. Infant dose and safety of breastfeeding for dexamphetamine and methylphenidate in mothers with Attention Deficit Hyperactivity Disorders. *T Drug Monitoring.*, 2005 ; 27, 220-1.

Hajnal A, Norgren R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res.*, 2001 Jun 15 ; 904(1), 76-84.

Han DD, Gu HH. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol.*, 2006 ; 6(6), 776-84.

Hanwella R, Senanayake M, de Silva V. Comparative efficacy and acceptability of methylphenidate and atomoxetine in treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: a meta-analysis. *BMC Psychiatry.*, 2011 Nov 10 ; 11, 176.

Harro J, Tönissaar M, Eller M, Kask A, Oreland L. Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. *Brain Res.*, 2001 Apr 27 ; 899(1-2), 227-39.

Harvey RC, Sen S, Deaciuc A, Dwoskin LP, Kantak KM. Methylphenidate treatment in adolescent rats with an attention deficit/hyperactivity disorder phenotype: cocaine addiction vulnerability and dopamine transporter function. *Neuropsychopharm.*, 2001 ; 36, 837-47.

Hawken CM, Brown RE, Carrey N, Wilkinson M. Long-term methylphenidate treatment down-regulates c-fos in the striatum of male CD-1 mice. *Neuroreport.*, 2004 Apr 29 ; 15(6), 1045-8.

Hecht GS, Spear NE, Spear LP. Alterations in the reinforcing efficacy of cocaine in adult rats following prenatal exposure to cocaine. *Behav Neurosci.*, 1998 Apr ; 112(2), 410-8.

Hedou G, Feldon J, Heidbreder CA. Effects of cocaine on dopamine in subregions of the rat prefrontal cortex and their efferents to subterritories of the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.*, 1999 May 14 ; 372(2), 143-55.

Heinonen OP, Slone D, Shapiro S. Littleton, Mass: Pub Sc Group., 1977.

Herman L, Shtayermman O, Aksnes B, Anzalone M, Cormerais A, Liodice C. The use of prescription stimulants to enhance academic performance among college students in health care programs. *J Physician Assist Educ.*, 2011 ; 22(4), 15-22.

Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol.*, 1996 Oct ; 50(2-3), 83-107.

Hewitt KN, Shah YB, Prior MJ, Morris PG, Hollis CP, Fone KC, Marsden CA. Behavioural and pharmacological magnetic resonance imaging assessment of the effects of methylphenidate in a potential new rat model of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2005 Aug ; 180(4), 716-23.

Hirai N, Nishino S. Recent advances in the treatment of narcolepsy. *Curr Treat Options Neurol.*, 2011 Oct ; 13(5), 437-57.

Hiroi N, Martín AB, Grande C, Alberti I, Rivera A, Moratalla R. Molecular dissection of dopamine receptor signaling. *J Chem Neuroanat.*, 2002 May ; 23(4), 237-42.

Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci.*, 2004 ; 7, 726-35.

Horn AS. Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Prog Neurobiol.*, 1990 ; 34(5), 387-400.

Hsiao SY, Cherng CF, Yang YK, Yeh TL, Yu L. Prenatal bupropion exposure enhances the cocaine reward and stress susceptibility in adult mice. *Chin J Physiol.*, 2005 Dec 31 ; 48(4), 223-9.

Humphreys C, Garcia-Bournissen F, Ito S, Koren G. Exposure to attention deficit hyperactivity disorder medications during pregnancy. *Can Fam Physician.*, 2007 Jul ; 53(7), 1153-5.

Hurd YL, Ungerstedt U. Cocaine: an in vivo microdialysis evaluation of its acute action on dopamine transmission in rat striatum. *Synap.*, 1989 ; 3(1), 48-54.

Hutchings DE, Fico TA, Dow-Edwards DL. Prenatal cocaine: maternal toxicity, fetal effects and locomotor activity in rat offspring. *Neurotoxicol Teratol.*, 1989 Jan-Feb ; 11(1), 65-9.

Jassen AK, Yang H, Miller GM, Calder E, Madras BK. Receptor regulation of gene expression of axon guidance molecules: implications for adaptation. *Mol Pharmacol.*, 2006 ; 70, 71-7.

Jung AB, Bennett JP. Development of striatal dopaminergic function. I. Pre- and postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D1 (D1a) and D2 (D2a) receptors. *Brain Res Dev Brain Res.*, 1996 ; 94, 109-20.

Kalivas PW and Stewart J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev.*, 1991 ; 16, 223-44.

Kallman W M, Isaac W. The effects of age and illumination on the dose-response curves for three stimulants. *Psychopharmacol.*,1975 ; 40, 313-8.

Kankaanpaa A, Meririnne E, Seppala T. 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 attenuates cocaine- and mazindol-, but not methylphenidate-induced neurochemical and behavioral effects in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2000 ; 159, 341-50.

Kappeler T. Méthylphénidate: bases pour la pharmacie. *PharmaJournal.*, mai 2007 ; 10.

Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol.*, 1995 Jul 1 ; 5(7), 747-57.

Keller RW Jr, LeFevre R, Raucci J, Carlson JN, Glick SD. Enhanced cocaine self-administration in adult rats prenatally exposed to cocaine. *Neurosci Lett.*, 1996 Mar 1 ; 205(3), 153-6.

Khalid M, Aoun RA, Mathews TA. Altered striatal dopamine release following a sub-acute exposure to manganese. *J Neurosci Methods.*, 2011 Nov 15 ; 202(2), 182-91.

Kim CH, Hahn MK, Joung Y. A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006 ; 103, 19164-9.

Klassen A, Miller A, Fine S. Comment on "Improvement in health-related quality of life in children with ADHD: An analysis of placebo controlled studies of atomoxetine". *J Dev Behav Pediatr.*, 2004 Dec ; 25(6), 445.

Klein-Schwartz W, McGrath J. Poison center's experience with methylphenidate abuse in pre-teens and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psych.*, 2003 ; 42, 288-94.

Knobel M. Hyperkinesis and organicity in children. *Arch Gen Psychiatry.*, 1959 ; 1, 310-21.

Koda K, Ago Y, Cong Y, Kita Y, Takuma K, Matsuda T. Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. *J Neurochem.*, 2010 Jul ; 114(1), 259-70.

Koehl M, Lemaire V, Vallée M, Abrous N, Piazza PV, Mayo W, Maccari S, Le Moal M. Long term neurodevelopmental and behavioral effects of perinatal life events in rats. *Neurotox Res.*, 2001 Jan ; 3(1), 65-83.

Koob GF, Nestler EJ. The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 1997 Summer ; 9(3), 482-97.

Kooij JJ, Burger H, Boonstra AM, Van der Linden PD, Kalma LE, Buitelaar JK. Efficacy and safety of methylphenidate in 45 adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. A randomized placebo-controlled double-blind cross-over trial. *Psychol Med.*, 2004 Aug ; 34(6), 973-82.

Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci.*, 2003 ; 23, 7-11.

Kötter R, Stephan KE. Useless or helpful? The "limbic system" concept. *Rev Neurosci.*, 1997 Apr-Jun ; 8(2), 139-45.

Kratochvil CJ, Heiligenstein JH, Dittmann R. Atomoxetine and methylphenidate treatment in children with ADHD: a prospective, randomized, open-label trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 2002 ; 41(7), 776-84.

Kuczenski R, Segal DS. Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. *J Neurosci.*, 1989 ; 9, 2051-86.

Kuczenski R, Segal DS. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem.*, 1997 ; 68, 2032-7.

Kuczenski R, Segal DS. Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2001 ; 296, 876-83.

Kufahl PR, Zavala AR, Singh A, Thiel KJ, Dickey ED, Joyce JN, Neisewander JL. c-Fos expression associated with reinstatement of cocaine-seeking behavior by response-contingent conditioned cues. *Synapse.*, 2009 Oct ; 63(10), 823-35.

Lau CE, Imam A, Ma F, Falk JL. Acute effects of cocaine on spontaneous and discriminative motor functions: relation to route of administration and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1991 Apr ; 257(1), 444-56.

Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol.*, 1974 ; 155, 469-81.

Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci. Biobehav Rev.*, 2003 ; 27, 19-31.

Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis R, Spear LP. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1995 ; 275, 345-57.

Lecendreux M, Cortese S. Sleep problems associated with ADHD: a review of current therapeutic options and recommendations for the future. *Expert Rev Neurother.*, 2007 Dec ; 7(12), 1799-806.

Leddy JJ, Waxmonsky JG, Salis RJ, Paluch RA, Gnagy EM, Mahaney P, Erbe R, Pelham WE, Epstein LH. Dopamine-related genotypes and the dose-response effect of methylphenidate on eating in attention-deficit/hyperactivity disorder youths. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*, 2009 Apr ; 19(2), 127-36.

Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.*, 1997 Jun ; 20(6), 269-74. Review.

Lloyd SA, Oltean C, Pass H, Phillips B, Staton K, Robertson CL, Shanks RA. Prenatal exposure to psychostimulants increases impulsivity, compulsivity, and motivation for rewards in adult mice. *Physiol Behav.*, 2013 Jun 2 ; 119C, 43-51.

London ED, Cascella NG, Wong DF, Phillips RL, Dannals RF, Links JM, Herning R, Grayson R, Jaffe JH, Wagner HN Jr. Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch Gen Psychiatry.*, 1990 Jun ; 47(6), 567-74.

Lyons D, Friedman DP, Nader MA, Porrino LJ. Cocaine alters cerebral metabolism within the ventral striatum and limbic cortex of monkeys. *J Neurosci.*, 1996 Feb 1 ; 16(3), 1230-8.

Madras BK, Miller GM, Fischman AJ. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.*, 2005 ; 57, 1397-409.

Malanga CJ, Ren JQ, Guerriero RM, Kosofsky BE. Augmentation of cocaine-sensitized dopamine release in the nucleus accumbens of adult mice following prenatal cocaine exposure. *Dev Neurosci.*, 2009 ; 31(1-2), 76-89.

Malanga CJ, Riday TT, Carlezon WA Jr, Kosofsky BE. Prenatal exposure to cocaine increases the rewarding potency of cocaine and selective dopaminergic agonists in adult mice. *Biol Psychiatry.*, 2008 Jan 15 ; 63(2), 214-21.

Marco EM, Adriani W, Ruocco LA, Canese R, Sadile AG, Laviola G. Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: the issue of early adolescent exposure. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2011 Aug ; 35(8), 1722-39.

Mark GP, Blander DS, Hoebel BG. A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res.*, 1991 ; 551, 308-10.

Markowitz JS, DeVane CL, Pestreich LK, Patrick KS, Muniz R. A comprehensive in vitro screening of d-, l-, and dl-threo- methylphenidate: an exploratory study. *J Child Adolesc Psycho- pharmacol.*, 2006 ; 16, 687-98.

Markowitz JS, Logan BK, Diamond F, Patrick KS. Detection of the novel metabolite ethylphenidate after methylphenidate overdose with alcohol coingestion. *J Clin Psychopharmacol.*, 1999 Aug ; 19(4), 362-6.

Matsumoto M, Hikosaka O. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature.*, 2007 ; 447, 1111-5.

Mattos P, Louzã MR, Palmini AL, Oliveira IR, Rocha FL. A Multicenter, Open-Label Trial to Evaluate the Quality of Life in Adults With ADHD Treated With Long-Acting Methylphenidate (OROS MPH): Concerta Quality of Life (CONQoL) Study. *J Atten Disord.*, 2013 Jul ; 17(5), 444-8.

Mattson BJ, Koya E, Simmons DE, Mitchell TB, Berkow A, Crombag HS, Hope BT. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.*, 2008 Jan ; 27(1), 202-12.

Mayes SD, Calhoun SL, Crowell EW. Learning disabilities and ADHD: overlapping spectrum disorders. *J Learn Disabil.*, 2000 Sep-Oct ; 33(5), 417-24.

McFadyen-Leussis MP, Lewis SP, Bond TL, Carrey N, Brown RE. Prenatal exposure to methylphenidate hydrochloride decreases anxiety and increases exploration in mice. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2004 Mar ; 77(3), 491-500.

McNamara CG, Davidson ES, Schenk S. A comparison of the motor-activating effects of acute and chronic exposure to amphetamine and methylphenidate. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1993 Jul ; 45(3), 729-32.

Medori R, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Kooij JJ, Niemelä A, Trott GE, Lee E, Buitelaar JK. A randomized, placebo-controlled trial of three fixed dosages of prolonged-release OROS methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.*, 2008 May 15 ; 63(10), 981-9.

Mehta MA, Goodyer IM, Sahakian BJ. Methylphenidate improves working memory and set-shifting in AD/HD: relationships to baseline memory capacity. *J Child Psychol Psychiatry.*, 2004 Feb ; 45(2), 293-305.

Mick E, Neale B, Middleton FA, McGough JJ, Faraone SV. Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*, 2008 Dec 5 ; 147B(8), 1412-8.

Millichap JG, Aymat F, Sturgis LH, Larsen KW, Egan RA. Hyperkinetic behavior and learning disorders. 3. Battery of neuropsychological tests in controlled trial of methylphenidate. *Am J Dis Child.*, 1968 Sep ; 116(3), 235-44.

Millichap JG. Drugs in management of minimal brain dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.*, 1973 Feb 28 ; 205, 321-34.

Moghaddam B, Bunney BS. Differential effect of cocaine on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens: comparison to amphetamine. *Synapse.*, 1989 ; 4(2), 156-61.

Moll GH, Hause S, Rütger E, Rothenberger A, Huether G. Early methylphenidate administration to young rats causes a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*, 2001 ; 11, 15-24.

Morris SM, Petibone DM, Lin WJ, Chen JJ, Vitiello B, Witt KL, Mattison DR. The genetic toxicity of methylphenidate: a review of the current literature. *J Appl Toxicol.*, 2012 Oct ; 32(10), 756-64.

Muniz R, Brams M, Mao A, McCague K, Pestreich L, Silva R. Efficacy and safety of extended-release dexamethylphenidate compared with d,l-methylphenidate and placebo in the treatment of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a 12-hour laboratory classroom study. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*, 2008 Jun ; 18(3), 248-56.

Murphy KR, Barkley RA. Parents of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: psychological and attentional impairment. *Am J Orthopsychiatry.*, 1996 Jan ; 66(1), 93-102.

Nayak PK, Misra AL, Mulé SJ. Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1976 ; 196, 556-69.

Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet.*, 2000 Jan 1 ; 355(9197), 39-40.

Noori HR, Spanagel R, Hansson AC. Neurocircuitry for modeling drug effects. *Addict Biol.*, 2012 Sep ; 17(5), 827-64.

O'Hearn E, Molliver ME. Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study. *Brain Res Bull.*, 1984 Dec ; 13(6), 709-26.

Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci.*, 2003 ; 23, 2840-50.

O'Keeffe GC, Barker RA, Caldwell MA. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *C Cycle.*, 2009 ; 8, 2888-94.

Olivier JD, Vallès A, van Heesch F, Afrasiab-Middelmann A, Roelofs JJ, Jonkers M, Peeters EJ, Korte-Bouws GA, Dederen JP, Kiliaan AJ, Martens GJ, Schubert D, Homberg JR. Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2011 Oct ; 217(3), 419-32.

Olson L, Boréus LO, Seiger A. Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine- and catecholamine-containing neuron systems in the human fetal brain. *Z Anat Entwicklungsgesch.*, 1973 Apr 16 ; 139(3), 259-82.

Ostlund SB, Wassum KM, Murphy NP, Balleine BW, Maidment NT. Extracellular dopamine levels in striatal subregions track shifts in motivation and response cost during instrumental conditioning. *J Neurosci.*, 2011 Jan 5 ; 31(1), 200-7.

Parran TV Jr, Jasinski DR. Intravenous methylphenidate abuse. Prototype for prescription drug abuse. *Arch Intern Med.*, 1991 Apr ; 151(4), 781-3.

Patrick KS, Caldwell RW, Ferris RM, Breese GR. Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1987 Apr ; 241(1), 152-8.

Pelham WE, Gnagy EM, Burrows-Maclean L, Williams A, Fabiano GA, Morrisey SM, Chronis AM, Forehand GL, Nguyen CA, Hoffman MT, Lock TM, Fielbelkorn K, Coles EK, Panahon CJ, Steiner RL, Meichenbaum DL, Onyango AN, Morse GD. Once-a-day Concerta methylphenidate versus three-times-daily methylphenidate in laboratory and natural settings. *Pediat.*, 2001 Jun ; 107(6), 105.

Penner MR, McFadyen MP, Pinaud R, Carrey N, Robertson HA, Brown RE. Age-related distribution of c-fos expression in the striatum of CD-1 mice after acute methylphenidate administration. *Brain Res Dev Brain Res.*, 2002 Apr 30 ; 135(1-2), 71-7.

Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol.*, 1979 ; 6, 371-88.

Polanczyc G, De Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry.*, 2007 ; 164, 942-8.

Prieto-Gómez B, Vázquez-Alvarez AM, Martínez-Peña JL, Reyes-Vázquez C, Yang PB, Dafny N. Methylphenidate and amphetamine modulate differently the NMDA and AMPA glutamatergic transmission of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Life Sci.*, 2005 Jun 24 ; 77(6), 635-49.

Proposed Revision - APA DSM-5 - 314.0x Attention Deficit/Hyperactivity Disorder sur Association Américaine de Psychiatrie, 20 mai 2010.

Quinn D. Does chirality matter? pharmacodynamics of enantiomers of methylphenidate in patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol.*, 2008 Jun ; 28(3 Suppl 2), 62-6.

Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.*, 2000 ; 3, 511-33.

Richardson NR, Roberts DC. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods.*, 1996 May ; 66(1), 1-11.

Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev.*, 1993 ; 18, 247-91.

Robinson TE. Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats, *Psychopharmacol.*, 1984 ; 84, 466-75.

Robison LM, Skaer TL, Sclar DA, Galin RS. Is attention deficit hyperactivity disorder increasing among girls in the US? Trends in diagnosis and the prescribing of stimulants. *CNS Drugs.*, 2002 ; 16, 129-37.

Rocha BA, Mead AN, Kosofsky BE. Increased vulnerability to self-administer cocaine in mice prenatally exposed to cocaine. *Psychopharmacology (Berl).*, 2002 Sep ; 163(2), 221-9.

Rosa-Neto P, Lou HC, Cumming P. Methylphenidate-evoked changes in striatal dopamine correlate with inattention and impulsivity in adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Neuroim.*, 2005 ; 25, 868-76.

Rosenfeld AA. Depression and psychotic regression following prolonged methylphenidate use and withdrawal: case report. *Am J Psychiatry.*, 1979 Feb ; 136(2), 226-8.

Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol.*, 2003 Oct 31 ; 479(1-3), 23-40.

Rubenstein JL. Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol Psychiatry.*, 1998 Aug 1 ; 44(3), 145-50.

Rubins DJ, Melega WP, Lacan G, Way B, Plenevaux A, Luxen A, Cherry SR. Development and evaluation of an automated atlas-based image analysis method for microPET studies of the rat brain. *Neuroim.*, 2003 ; 25, 2100-18.

Rushworth MF, Walton ME, Kennerley SW, Bannerman DM. Action sets and decisions in the medial frontal cortex. *Trends Cogn Sci.*, 2004 ; 8, 410-7.

Sadasivan S, Pond BB, Pani AK, Qu C, Jiao Y, Smeyne RJ. Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. *PL One.*, 2012 ; 7(3), e33693.

Safren SA, Otto MW, Sprich S, Winett CL, Wilens TE, Biederman J. Cognitive-behavioral therapy for ADHD in medication-treated adults with continued symptoms. *Behav Res Ther.*, 2005 Jul ; 43(7), 831-42.

Sagvolden T, Johansen EB, Aase H, Russell VA. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci.*, 2005 ; 28, 397-419.

Sahakian BJ, Robbins TW, Morgan MJ, Iversen SD. The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. *Brain Res.*, 1975 Feb 7 ; 84(2), 195-205.

Salamone JD, Correa M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron.*, 2012 ; 76, 470-85.

Salas-Ramirez KY, Frankfurt M, Alexander A, Luine VN, Friedman E. Prenatal cocaine exposure increases anxiety, impairs cognitive function and increases dendritic spine density in adult rats: influence of sex. *Neurosci.*, 2010 Sep 1 ; 169(3), 1287-95.

Salek RL, Claussen CM, Pérez A, Dafny N. Acute and chronic methylphenidate alters prefrontal cortex neuronal activity recorded from freely behaving rats. *Eur J Pharmacol.*, 2012 Mar 15 ; 679(1-3), 60-7.

Salom JB, Torregrosa G, Barberá MD, Jover T, Ortí M, Alborch E. Effects of cocaine on human and goat isolated cerebral arteries. *Drug Alcohol Depend.*, 1996 Sep ; 42(1), 65-71.

Samaha AN, Li Y, Robinson TE. The rate of intravenous cocaine administration determines susceptibility to sensitization. *J Neurosci.*, 2002 Apr 15 ; 22(8), 3244-50.

Sandoval V, Riddle EL, Hanson GR, Fleckenstein AE. Methylphenidate redistributes vesicular monoamine transporter-2: role of dopamine receptors. *J Neurosci.*, 2002 Oct 1 ; 22(19), 8705-10.

Scheel-Krüger J. Comparative studies of various amphetamine analogues demonstrating different interactions with the metabolism of the catecholamines in the brain. *Eur J Pharmacol.*, 1971 ; 14(1), 47-59.

Schenck CH, Bassetti CL, Arnulf I, Mignot E. English translations of the first clinical reports on narcolepsy and cataplexy by Westphal and Gélinau in the late 19th century, with commentary. *J Clin Sleep Med.*, 2007 Apr 15 ; 3(3), 301-11.

Schiffer WK, Lee DE, Alexoff DL, Ferrieri R, Brodie JD, Dewey SL. Metabolic correlates of toluene abuse: decline and recovery of function in adolescent animals. *Psychopharmacology (Berl).*, 2006 ; 186, 159-67.

Schiffer WK, Mirrione MM, Dewey SL. Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents. *J Nucl Med.*, 2007 Feb ; 48(2), 277-87.

Schmidt RA, Glenny RW, Godwin JD, Hampson NB, Cantino ME, Reichenbach DD. Panlobular emphysema in young intravenous Ritalin abusers. *Am Rev Respir Dis.*, 1991 Mar ; 143(3), 649-56.

Schmidt U, Beyer C, Oestreicher AB, Reisert I, Schilling K, Pilgrim C. Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neurosci.*, 1996 ; 74, 453-60.

Schutová B, Hrubá L, Pometlová M, Slamberová R. Impact of prenatal and acute methamphetamine exposure on behaviour of adult male rats. *Prague Med Rep.*, 2009 ; 110(1), 67-78.

Seeman P, Madras BK. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry.*, 1998 ; 3, 386-96.

Sesack SR, Grace AA. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharm.*, 2010 ; 35, 27-47.

Sharp T, Zetterstrom T, Ljungberg, Ungerstedt U. A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res.*, 1987 ; 401, 322-30.

Shen RY, Choong K. Different adaptations in ventral tegmental area dopamine neurons in control and ethanol exposed rats after methylphenidate treatment. *Biol Psychiatry.*, 2006 ; 59, 635-42.

Sherman CB, Hudson LD, Pierson DJ. Severe precocious emphysema in intravenous methylphenidate (Ritalin) abusers. *Chest.*, 1987 Dec ; 92(6), 1085-7.

Shi J, Yu WJ, Sun GY, Zhu SW. Organotypic brain slice triple culture of neocortex-striatum-substantia-nigra of neonatal SD rats. *Progr Anat Sci.*, 2006 ; 12, 18-20.

Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T. Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav Brain Res.*, 2002 Aug 21 ; 134(1-2), 123-30.

Sills TL, Crawley JN. Individual differences in sugar consumption predict amphetamine-induced dopamine overflow in nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.*, 1996 May 15 ; 303(3), 177-81.

Silva RR, Muniz R, McCague K, Childress A, Brams M, Mao A. Treatment of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: results of a randomized, multicenter, double-blind, crossover study of extended-release dexamethylphenidate and D,L-methylphenidate and placebo in a laboratory classroom setting. *Psychopharmacol Bull.*, 2008 ; 41(1), 19-33.

Silva RR, Muniz R, Pestreich L, Childress A, Brams M, Lopez FA, Wang J. Efficacy and duration of effect of extended-release dexamethylphenidate versus placebo in schoolchildren with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*, 2006 Jun ; 16(3), 239-51.

Simon V, Czobor P, Balint S, Mészáros A, Bitter I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry.*, 2009 ; 194, 204-11.

Sobrian SK, Marr L, Ressler K. Prenatal cocaine and/or nicotine exposure produces depression and anxiety in aging rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 2003 May ; 27(3), 501-18.

Sodhi MS, Sanders-Bush E. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol.*, 2004 ; 59, 111-74.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.*, 1977 ; 28, 897-916.

Solanto MV. Clinical psychopharmacology of AD/HD: implications for animal models. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2000 ; 24, 27-30.

Song ZM, Undie AS, Koh PO, Fang YY, Zhang L, Dracheva S, Sealfon SC, Lidow MS. D1 dopamine receptor regulation of microtubule-associated protein-2 phosphorylation in developing cerebral cortical neurons. *J Neurosci.*, 2002 ; 22, 6092-105.

Spear LP, Kirstein CL, Bell J, Yootanasumpun V, Greenbaum R, O'Shea J, Hoffmann H, Spear NE. Effects of prenatal cocaine exposure on behavior during the early postnatal period. *Neurotoxicol Teratol.*, 1989 Jan-Feb ; 11(1), 57-63.

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 1996 Apr ; 35(4), 409-32. Review.

Spigset O, Brede WR, Zahlén K. Excretion of methylphenidate in breast milk. *Am J Psychiatry.*, 2007 Feb ; 164(2), 348.

Srinivas NR, Hubbard JW, Korchinski ED, Midha KK. Enantioselective pharmacokinetics of dl-threo-methylphenidate in humans. *Pharm Res.*, 1993 Jan ; 10(1), 14-21.

Stahl SM, Pradko JF, Haight BR, Modell JG, Rockett CB, Learned-Coughlin S. A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.*, 2004 ; 6(4), 159-66.

Stairs DJ, Neugebauer NM, Bardo MT. Nicotine and cocaine self-administration using a multiple schedule of intravenous drug and sucrose reinforcement in rats. *Behav Pharmacol.*, 2010 May ; 21(3), 182-93.

Su SW, Cherng CF, Lin YC, Yu L. Prenatal exposure of bupropion may enhance agitation, anxiety responses, and sensitivity to cocaine effects in adult mice. *Chin J Physiol.*, 2007 Feb 28 ; 50(1), 1-8.

Svetlov S. I., Kobeissy F. H. and Gold M. S. Performance enhancing, non-prescription use of Ritalin: a comparison with amphetamines and cocaine. *J. Addict. Dis.*, 2007 ; 26, 1-6.

Tang B, Dafny N. Dorsal raphe neuronal activities are modulated by methylphenidate. *J Neural Transm.*, 2013 May ; 120(5), 721-31.

Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ. Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D2-like receptors. *Brain Res.*, 1998 ; 110, 227-33.

Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ. Postnatal development of dopamine D1-like receptors in rat cortical and striatolimbic brain regions: an autoradiographic study. *Dev Neurosci.*, 1999 ; 21, 43-9.

Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol.*, 1997 Dec 11 ; 340(2-3), 249-58.

Taylor D, Ho BT. Neurochemical effects of cocaine following acute and repeated injection. *J Neurosci Res.*, 1977 ; 3(2), 95-101.

Thanos PK, Michaelides M, Benveniste H, Wang GJ, Volkow ND. The effects of cocaine on regional brain glucose metabolism is attenuated in dopamine transporter knockout mice. *Synapse.*, 2008 May ; 62(5), 319-24.

The MTA Cooperative Group. A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry.*, 1999 Dec ; 56(12), 1073-86.

Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD. Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nat Rev Neurosci.*, 2009 Apr ; 10(4), 303-12.

Thompson VB, Heiman J, Chambers JB, Benoit SC, Buesing WR, Norman MK, Norman AB, Lipton JW. Long-term behavioral consequences of prenatal MDMA exposure. *Physiol Behav.*, 2009 Mar 23 ; 96(4-5), 593-601.

Todd RD. Neural development is regulated by classical neurotransmitters: dopamine D2 receptor stimulation enhances neurite outgrowth. *Biol Psychiatry.*, 1992 ; 31, 794-807.

Torres-Reveron A, Weedon J, Dow-Edwards DL. Methylphenidate response in prenatal cocaine-exposed rats: a behavioral and brain functional study. *Brain Res.*, 2010 Jun 14 ; 1337, 74-84.

Treuer T, Gau SS, Méndez L, Montgomery W, Monk JA, Altin M, Wu S, Lin CC, Dueñas HJ. A systematic review of combination therapy with stimulants and atomoxetine for attention-deficit/hyperactivity disorder, including patient characteristics, treatment strategies, effectiveness, and tolerability. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*, 2013 Apr ; 23(3), 179-93.

Tsujino N, Sakurai T. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.*, 2009 Jun ; 61(2), 162-76.

Turillazzi E, Bello S, Neri M, Pomara C, Riezzo I, Fineschi V. Cardiovascular effects of cocaine: cellular, ionic and molecular mechanisms. *Curr Med Chem.*, 2012 ; 19(33), 5664-76.

Turner DC, Blackwell AD, Dowson JH, McLean A, Sahakian BJ. Neurocognitive effects of methylphenidate in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl).*, 2005 Mar ; 178(2-3), 286-95.

Van den Hove DL, Blanco CE, Scheepens A, Desbonnet L, Myint AM, Leonard BE, Prickaerts J, Steinbusch HW. Prenatal maternal paroxetine treatment and neonatal mortality in the rat: a preliminary study. *Neonatal.*, 2008 ; 93(1), 52-5.

Van Dyck CH, Quinlan DM, Cretella LM. Unaltered dopamine transporter availability in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.*, 2002 ; 159, 309-12.

Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl).*, 2000 Aug ; 151(2-3), 99-120.

Volkow ND, Ding YS, Fowler JS. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Arch Gen Psychiatry.*, 1995 ; 52, 456-63.

Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Ding Y, Gatley SJ. Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J Atten Disord.*, 2002 ; 6 Suppl 1, 31-43.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Fischman M, Foltin R, Abumrad NN, Gatley SJ, Logan J, Wong C, Gifford A, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain. *Life Sci.*, 1999 ; 65(1), 7-12.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J Psychiatry.*, 1998 Oct ; 155(10), 1325-31.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, Ding Y, Gatley SJ, Gifford A, Franceschi D. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. *J Neurosci.*, 2001 Jan 15 ; 21(2), 121.

Warner C, Shoaib M. How does bupropion work as a smoking cessation aid? *Addict Biol.*, 2005 Sep ; 10(3), 219-31.

Weiss F, Paulus MP, Lorang MT, Koob GF. Increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens by cocaine are inversely related to basal levels: effects of acute and repeated administration. *J Neurosci.*, 1992 Nov ; 12(11), 4372-80.

Westerink BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res.*, 1995 Oct ; 70(2), 103-24. Review.

Whitaker-Azmitia PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev.*, 1991 Dec ; 43(4); 553-61.

Wilens TE, Adler LA, Adams J, Sgambati S, Rotrosen J, Sawtelle R, et al. Misuse and Diversion of Stimulants Prescribed for ADHD: A Systematic Review of the Literature. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 2008 Jan. ; 47(1), 21-31.

Wolraich ML, Hannah JN, Pinnock TY, Baumgaertel A, Brown J. Comparison of diagnostic criteria for attention-deficit hyperactivity disorder in a county-wide sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 1996 Mar ; 35(3), 319-24.

Wolraich ML, Lindgren S, Stromquist A, Milich R, Davis C, Watson D. Stimulant medication use by primary care physicians in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatr.*, 1990 ; 86, 95-101.

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM, Netto CA, Achaval M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc.*, 2005 Dec ; 16(1-3), 58-64.

Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 2004 ; 43, 1154-8.

Yang PB, Amini B, Swann AC, Dafny N. Strain differences in the behavioral responses of male rats to chronically administered methylphenidate. *Brain Res.*, 2003 ; 971, 139-52.

Yang PB, Singhal N, Modi G, Swann AC, Dafny N. Effects of lithium chloride on induction and expression of methylphenidate sensitization. *Eur J Pharmacol.*, 2001 ; 426, 65-72.

Yang PB, Swann AC, Dafny N. Acute and chronic methylphenidate doseresponse assessment on three adolescent male rat strains. *Brain Res Bull.*, 2006 ; 71, 301-10.

Yang PB, Swann AC, Dafny N. Dose-response characteristics of methylphenidate on locomotor behavior and on sensory evoked potentials recorded from the VTA, NAc, and PFC in freely behaving rats. *Behav Brain Funct.*, 2006 Jan 17 ; 2, 3.

Yano M, Steiner H. Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation? *Trends Pharmacol.*, 2007 ; 28, 588-96.

Yonetani M, Huang CC, Lajevardi N, Pastuszko A, Delivoria-Papadopoulos M, Anday E. Effect of acute cocaine injection on the extracellular level of dopamine, blood flow, and oxygen pressure in brain of newborn piglets. *Biochem Med Metab Biol.*, 1994 Feb ; 51(1), 91-7.

Zocchi A, Conti G, Orzi F. Differential effects of cocaine on local cerebral glucose utilization in the mouse and in the rat. *Neurosci Lett.*, 2001 Jun 29 ; 306(3), 177-80.

Ouvrages :

Attention Deficit Hyperactivity Disorder Handbook 2nd edition: Millichap J, 2010.

Barkley RA, Murphy KR, Fischer M. New York, NY: Guilford Press. ADHD in Adults: What the Science Says, 2008.

Barkley RA. Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment. Guilford Press: New York, 1990.

Barkley RA. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder : Handbook for Diagnosis and Treatment, 2e édition, Guilford Press, 1998.

Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB. The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1996, 3-27.

Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. Drugs in pregnancy and lactation. 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.

DSM-IV-TR : American Psychiatric Association, 4^{ème} édition, version internationale, 2000.

Hackett LP, Ilett KF, Kristensen JH ,Kohan R, Hale TW. Infant Dose And Safety Of Breastfeeding For Dexamphetamine And Methylphenidate In Mothers With Attention Deficit Hyperactivity Disorder: 40. Therapeutic Drug Monitoring, April 2005 - Volume 27 - Issue 2 - pp 220-221.

Hoffman H. Der Struwwelpeter. Die Geschichte vom Zappel-Philipp, 1858.

Koob GF, LeMoal M. *Neurobiology of Addiction*. Academic Press, 2005.

Modafinil: a second look. Confirmed efficacy in narcolepsy. No author listed. Prescrire Int., 1999 Feb ; 8(39), 5-7.

OECD. Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guideline for the Testing of Chemicals #426. 1-26, 2007.

ONU. Convention sur les substances psychotropes de 1971.

Paxinos et Watson, The Rat Brain, 1986.

Revue prescrire, 2012 ; 32, 428.

Running head: An Examination of effects of Methylphenidate on reducing hyperactivity in dogs.

Steiner H, Tseng K. Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, 1st ed. 2010. San Diego, CA: Elsevier.

Vecchierini MF. La narcolepsie. Encyclopédie Orphanet. Juillet 2004.

Sites internet :

<http://sites.sinauer.com/animalcommunication2e/chapter10.04.html>

<http://www.casapalmera.com/articles/signs-and-effects-of-the-methylphenidate-a-drug-also-known-as-ritalin>

<http://www.erowid.org/pharms/methylphenidate/>

<http://www.mothersmatter.co.nz/Medications/Other/Methylphenidate.asp>

<http://www.vaxa.com/fidgety-philip.cfm>

www.anc-narcolepsie.com

www.coulbourn.com

www.dailymail.co.uk/news/article-494862/Ritalin-The-scandal-kiddy-coke.html

www.drugabuse.gov

www.dsm5.org

www.orpha.net

www.tdah-france.fr

www.toxinz.com

Le MPH est le médicament le plus prescrit pour le traitement du trouble déficitaire de l'attention/hyperactivité (TDA/H). Sa prescription de l'enfance à l'âge adulte et notamment chez les femmes en âge de procréer soulève des questions sur les effets à long terme d'un tel traitement sur le cerveau en développement. À ce jour, aucune information n'est disponible concernant la présence ou non de modifications neurobiologiques à l'âge adulte consécutives à une exposition prénatale au MPH. Nous avons utilisé un modèle d'exposition prénatale au MPH chez le rat pour étudier les conséquences d'un tel traitement sur le fonctionnement du cerveau adulte.

L'imagerie scintigraphique a été réalisée pour comparer les profils métaboliques cérébraux des rats exposés en prénatal au MPH vs témoins. L'aspect structural de leur système dopaminergique a été évalué avec un immunomarquage de la TH et l'aspect fonctionnel à l'aide de microdialyse *in vivo* et d'immunohistochimie c-Fos dans des conditions basales et après stimulation dopaminergique. Parallèlement, l'évaluation comportementale de ces animaux vis-à-vis de récompense naturelle ou synthétique ainsi que leur réactivité vis-à-vis de l'effet locomoteur de la cocaïne a été étudiée.

Les animaux exposés en prénatal au MPH affichent des altérations neurobiologiques structurales et fonctionnelles associées au système dopaminergique et à sa réactivité suite à une administration de cocaïne. Nos résultats montrent aussi que ces animaux présentent une altération de la préférence et de la motivation au sucre (renforceur naturel) alors qu'aucune différence de motivation pour s'auto-administrer de la cocaïne (renforceur synthétique) n'a été décelée. Cependant, ces animaux montrent une baisse de sensibilité aux effets locomoteurs de la cocaïne.

À notre connaissance, notre étude préclinique est la première qui rapporte des modifications neurobiologiques à long terme après une exposition prénatale au MPH. Sur un plan plus fondamental, ces données devraient permettre de mieux comprendre comment des perturbations dopaminergiques transitoires au cours du développement cérébral peuvent induire des altérations cérébrales à long terme.

Mots clés : Méthylphénidate, TDA/H, Exposition Prénatale, Rat, Dopamine