UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR Inserm 1253 « IBrain »

Equipe « Imagerie, Biomarqueurs et Thérapies »

THÈSE présentée par :

Camille DUPUY

soutenue le : **15 décembre 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Science de vie et de la Santé / Neurosciences

Biomarqueurs du TDAH : Corrélations Métabolomiques et Neuro-cognitives

THESE dirigée par :

Monsieur THOMAS-CASTELNAU Pierre	Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Tours
Monsieur EMOND Patrick	Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur BONNOT Olivier	Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Nantes
Monsieur LANDRY Marc	Professeur des Universités, Bordeaux

JURY :

Monsieur BONNOT Oliver	Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Nantes
Monsieur EMOND Patrick	Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Tours
Monsieur FENAILLE François	Docteur - Chercheur, Paris
Monsieur LANDRY Marc	Professeur des Universités, Bordeaux
Madame TACONNAT Laurence	Professeur des Universités, Tours
Monsieur THOMAS-CASTELNAU Pierre	Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Tours

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury, les professeurs Olivier Bonnot et Marc Landry d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse ainsi que le docteur François Fenaille et la professeure Laurence Taconnat d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci au professeur Catherine Belzung, directrice de l'unité Inserm 1253 « Imagerie et Cerveau », de m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Un grand merci au professeur Pierre Castelnau et au professeur Patrick Emond d'avoir pris le temps de partager vos connaissances avec moi durant ces 4 années de thèse.

Un très grand merci au Docteur Laurent Galineau, de m'avoir acceptée en stage en master 1 et en master 2 sans qui je n'aurai peut-être pas eu l'opportunité de faire cette thèse. Un merci plus que sincère de m'avoir appris à « maniper », de m'avoir soutenue et supporté durant toutes ces années, de m'avoir fait confiance que ce soit pour la recherche où l'enseignement, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, et pour toutes ces discussions à propos de la recherche ou de la vie de tous les jours.

Merci aux docteurs Lydie Nadal-Desbarats et Sylvie Mavel, toujours présentes pour m'aider à apprivoiser la métabolomique ainsi que ses logiciels. Vous avez toujours été de très bons conseils et d'un grand soutien scientifique mais aussi et surtout moral.

Je remercie Diane Dufour d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et d'avoir apporter ta bonne humeur à chaque réunion.

Merci Clovis pour tes conseils et ton aide grâce à ta vision « statistique » ainsi que pour toutes ces pauses déjeuner à faire des mots croisés !

Je remercie la directrice de recherche Sylvie Chalon d'avoir été présente durant ces dernières années.

Que serait une thèse sans ses collègues de labo :
A vous tous, mille millions de mercis pour l'accueil, vous m'avez intégrée dès le début, ces moments de fous-rire en manips (un peu trop tôt le matin à mon goût), ces parties de mots-fléchés endiablés le midi mais surtout pour la bonne ambiance quotidienne. Vous ne savez pas à quel point c'est plaisant de venir travailler avec une équipe toujours de bonne humeur et toujours présente dans les bons comme dans les « moins bons » moment de la thèse.

Merci Sophie pour tous ces moments de discussion autour d'un café et pour ton soutien.

Merci Claire pour tous tes conseils mais surtout pour toutes tes imitations et les debrifieng d'émissions de télé (J'espère voir un jour le Claire's One Woman Show).

Nadine, merci pour toutes ces discussions, que ce soit à propos de la thèse ou à propos de la vie. Toujours présente pour remonter le moral, encourager et avoir un mot gentil, ce fut très agréable d'apprendre à te connaitre pendant ces quelques années.

Un énorme merci à Antoine, tu m'as toujours aidée pour les manips métabo, tu as toujours pris le temps répondre à mes innombrables questions même quand tu n'avais pas le temps.

Sylvie Bodard, Zuhal Gulhan & Julie Busson, le bureau des pleurs et des fous-rire !!!
Ma bobo, la maman du labo, merci de m'avoir transmis tes connaissances et compétences, merci d'avoir sauvé un bon nombre de mes microdialyses pendant mon master 2, mais aussi de toutes mes manips de thèse ! Au delà du travail, merci d'avoir été présente pour moi toutes ces années !
Zuzu, on n'a pas beaucoup eu l'opportunité de travailler ensemble mais cela ne nous a pas empêcher d'avoir beaucoup de discussions. Toujours présente, dans les traces de bobo (la relève est assurée !) pour m'écouter, rire et m'aider. Je garde quand même à l'esprit tous les traquenards pour vider les congèles chaque année, pour ça non plus tu ne m'as jamais oubliée !
Juju, merci pour m'avoir aidée dès mon arrivée en master mais aussi pour toutes les commandes et toutes les demandes de devis. Mais surtout merci d'égailler le labo, je me souviendrai toujours des midis au labo pendant les vacances de noël (l'annonce de la future arrivée de Constant, la livraison de sushis à manger dans ton bureau tellement il faisait froid).

Merci à mes collègues partageant le bureau ;

Mention spéciale à Cécile, les déménagements du bureau, l'organisation de l'école (C&C forever) et ses brainstorming sur le tableau pour les idées de jeux/quizz, d'activités et de goodies, on aura au moins gagné en expérience dans la demande de devis et la rédaction de mails. Ces voyages à Toulouse[2] et Clermont-Ferrand avec son lot de galères et d'histoires improbables (ambiance souris, commentatrice officielle des événements du squat en face de notre hôtel, les soirées télé/netflix à Toulouse avec le mec qui chante dans la rue, les voyages en uber), la galère du poster et des expériences de la fête de la science, merci de m'avoir suivie dans mes délires.
Merci aussi pour toutes ces discussions autour de la chimie et de la métabo, ton soutien indéfectible, ta joie et ta bonne humeur, les soirées Mojito et tes danses dans le bureau resteront gravés dans ma mémoire.

« Le rivage n'est pas loin = l'objectif est bientôt atteint » ❤

A très vite en Guadeloupe ;)

Alex, merci d'avoir apporté ta bonne humeur et de ton soutien tous les jours au labo. Nos sorties roller et patinoire avec Cécile auront été épiques ! Je te souhaite le meilleur pour la suite de la thèse

Merci Aline, mon ex-voisine, d'avoir partagé tous ces moments au labo !

Merci Marine pour ton aide avec la clinique, tu n'as jamais hésité à m'aider pour le recueil des données, compléter les immenses tableaux et relire les dossiers et bien évidemment les meilleurs moments resteront autour de petits verres place plum'.

A mes amis ;

Blandine, mon amie de toujours, ma coloc, je te remercie d'avoir été là pendant ces 15 dernières années.

Elodie, tu me soutiens et supportes depuis la fac, une vraie amie sur qui je peux compter à tous moments. A tous ces moments en compagnie des « démons de minuits » et « des rois du monde », à toutes nos sorties shopping, café et soirées. Un immense merci de m'avoir épaulée, écoutée, remotivée durant cette thèse.

Vincent et Romain : on est ensemble les gars ! Merci d'avoir supporté ma mauvaise humeur et de m'avoir soutenue depuis le Master 2 ! Romain dépêche toi de finir ta thèse qu'on puisse reprendre les soirées ciné, sushi & mario-kart !

Mathieu, tu es revenu sur Tours à la fin de ma thèse et je te félicite de ne pas être parti en courant lors des soirées ! Les loustics vous êtes arrivés à la toute fin, merci à tous de m'avoir écoutée et épaulée pendant cette période.

A ma Famille ;
Mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes études, qui ont tout fait pour que je réussisse. Ca y est, c'est terminé, je suis arrivée au bout !
Mon grand frère, Mathieu, toujours présent pour les bonnes comme les mauvaises nouvelles.
Vous avez toujours cru en moi et je vous en remercie du plus profond de mon coeur.

Résumé

Le Trouble Déficit d'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) est un trouble du neurodéveloppement hétérogène touchant 3 à 5% des enfants scolarisés et caractérisé par un déficit d'attention, une hyperactivité et une impulsivité. Actuellement le diagnostic se fait principalement à l'aide de tests cognitifs avec un risque non négligeable d'erreurs diagnostiques. A l'heure actuelle, aucune étude ne propose de marqueurs biologiques fiables du TDAH. L'identification de biomarqueurs reste donc un enjeu important pour le diagnostic précoce, le suivi thérapeutique adapté des patients et la caractérisation de la physiopathologie. La métabolomique est une technologie récente qui s'intéresse à l'identification, la quantification et la caractérisation de métabolites pouvant servir de biomarqueurs.
Les objectifs de cette thèse sont de mieux comprendre la pathologie et d'identifier des biomarqueurs via des approches biochimiques et métabolomiques transversales en contexte préclinique et clinique.

La première partie de ce travail a été réalisée à l'aide d'un modèle animal de TDAH. Des rats de souche SHR/NCrl présentant des troubles de l'attention, hyperactivité et impulsivité et des rats témoins, de souche WKY/NHsd, ont été utilisés. Le premier objectif a été d'analyser le métabolome cérébral de ce modèle animal afin d'identifier des voies métaboliques perturbées ainsi que d'analyser le métabolome périphérique de ces animaux pour le corréler au métabolome cérébral. Les résultats montrent des perturbations cérébrales du métabolisme énergétique chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins. Ces anomalies ont également été retrouvées dans le métabolome sanguin et urinaire suggérant de potentiels biomarqueurs périphériques reflétant des modifications centrales.
Dans le but de mieux caractériser ce trouble, une seconde étude métabolomique a été réalisée dans des régions cérébrales spécifiquement impliquées dans le TDAH. Les résultats de cette étude permettent d'aller plus loin dans la connaissance des modifications biochimiques présentes dans ce modèle.
Enfin, une troisième étude a quantifié trois neurotransmetteurs, la dopamine, la sérotonine et l'acétylcholine dans quatre régions cérébrales d'intérêt dans le TDAH. Les résultats montrent que ces trois neurotransmetteurs sont altérés dans le cortex orbito-frontal, le cortex pré-limbique, le striatum dorsal et le striatum ventral. Ces résultats suggèrent que le TDAH n'est pas uniquement un trouble lié au système dopaminergique, comme souvent présenté, mais que d'autres neurotransmetteurs peuvent jouer un rôle dans la physiopathologie.
Ces données suggèrent de nouvelles pistes à étudier pour mieux comprendre le TDAH.

La seconde partie de ce travail a eu pour objectif d'identifier des biomarqueurs périphériques du TDAH afin d'apporter une aide au diagnostic. Pour cela, une étude métabolomique a été réalisée à partir d'échantillons sanguins et urinaires d'une cohorte de patients atteints de TDAH et une cohorte de patients non atteints. Les résultats montrent des modifications du métabolisme énergétique, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans les études précliniques. Le métabolisme énergétique a été peu étudié dans le TDAH mais certains auteurs ont proposé une « théorie neuro-énergétique du TDAH » suggérant que les symptômes pourraient résulter d'un trouble de gestion intra-cérébrale de l'énergie dans ce trouble.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux pré-cliniques et cliniques, obtenus à partir d'approches métabolomiques, paraît cohérent et fourni des perspectives de recherche innovantes pour mieux comprendre la physiopathologie de ce trouble sévère, précoce et invalidant, rendre le diagnostic plus précoce et enrichir l'arsenal thérapeutique au profit des patients.

Mots clés : TDAH - Métabolomique - Biomarqueurs

Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is an heterogeneous neurodevelopmental disorder affecting 3-5% of school children and characterized by inattention, hyperactivity and impulsivity. Currently, the diagnosis is mainly established using cognitive tests with a significant risk of diagnostic errors. Therefore, the idenfication of biomarkers remains a major challenge for early diagnosis, improved therapeutic monitoring and a better comprehension of ADHD pathology Metabolomics is a recent technology which can identify, quantify and characterize metabolites wich could serve as relevant biomarkers.
The objectives of this thesis were to better understand de pathophysiology of ADHD and to identify biomarkers through biochemical and metabolomic approaches in preclinical and clinical settings.

The first part of this work was done using an animal model of ADHD. SHR/NCrl rats present attention, hyperactivity and impulsivity dysfunctions compared to the control WKY/NHsd rats which were used.
The first step was to analyze the brain metabolome in this rat model in order to identify metabolic pathways alterations. The peripheral metabolomes of theses animals were also analyzed to correlate it with the cerebral metabolome. The results showed energy metabolism disturbances in the brains of the SHR/NCrl rats compared to the control animals. Such abnormalities were also found in the blood and urine metabolomes suggesting that potential biomarkers could reflect the cerebral changes in periphery.
To better understand the pathophysiology of ADHD, a second metabolomic study was performed on ten brain regions specifically involved in ADHD. The results of this study show that energy metabolism is altered in all regions of the brain, but some show more specific modifications.
Finally, a third study quantified three neurotransmitters, dopamine, serotonin and acetylcholine in four brain regions of interest in ADHD. The results show that such neurotransmitters are altered in the orbifrontal cortex, prelimbic cortex, dorsal striatum and ventral striatum. Thus, ADHD may not be a dopaminergic related disorder only, as often studied. Hence, other neurotransmitters may play a role in its pathophysiology.

The second part of this work aims to identify peripheral ADHD biomarkers in order to facilitate the diagnosis. From such perspective, a metabolomic study was realized using blood and urine samples from a cohort of patients with a confirmed ADHD compared to a group of patients without ADHD. The results also suggest significant variations in the energy metabolism of the ADHD patients, which could be be link to the data previously obtained in our preclinical studies. To date, very few studies of the energy metabolism have been performed in ADHD, however a theory called « neuroenergetic theory of ADHD » as been previously proposed, suggesting that the cognitive symptoms could be the result of an energy management failure in the brain of the patients.

Altogether, these preclinical and clinical experimental results, obtained from metabolomic approaches, appear consistent in our hands and provide innovative research perspectives to better understand the pathophysiology of this severe, early and disabling disorder, to make the diagnosis earlier and enrich the therapeutic arsenal for the benefit of the patients.

Key words : ADHD - Metabolomics - Biomarker

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 8
Abstract 9
Table des matières 11
Liste des tableaux 16
Liste des figures 18
Liste des abréviations 20
Liste des annexes 22
Préambule 25
Chapitre I - Présentation clinique du TDAH 29
I.1 - Les symptômes 29
I.1.a - Les symptômes principaux 29
I.1.b - Les comorbidités....30
I.1.c - L'hétérogénéité....31
I.2 - Les outils de diagnostic....32
I.3 - Les traitements....36
I.3.a - Les traitements non pharmacologiques....36
I.3.b - Les traitements pharmacologiques 37
Chapitre II - Les biomarqueurs du TDAH 41
II.1 - Théories neuropsychologiques....43
II.2 - Marqueurs génétiques 47
II.3 - Etudes de neuro-imagerie clinique....50
II.4 - Les biomarqueurs biochimiques du TDAH....56
II.4.a - Le système dopaminergique....56
II.4.b - Le système sérotoninergique et kynurénique....59
II.4.b1 - Le système sérotoninergique 59

II.4.b2 - Le système de la kynurénine 60
II.4.c - Les facteurs de croissance 63
II.4.c1 - Les facteurs de croissances neurotrophiques 64
II.4.c2 - Les hormones 66
II.4.c3 - Les vitamines 68

Chapitre III - La métabolomique 71

III.1 - Généralités 71
III.1.a - Les sciences -omiques 71
III.1.b - Métabolome et Métabolites 73
III.1.c - Applications 73
III.1.d - Biomarqueurs 75
III.2 - L'approche métabolomique 76
III.2.a - Principe 76
III.2.b - Les différentes étapes 76
III.3 - Collecte et préparation des échantillons 78
III.4 - Analyse métabolomique : les différentes techniques 79
III.4.a - La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) 79
III.4.b - La spectrométrie de masse 80
III.4.b1 - couplée à la chromatographie gazeuse (GC-MS) 81
III.4.b2 - couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) 81
III.5 - Analyse métabolomique : l'acquisition des données LC-HRMS.. 83
III.6 - Le traitement des données et identification des métabolites 84
III.6.a - Traitement des données 84
III.6.b - Identification des métabolites 86
III.7 - Analyses statistiques et interprétation biologiques 87
III.7.a - Analyses statistiques univariées 87
III.7.b - Analyses statistiques multivariées 87
III.7.c - Interprétation biologique 88

Objectifs de la thèse 91

Chapitre IV - Les études précliniques 93

IV.1 - Les modèles animaux de TDAH 94

IV.2 -Le modèle SHR/NCrl 96

IV.2.a - données comportementales (validité de ressemblance) 96

IV.2.b - données génétiques et neurobiologiques (validité de construction) 99

IV.2.c - données comportementales après un traitement (validité prédictive) 99

IV.2.d - Limites du modèle 100

IV. A - Etude 1 - Etude du métabolome cérébral et périphérique dans un modèle animal de TDAH 101

IV.A.1 - Publication scientifique « Les rats SHR/NCrl, modèle animal de TDAH, peuvent être discriminés des rats contrôles à partir de leur métabolome cérébral, sanguin et urinaire » 101

IV.A.2 - Résumé des principaux résultats 121

IV.B - Etude 2 - Etude du métabolome de régions cérébrales impliquées dans le TDAH 122

IV.B.1 - Méthodologie 123

IV.B.1.a - Collecte des échantillons 123

IV.B.1.b - Préparation des échantillons 125

IV.B.1.c - Analyse Métabolomique 126

IV.B.1.d - Traitement des données 127

IV.B.1.e - Analyses Statistiques 128

IV.B.1.e1 - Analyses statistiques univariées 128

IV.B.1.e2 - Analyses statistiques multivariées 128

IV.B.1.f - Interprétation biologique 129

IV.B.2 - Résultats 130

IV.B.2.a - Métabolites détectés 130

IV.B.2.b - Modèles discriminants les rats SHR/NCrl des rats WKY/NHsd 131

IV.B.2.c - Voies métaboliques 132

IV.B.2.d - Métabolites d'intérêts 132

IV.B.3 - Discussion 137

IV.B.3.a - Le métabolisme de la dégradation de la lysine 137
IV.B.3.a1 - Le catabolisme de la lysine 137
IV.B.3.a2 - Le métabolisme de la carnitine 140
IV.B.3.b - Le métabolisme de l'histidine 141
IV.B.3.c - Le métabolisme de la cystéine 143
IV.B.4 - Conclusion 144

IV.C - Etude 3 : Dosage cérébral quantitatif des neurotransmetteurs dans un modèle de rats TDAH 146
IV.C.1 - Contexte 146
IV.C.2 - Méthodologie 146
IV.C.2.a - Echantillons 146
IV.C.2.b - Préparation des échantillons 148
IV.C.2.c - Analyse LC-MS 150
IV.C.2.d- Analyses statistiques 150
IV.C.3 - Résultats 151
IV.C.3.a - Les régions corticales 151
IV.C.3.b - Le striatum 152
IV.C.3.b1 - Le striatum dorsal 152
IV.C.3.b2 - Le striatum ventral 153
IV.C.4 - Discussion 154
IV.C.4.a - Le système dopaminergique 154
IV.C.4.b - Le système sérotoninergique 157
IV.C.4.c - Le système cholinergique 158
IV.C.4.d - Conclusion 159

IV - Conclusion de l'étude préclinique 160

Chapitre V - L'étude clinique 162

V.1 - Contexte et objectifs 163
V.2 - Matériel et méthode 165
V.2.a - Sujets 165

V.2.a1 - Critères d'inclusion et d'exclusion 165
V.2.a2 - Collecte des échantillons 165
V.2b - Préparation des échantillons 166
V.2.c - Analyse métabolomique 167
V.3.d - Traitement des données 168
V.3.d1 - Traitement des données à partir de la bibliothèque IROA 168
V.3.d2 - Pré-traitement 169
V.4.e - Analyses statistiques 170
V.4.e1 - Analyses statistiques univariées 170
V.4.e2 - Analyses statistiques multivariées 170
V.4.f - Interprétation biologique 171
V.3 - Résultats 172
V.3.a - Patients 172
V.3.b - Les patients atteints de TDAH peuvent être discriminés du groupe Contrôle à l'aide de leur métabolome sanguin et urinaire. 173
V.3.b1 - Métabolome sanguin 173
V.3.b2 - Métabolome urinaire 177
V.3.c - Prédictions 181
V.4 - Discussion 184
V.4.a - Métabolome sanguin 185
V.4.b - Le métabolome urinaire 188
V.4.c - Limites de l'étude 190
V.4.d - Conclusion 190
Conclusion générale 194
Annexe 198
Bibliographie 227

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères du TDAH d'après le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM5) 34

Tableau 2 : Liste des différents tests neuropsychologiques pouvant être effectués dans le diagnostic du TDAH 35

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la physiopathologie du TDAH 49

Tableau 4 : Liste des facteurs de croissance étudiés dans le TDAH 63

Tableau 5 : Paramètres des modèles PLS-DA pour les 10 régions cérébrales 131

Tableau 6 : Liste des voies métaboliques significativement altérées dans les 4 régions corticales, avec leur probabilité p et les métabolites associés 134

Tableau 7 : Liste des voies métaboliques significativement altérées dans les 6 régions sous-corticales, avec leur probabilité p et les métabolites associés 135

Tableau 8 : Liste des métabolites d'intérêt avec leur score VIP, leur probabilité p et leur sens de variation dans les 10 régions cérébrales 136

Tableau 9 : Tableau des métabolites utilisés avec leur étalon interne, leurs gammes de calibrations, leurs temps de rétention et leur concentration 149

Tableau 10 : Tableau des concentrations des étalons internes dans les 3 types d'échantillons CQ 149

Tableau 11 : Métabolites détectés dans les différentes conditions pour les deux matrices biologiques 168

Tableau 12 : Caractéristiques des patients 172

Tableau 13 : Liste des métabolites VIP du modèle sanguin, leur probabilité p ainsi que le sens de variation dans le groupe TDAH 175

Tableau 14 : Voies métaboliques significativement altérées dans le sang chez les patients atteints de TDAH 176

Tableau 15 : Liste des métabolites VIP du modèle urinaire, leur probabilité p ainsi que le sens de variation dans le groupe TDAH 179

Tableau 16 : Voies métaboliques significativement altérées chez les patients atteints de TDAH 180

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme d'action du Méthylphénidate 39

Figure 2 : Mécanisme d'action de la d-Amphétamine 39

Figure 3 : Schéma simplifié du modèle de Barkley (1997).....44

Figure 4 : Représentation schématique de l'aversion au délai en condition de choix et de non choix chez le patient TDAH. 44

Figure 5 : Représentation schématique des circuits impliqués dans le modèle Cognitivo-Affectif de Nigg & Casey. 46

Figure 6 : Imagerie présentant la densité de DAT dans le striatum 51

Figure 7 : Densité du DAT dans le noyau caudé.....51

Figure 8 : Image transversale de l'activité métabolique cérébrale représentative d'un sujet sain (à gauche) et d'un patient TDAH (à droite). 52

Figure 9 : Schéma représentant les différentes régions cérébrales impliquées dans le TDAH. 53

Figure 10 : Réseau du mode par défaut (DMN) chez l'Homme. 55

Figure 11 : Schéma de la voie de synthèse de la dopamine. 58

Figure 12 : Schéma de la voie de synthèse de la sérotonine. 62

Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des sciences -omiques. 72

Figure 14 : Principales applications de la métabolomique. 74

Figure 15 : Principales étapes d'une étude métabolomique (Workflow). 77

Figure 16 : Spectre de masse 80

Figure 17 : Capture d'écran du logiciel XCalibur®. 85

Figure 18 : Nombre de publications en fonction du type de modèle. 95

Figure 19 : Principe du test FI/Ext.....97

Figure 20 : Principe du test 5-CSRTT. 98

Figure 21 : Schéma représentant le workflow de l'étude. 123

Figure 22 : Coupe sagittale de cerveau de rat représentant les différentes régions cérébrales disséquées pour l'analyse métabolomique LC-MS. 124

Figure 23 : Nombre de métabolites détectés dans les 10 régions cérébrales.....130

Figure 24 : Voie métabolique de la dégradation de la lysine 139

Figure 25 : Voie métabolique de la carnosine. 142

Figure 26 : Voie métabolique de la cystathionine.....143

Figure 27 : Schéma général représentant les principales modifications des voies métaboliques.....145

Figure 28 : Boîtes à moustache (« Box plot ») des métabolites ayant une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dans le cortex orbito-frontal et le cortex pré-limbique.....151

Figure 29 : Boîtes à moustache (« Box plot ») des métabolites ayant une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dans le striatum dorsal.....152

Figure 30 : Boîtes à moustache (« Box plot ») des métabolites ayant une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dans le striatum ventral.....153

Figure 31 : Schéma représentant les niveaux d'éveil en fonction de la quantité de libération de dopamine et noradrénaline. 156

Figure 32 : Carte de similarités (« Score Plot ») après une analyse discriminante par PLS-DA pour la matrice sanguine. 174

Figure 33 : Carte de similarités (« Score Plot ») après une analyse discriminante par PLS-DA.....178

Figure 34 : Exemple de prédiction du TDAH dans une cohorte indépendante de validation à partir du profil du métabolome sanguin des patients de la cohorte expérimentale.....182

Figure 35 : Exemple de prédiction du TDAH dans une cohorte indépendante de validation à partir du profil du métabolome urinaire des patients de la cohorte expérimentale.....183

Liste des abréviations

18F-FDG	18-Fluoro-2-déoxyglucose
6-OHDA	6-Hydroxy Dopamine
ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMG	Amygdale
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BNDF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CCer	Cervelet Cognitif
CQ	Contrôle Qualité
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DMN	Default Mode Network / Réseau du mode par défaut
DOPEG	3,4-Dihydroxyphénylglycol
DSM	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
dStr	Striatum dorsal
DTI	Imagerie par Tenseur de Diffusion
GWAS	Genome Wild Association Study
HAS	Haute Autorité de Santé
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
Hip	Hippocampe
HMDB	Human Metabolome Data Base
ICD	International Classification of Diseases
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCer	Cervelet Limbique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
M2	Cortex Moteur 2
MPH	Méthylphénidate

NEPSY	Bilan neuropsychologique de l'enfant - 2nde édition
NGF	Nerve Growth Factor
NHE	Naples High-Excitability
NT	Neurotrophic Factor
OC	Ocytocine
OF	Cortex Orbito-Frontal
OMS	Organisation mondiale de la santé
Par	Cortex Pariétal
PEA	Phényléthylamine
PLS-DA	Partial Least Square - Discriminant Analysis
PrL	Cortex Pré-limbique
QIT	Quotient Intellectuel Total
SHR	Spontaneously Hypertensive Rat
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
TCC	Thérapie cognitive-comportementale
TDAH	Trouble Deficit de l'Attention avec ou sans Hyperactivité
TEA-Ch	Test of Everyday of Attention for Children
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TSA	Trouble du Spectre Autistique
TSH	Thyroid Stimulant Hormone
VMAT2	Transporteur de la dopamine ou du transporteur vésiculaire
vStr	Striatum ventral
WKY	Wistar Kyoto

Liste des annexes

Annexe 1 : Principales comorbidités associées au TDAH.....199

Annexe 2 : Echelle de Conner's - questionnaire destiné aux parents 201

Annexe 3 : ADHD-IV Rating Scale (ADHD RS) 204

Annexe 4 : SNAP-IV 206

Annexe 5 : Liste des métabolites détectés dans le cerveau de l'étude préclinique.....209

Annexe 6 : Liste des métabolites détectés dans le sang de l'étude préclinique.....210

Annexe 7 : Liste des métabolites détectés dans les urines de l'étude préclinique 211

Annexe 8 : Liste des métabolites détectés dans les fèces de l'étude préclinique.....212

Annexe 9 : Liste des métabolites détectés dans le cortex orbito-frontal 213

Annexe 10 : Liste des métabolites détectés dans le cortex pré-limbique 214

Annexe 11 : Liste des métabolites détectés dans le cortex moteur 2 215

Annexe 12 : Liste des métabolites détectés dans le cortex pariétal.....216

Annexe 13 : Liste des métabolites détectés dans le striatum dorsal 217

Annexe 14 : Liste des métabolites détectés dans le striatum ventral 218

Annexe 15 : Liste des métabolites détectés dans l'hippocampe 219

Annexe 16 : Liste des métabolites détectés dans l'amygdale.....220

Annexe 17 : Liste des métabolites détectés dans le cervelet cognitif 221

Annexe 18 : Liste des métabolites détectés dans le cervelet limbique.....222

Annexe 19 : Résultats des tests neuropsychologiques 223

Annexe 20 : Liste des métabolites détectés dans le sang de l'étude clinique.....225

Annexe 21 : Liste des métabolites détectés dans les urines de l'étude clinique 226

Préambule

Le Trouble Déficit de l'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) est un trouble du neurodéveloppement décrit pour la première fois au 18ème siècle par le physicien Allemand Melchior Adam Weikard (Barkley and Peters 2012). De nos jours, le TDAH est l'un des troubles du neurodéveloppement les plus fréquents chez l'enfant, avec une prévalence mondiale estimée entre 5,29% (Polanczyk et al., 2007) et 7,2% (Thomas et al., 2015). Il est estimé qu'approximativement deux tiers des enfants atteints de TDAH continuent à présenter des symptômes à l'âge adulte (Fayyad et al., 2017). Ce trouble n'est donc pas uniquement un trouble de l'enfance et la prévalence du TDAH à l'âge adulte est estimée entre 2,5% et 3% (Biederman and Faraone 2005; Simon et al., 2009). La prévalence mondiale de ce trouble varie au cours du temps certainement en raison de l'amélioration du diagnostic. Aux Etats-Unis, la prévalence du TDAH était de 6,1% en 1997 et a été estimée à 10,2% en 2016 (Xu et al., 2018).

Le premier chapitre de cette thèse sera consacrée à la présentation clinique du TDAH. Le TDAH est cliniquement caractérisé par trois signes cliniques cardinaux : le déficit attentionnel, l'hyperactivité motrice et l'impulsivité. Ce n'est qu'à partir des années 1980 qu'un premier outil de diagnostic du TDAH a été établi, entrainant un développement important des recherches cliniques sur ce trouble. Le diagnostic se fait théoriquement à partir de l'âge de 6-7 ans, correspondant à l'entrée en école primaire. A l'heure actuelle, il encore trop souvent basé quasi-exclusivement sur des évaluations cliniques. Les critères de diagnostic les plus utilisés se basent sur les 3 trois symptômes principaux en évaluant le déficit attentionnel d'une part et l'hyperactivité-l'impulsivité d'autre part. Selon ces critères, le TDAH est un trouble hétérogène qui peut être subdivisé en trois sous-types : des patients purement inattentifs, des patients surtout hyperactifs/impulsifs ou encore des patients présentant les 3 symptômes, ce qui correspond au sous-type dit « combiné » qui est le plus fréquent (DSM-V 2013). Le TDAH est susceptible de varier dans le temps avec une hyperactivité surtout présente chez l'enfant alors que les adultes sont plutôt inattentifs et impulsifs. L'hypothèse majoritaire relative à la physiopathologie suggère une forte implication du système dopaminergique. Cette hypothèse est née du constat que le méthylphénidate (MPH) diminue les symptômes. Le MPH n'est pas un traitement curatif mais symptomatique. Encore aujourd'hui le MPH est le médicalement de première intention le plus utilisé chez les patients qui présentent un TDAH (Fone and Nutt 2005). Le MPH bloque principalement le

transporteur de la dopamine et aussi, en moindre mesure, le transporteur de la noradrénaline ce qui a pour effet d'augmenter la neurotransmission dopaminergique et noradrénergique (Shaw et al., 2009). C'est pourquoi la recherche s'est principalement focalisée sur ce système et plus largement sur le système catécholaminergique au cours des 20 dernières années.

Le deuxième chapitre portera sur les connaissances actuelles dans l'identification de biomarqueurs du TDAH. Encore aujourd'hui, les causes de ce trouble restent peu connues et sa physiopathologie n'est pas totalement élucidée. Dans le but de mieux comprendre le TDAH, différentes études ont tentées d'identifier des marqueurs de ce trouble. Différentes théories neuropsychologiques tentent d'expliquer les symptômes en suggérant l'implication des réseaux neuronaux particuliers mais ne permettent pas de totalement caractériser la physiopathologie. Des études génétiques montrent une forte implication du système dopaminergique mais suggèrent l'implication d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans d'autres systèmes de neurotransmission. Selon les dernières études, le TDAH serait très certainement être un trouble polygénique. (Mick and Faraone 2008; Purper-Ouakil et al., 2011; Faraone and Larsson 2019). Des études d'imagerie ont, elle aussi, essayé d'identifier des marqueurs du TDAH, principalement à l'aide de la Tomographie par Emission de Position (TEP) pour quantifier la densité de transporteurs de la dopamine chez les patients atteints de TDAH. Les résultats de ces études sont très contrastés et ne permettent pas d'être utilisés pour le diagnostic. Enfin des études biochimiques ont été réalisées afin d'identifier des marqueurs de matrices périphériques telles que le sang et les urines mais, là encore, ces études n'ont pas fourni de messages clairs.

Il existe donc un besoin de biomarqueurs du TDAH afin de mieux caractériser la physiopathologie mais aussi dans le but d'identifier des biomarqueurs utilisables pour le diagnostic. Pour cela, la métabolomique semble être une technologie particulièrement adaptée. Le rôle et le principe de cette technologie est développé dans le troisième chapitre.

L'objectif de cette thèse est double : mieux comprendre la physiopathologie de ce trouble et identifier de potentiels biomarqueurs. Afin de mieux caractériser la physiopathologie, des études précliniques ont été réalisées et seront développées dans le quatrième chapitre. La première étude porte sur le métabolome cérébral et périphérique dans un modèle animal de TDAH. La deuxième étude porte sur le métabolome de régions spécifiques impliquées dans le TDAH. Enfin, la troisième étude porte sur le dosage cérébral de neurotransmetteurs de régions cérébrales spécifiques de ce même modèle animal de TDAH.

Le deuxième objectif de cette thèse est d'identifier des potentiels biomarqueurs du TDAH. Pour cela, une étude métabolomique clinique sur des échantillons sanguins et urinaires de patients atteints de TDAH a été réalisée et sera développée dans le cinquième chapitre.

CHAPITRE I - Présentation clinique du TDAH

Les symptômes du TDAH ont un impact sur les comportements de l'enfant, que ce soit sur le plan académique, familial et social, et ceux-ci se répercutent directement sur son bien-être. Les enfants et adolescents atteints de TDAH sont exposés à un risque plus élevé d'échec scolaire, de conflits parentaux et familiaux et de faible estime de soi (Faraone et al., 2015).

I.1 - Les symptômes

I.1.a - Les symptômes principaux

Les trois symptômes majeurs du TDAH sont l'inattention, l'hyperactivité et l'impulsivité. L'hyperactivité désigne le symptôme le plus visible mais sans pour autant constituer le phénomène princeps (DSM-V 2013). En réalité c'est le trouble attentionnel qui est considéré comme le pilier central du syndrome et ce, depuis la fin des années 70.

D'après le psychologue et philosophe américain William James, l'attention est « la prise de possession par l'esprit, sous une forme claire et vive, d'un objet ou d'une suite de pensées parmi plusieurs qui semblent possible … Elle implique le retrait de certains objets afin de traiter plus efficacement les autres ». D'après le modèle de Van Zomeren et Bouwer en 1994, l'attention peut se diviser, en dehors de l'alerte, en trois composantes principales : l'attention soutenue, l'attention sélective et l'attention divisée. L'attention soutenue est la capacité à maintenir sa concentration (pour une période de temps normale en fonction de l'âge) sur un objet. L'attention sélective correspond à l'aptitude d'un individu à sélectionner un élément d'une stimulation complexe afin d'en réaliser un traitement approfondi. Enfin, l'attention divisée est la capacité à traiter simultanément au moins deux éléments d'informations pertinentes. Dans le TDAH, les enfants peuvent présenter un manque d'écoute à l'école, ils sont très facilement distraits et ont beaucoup de mal à rester concentrés sur une tâche. Les enfants atteints de TDAH présentent une difficulté à maintenir et sélectionner leur attention dans la durée sans se laisser distraire par des stimuli non pertinents.

L'hyperactivité se présente habituellement sous la forme d'une hyperactivité locomotrice, l'enfant ressent un besoin de bouger sans cesse, de parler ou de faire des bruits. On dit souvent que l'enfant ne tient pas en place.

D'après le modèle de Dalley et Robin, l'impulsivité est décrite comme « des actions peu réfléchies, exprimées prématurément, potentiellement risquées, inappropriées à la situation

et sans prise en compte des conséquences négatives » (Moeller et al., 2001). Elle peut aussi être décrite comme une incapacité à attendre notamment pour prendre la parole. De plus, l'impulsivité peut se révéler sous forme de difficultés à gérer ses émotions et à garder son calme. Il est possible de distinguer deux grands types d'impulsivité :

- L'impulsivité motrice également appelée l'impulsivité de réponse qui correspond, par exemple, à un attrait pour les jeux dangereux.
- L'impulsivité cognitive également appelée l'impulsivité décisionnelle qui peut correspondre à un enfant qui répond spontanément à une question de l'enseignant sans qu'il ne soit interrogé.

D'autres symptômes associés aux trois principaux tels qu'une faible estime de soi ou une altération de la régulation des émotions sont fréquemment retrouvés dans le TDAH. Une dérégulation des émotions est observée chez environ 25 à 45% des enfants et entre 30 et 70% chez les adultes (Shaw et al., 2014). De nombreux parents témoignent souvent du fait que leur enfant présente une gestion fragile des émotions ainsi qu'une prédisposition pour les comportements de colère et de frustration (Tarver et al., 2014; Ptacek et al., 2019). Une étude a montré que les problèmes émotionnels ont eu un impact plus important que l'hyperactivité et l'inattention sur le bien-être et l'estime de soi (Riley et al., 2006). Tout comme les symptômes principaux, les altérations du fonctionnement émotionnel sont très hétérogènes mais elles représentent une source majeure d'atteinte au bien-être du patient.
Des comorbidités sont fréquemment rencontrées chez les patients atteints de TDAH et doivent être aussi diagnostiquées pour garantir une prise en charge adaptée du patient.

I.1.b - Les comorbidités

Il est estimé qu'entre 65% et 89% des patients atteints de TDAH présenteraient une comorbidité.
Les troubles comorbides les plus fréquents sont :

- Les troubles anxieux
- Les troubles des apprentissages
- Le trouble oppositionnel avec provocation
- Le trouble des conduites
- Les troubles de l'humeur

D'autres troubles comorbides peuvent être retrouvés et sont listés dans l'annexe 1. Les patients présentant un type de TDAH combiné sont plus susceptibles de présenter un trouble

externalisé que ceux présentant un TDAH de type inattentif prédominant (Miller et al., 2007). Les troubles de comportement dits externalisés se rapportent à de l'agitation, de l'agressivité, de l'impulsivité ou encore un manque d'obéissance (Rucklidge 2010). La forme inattentive du TDAH est plus souvent associée à des troubles anxieux ou des troubles du sommeil (Pingault et al., 2011). De plus, il est intéressant de noter que les comorbidités peuvent être différentes entre les filles et les garçons, une étude a ainsi montré que les filles atteintes de TDAH présentent des niveaux plus élevés de stress, d'anxiété et de dépression que les garçons atteints de TDAH (Biederman et al., 2002).

I.1.c - L'hétérogénéité

Lorsque les patients arrivent à l'âge adulte, les symptômes d'inattention restent inchangés, l'impulsivité a tendance à augmenter alors que l'hyperactivité tend à diminuer (Biederman et al., 2002; Larsson et al., 2011). L'hyperactivité prend souvent une forme plus cognitive que dans l'enfance et est souvent décrite comme des pensées envahissantes difficiles à canaliser. L'impulsivité se manifeste principalement verbalement avec une tendance à couper la parole (Weibel et al., 2020). L'évolution des symptômes entre l'enfance et l'âge adulte montre que le TDAH est un trouble évolutif et hétérogène sur le plan phénotypique et temporel.

Dans le TDAH, des données suggèrent que les garçons sont plus touchés par la maladie que les filles avec un sex-ratio de trois garçons pour une fille (Gershon 2002; Xu et al., 2018). Les garçons ont une tendance à principalement manifester des symptômes d'hyperactivité et d'impulsivité alors que les filles manifestent principalement un déficit d'attention (Gaub and Carlson 1997; Rucklidge 2010). Cette différence de symptômes peut entraîner un manque ou un retard de diagnostic chez les filles.

I.2 - Les outils de diagnostic

Le diagnostic de TDAH se fait à partir de 6-7ans, et est à l'heure actuelle, trop souvent basé exclusivement sur des évaluations cliniques.

Selon les recommandations émises par le NICE en 2009 (NICE 2020), le diagnostic du TDAH doit être réalisé par un médecin expérimenté grâce à un entretien clinique afin d'identifier les facteurs comportementaux posant problème. Au niveau international, deux nomenclatures de critères diagnostics sont utilisés : les critères DSM (DSM-V 2013) et les critères de la CID-11 (OMS 2019). Les symptômes pouvant évoluer avec l'âge, ces critères diffèrent en fonction de ce dernier. Les critères DSM sont les plus utilisés et distinguent les trois symptômes majeurs en deux sphères phénotypiques : les déficits attentionnels et les troubles d'hyperactivité-impulsivité. Le patient doit présenter au moins six des neufs critères définissant les troubles attentionnels et/ou au moins six des neufs critères définissant l'hyperactivité-impulsivité (Tableau 1). Les symptômes observés doivent persister depuis au moins six mois et avoir des conséquences négatives à la fois sur les activités sociales et académiques/professionnelles. Selon ces critères, le TDAH est un trouble hétérogène qui peut être subdivisé en trois sous-types : des patients purement inattentifs, des patients principalement hyperactifs/impulsifs ou encore des patients présentant tous les symptômes appartenant au sous-type combiné (DSM-V 2013). De plus, le TDAH est instable sur le plan temporel avec l'hyperactivité surtout présente chez les enfants quand les adultes sont surtout inattentifs et impulsifs.

Afin de mieux évaluer les conséquences négatives de ce trouble, des échelles comportementales ont été mises en place telles que les échelles de Conner's (CRS-R) (Annexe 2), ADHD-IV Rating Scale (Annexe 3) ou encore le SNAP-IV (Annexe 4). Ces échelles peuvent être destinées aux parents, à l'enseignant ou à l'enfant évalué.

Cependant, ces questionnaires subjectifs manquent de sensibilité et de sélectivité ce qui peut favoriser des erreurs de diagnostic et notamment des diagnostics abusifs. Idéalement, ces échelles comportementales doivent être complétées par des évaluations neuropsychologiques objectives et normées qui permettent d'évaluer précisément les fonctions exécutives et les fonctions attentionnelles. Dans un premier temps un test évaluant de quotient intellectuel (QIT) est réalisé permettant de diagnostiquer une déficience intellectuelle à l'origine des symptômes et non un TDAH. La seconde étape des tests est d'évaluer les capacités attentionnelles. Le plus souvent ce sont des subtests des batteries neuropsychologiques du TEA-Ch et de la NEPSY qui sont utilisés chez l'enfant. Plusieurs évaluations combinées permettent ainsi d'évaluer les différents sous-types d'attention

(soutenue, sélective et divisée). Les batteries TEA-Ch et NEPSY permettent aussi d'évaluer les fonctions exécutives et notamment les fonctions de planification, de mémoire de travail, les capacités d'inhibition, de flexibilité mentale, de sensibilité à l'interférence ou encore l'aversion au délai (Tableau 2).

Le diagnostic différentiel est une méthode permettant de différencier une maladie d'autres pathologies présentant des symptômes similaires. Comme il existe des troubles psychologiques ou physiques ayant une symptomatologie similaire au TDAH, il est important d'approfondir les évaluations pour éliminer les autres causes possibles. Par exemple, l'inattention ou l'hyperactivité peuvent être causées par un abus de drogues, d'alcool ou de médicaments. Une mauvaise alimentation, des allergies, un problème lié à la glande thyroïde ou d'autres troubles de santé peuvent avoir une incidence sur les capacités attentionnelles ou le contrôle moteur. Il se peut aussi que l'inattention soit la conséquence d'un trouble bipolaire, anxieux, un trouble de la personnalité ou un trouble schizophrénique. Un enfant ayant d'importantes difficultés familiales n'aura probablement pas beaucoup d'attention en classe et pourra montrer des comportements impulsifs voire agressifs. Le diagnostic différentiel permet d'éviter le diagnostic d'enfants qui ne présentent pas ce trouble (faux positifs) et éviter de ne pas diagnostiquer le TDAH alors que l'enfant présente ce trouble (faux négatifs). Une fois le diagnostic établi, des traitements adaptés sont mis en place. Le traitement du TDAH peut se faire à l'aide de deux approches complémentaires, les traitements non pharmacologiques combinés avec des traitements médicamenteux.

Tableau 1 : Critères du TDAH d'après le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM5)

Inattention	Hyperactivité-Impulsivité
Fait beaucoup de fautes d'inattention	A la bougeotte
Difficulté à soutenir son attention au travail ou dans les jeux	Difficulté à rester assis
N'écoute pas	Court ou grimpe de manière excessive
Difficulté à respecter les consignes	Difficulté à jouer calmement
Difficulté à organiser des tâches	Est « sur la brèche » ou agit comme s'il était « monté sur ressorts »
N'aime pas ou évite les tâches requérant de l'attention	Parle trop
Perd des objets	Laisse échapper des réponses
Aisément distrait	Difficulté à attendre son tour
Distrait dans les activités quotidiennes	Interrompt ou s'immisce souvent dans les conversations

Critères du DSM5 évaluant l'inattention et l'hyperactivité-impulsivité, le patient doit présenter au moins 6 critères pour l'inattention et/ou l'hyperactivité-impulsivité depuis au moins six mois.

Tableau 2 : Liste des différents tests neuropsychologiques pouvant être effectués dans le diagnostic du TDAH

Processus Cognitif	Tests Utilisés
Attention soutenue	Tests de barrage Batterie TEA-CH CPT Conners
Attention sélective - Inhibition	Test de Stroop Batterie TEA-CH NEPSY-2
Attention divisée	Trail making test Batterie TEA-CH
Flexibilité	Test des classements Test des cartes Wisconsin NEPSY-2
Impulsivité, Aversion au délai	Test d'appariement d'images Test des Labyrinthes (Laby 5-12)
Planification, Résolution de problèmes	Tour de Londres
Mémoire de travail	Empan de chiffres Blocs de Corsi
Fluidité	NEPSY-2

I.3 - Les traitements

I.3.a - Les traitements non pharmacologiques

Plusieurs raisons expliquent l'utilisation d'approches non pharmacologiques dans le traitement du TDAH. Premièrement, certains patients ne répondent pas de manière adaptée aux traitements médicamenteux et d'autres peuvent parfois rencontrer des effets secondaires négatifs. De plus, le traitement médicamenteux seul ne donne pas de résultats optimaux sur tous les symptômes du TDAH. Enfin, certains patients ne peuvent pas avoir accès aux traitements pharmacologiques à cause de leur trop jeune âge, du refus des parents ou médecins ou encore à cause de restrictions gouvernementales (Faraone et al., 2015). Les thérapies comportementales sont largement utilisées dans le cadre de traitements non pharmacologiques et sont recommandées en première intention pour les enfants d'âge préscolaire par l'American Academy of Pediatrics. Elles reposent sur le principe d'apprentissage avec des renforcements positifs ou négatifs afin de réduire les comportements inappropriés, d'augmenter l'estime de soi et d'améliorer les relations sociales. Il existe un éventail d'approches dont la thérapie cognitivo-comportementale (TCC), l'entraînement cognitif et la formation des parents.

La TCC est axée sur l'interaction entre les fonctions cognitives, les émotions et les comportements des patients (Van Cleave and Leslie 2008). Elle cible les habiletés organisationnelles et la gestion du temps pouvant réduire la frustration parfois responsable des comportements impulsifs. Une étude montre que cette thérapie modifie le cerveau des adultes atteints de TDAH, notamment sur le réseau fronto-pariétal et le cervelet (Wang et al., 2016). Une autre étude a démontré que l'efficacité de la TCC est plus importante lorsqu'elle est combinée à un traitement médicamenteux (Cherkasova et al., 2020). Malgré tout, les résultats thérapeutiques de la TCC chez les enfants et adolescents TDAH sont controversés (Antshel et al., 2014).

L'entraînement cognitif ou approche cognitive vise à aider l'enfant à adopter des comportements et des modes de pensée**s** plus réfléchis. Il s'agit « d'apprendre à apprendre » (self-instructional training). Une analyse incluant 6 essais contrôlés évalue l'efficacité des thérapies cognitives chez des enfants TDAH de 6 à 12 ans. Un effet positif à été montré y compris pour les essais sans traitement pharmacologique (Sonuga-Barke et al., 2013).

Les formations parentales sont des programmes destinés à aider les parents à mettre en place des stratégies d'encadrement des enfants TDAH. Ils permettent de fournir des conseils spécifiques adaptés aux comportements de leur enfant et à adopter des pratiques éducatives

adaptées. En effet, des interactions positives entre les parents et l'enfant favorisent le bien-être familial (HAS 2014).

Les thérapies comportementales ne remplacent pas les traitements médicamenteux mais peuvent être utilisées en complément pour renforcer les effets bénéfiques. Des études montrent qu'une approche multimodale améliore les symptômes du TDAH mais également la qualité de vie générale, en atténuant les atteintes fonctionnelles (Antshel 2015; Arnold et al., 2016). D'autres approches, telles que la méditation de pleine conscience (*Mindfulness*) et l'hypnose font actuellement l'objet de recherche avec des résultats prometteurs (*Données obtenues au laboratoire et en cours de publication*).

I.3.b - Les traitements pharmacologiques

Bien qu'il n'y ait pas de remède curatif contre le TDAH, certains médicaments peuvent avoir des effets positifs en réduisant l'intensité des symptômes d'inattention, d'impulsivité et d'hyperactivité. Il existe différentes catégories de traitements pharmacologiques, le choix du traitement se fait en fonction de la sévérité des symptômes, de la présence ou non de comorbidités ou encore de la période de l'année (par exemple pendant l'année scolaire).
Les psycho-stimulants comme le méthylphénidate et les amphétamines sont les traitements de première intention utilisés dans le TDAH et restent de nos jours les médicaments les plus couramment prescrits (Pliszka and Issues 2007). Leurs effets résultent d'un blocage du transporteur de la dopamine ou du transporteur vésiculaire VMAT2 qui a pour effet d'augmenter les taux de dopamine et de noradrénaline. Pour cela, le méthylphénidate bloque les transporteurs pré-synaptiques dopaminergiques et noradrénergiques (Figure 1), tandis que l'amphétamine permet d'augmenter la libération de dopamine dans la fente synaptique (Figure 2). Ils permettent de diminuer les symptômes du TDAH mais peuvent aussi entrainer l'apparition d'effets secondaires comme la baisse d'appétit, des troubles du sommeil, des sensations de bouche sèche et de nausées ou des tics.
Pour les patients souffrant d'effets secondaires, la classe des traitements non psycho-stimulants peut être privilégiée. Elle inclue l'inhibiteur sélectif du transporteur de la noradrénaline, l'Atomoxétine, ou l'agoniste des récepteurs α2A adrénergique, la Guanfacine. Ces traitements de deuxième intention dont les effets, la durée d'action et la tolérance et/ou les bienfaits peuvent être moins avantageux que les traitements de première intention (Faraone et al., 2006; Cascade et al., 2008). Ils sont souvent utilisés lorsque les patients

éprouvent des effets secondaires importants avec les psycho-stimulants (Banaschewski et al., 2004).
En plus des traitements pharmacologiques, d'autres traitements peuvent être mis en place sur le plan nutritionnel à l'aide de supplémentation en acide gras par exemple, mais l'efficacité de ce type de régime n'est pas encore totalement démontrée. D'autres approches suggèrent des supplémentations en vitamines mais là non plus, les résultats ne sont pas démontrés.

L'objectif des traitements contre le TDAH n'est pas la guérison mais l'amélioration de la concentration, la maitrise des gestes et du comportement, la régulation, une meilleure gestion des émotions, ainsi que de renforcer l'attention lors de tâches. À noter que les psycho-stimulants sont autorisés, car scientifiquement prouvés comme très efficace dans l'allègement des symptômes du TDAH. À dose thérapeutique, l'amélioration de la concentration et de l'attention est notable quelques heures seulement après la prise.

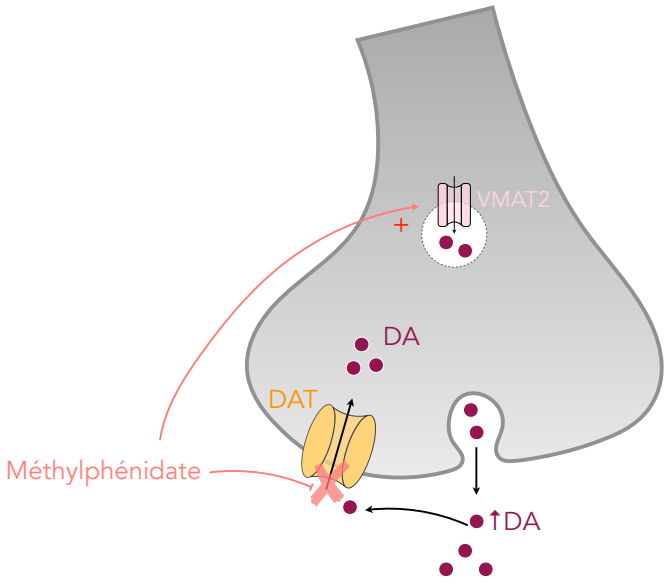


Figure 1 : Mécanisme d'action du Méthylphénidate
Abréviations : DA : Dopamine, DAT : transporteurs de la dopamine, ↑DA : augmentation de la dopamine, VMAT2 : transporteurs vésiculaires de la dopamine, + indique une stimulation et - indique une inhibition.

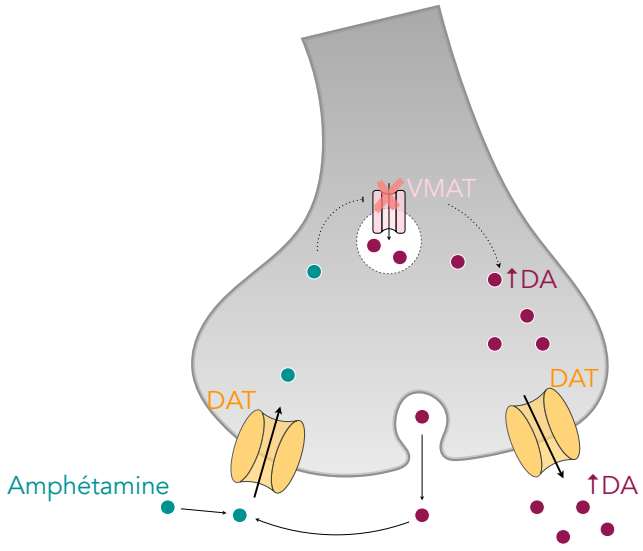


Figure 2 : Mécanisme d'action de la d-Amphétamine
Abréviations : DA : Dopamine, DAT : transporteurs de la dopamine, ↑DA : augmentation de la dopamine, VMAT2 : transporteurs vésiculaires de la dopamine et - indique une inhibition.

CHAPITRE II - Les biomarqueurs du TDAH

Un biomarqueur est un indicateur de modifications mesurables dans l'organisme pendant ou à la suite d'une pathologie (Bennett and Waters 2000).

En 1998, un groupe de travail a défini un biomarqueur comme « une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique» (Biomarkers Definitions Working 2001). Plus tard, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini un biomarqueur comme « toute substance, structure ou processus qui peut être mesuré dans le corps ou ses produits et influencer ou prédire l'incidence de l'issue ou de la maladie ». Cette définition plus large prend en compte les effets potentiels des traitements voire même l'exposition à différentes substances (Strimbu and Tavel 2010). Il existe plusieurs catégories de biomarqueurs (Ramautar et al., 2013) :

- Les biomarqueurs de susceptibilité permettent de mettre en évidence la survenue d'une pathologie avant l'apparition des premiers symptômes. Ils peuvent inclure des biomarqueurs pronostiques (prédisent les caractéristiques évolutives propres à une pathologie) et les biomarqueurs prédictifs (prédisent par exemple la réponse à un traitement).

- Les biomarqueurs de pathologies sont utilisés pour la classification de la pathologie incluant les facteurs de risques associés et peuvent être utilisés pour le diagnostic (Subramanyam and Goyal 2016). Par exemple, un groupe de métabolites (profil/empreinte métabolique) peut être utilisé comme biomarqueur. La métabolomique a déjà permis de proposer des signatures métaboliques particulières pour plusieurs pathologies neurologiques ou neuropsychiatriques telles que la dépression (Kawamura et al., 2018), les troubles du spectre autistique (TSA) (Dieme et al., 2015), la schizophrénie (Kaddurah-Daouk 2006) ou encore la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Lanznaster et al., 2018) mais aussi différents cancers (Odunsi et al., 2005).

Le TDAH est un trouble du neurodéveloppement très hétérogène dont les causes ne sont pas encore connues et dont le diagnostic peut manquer de sensibilité (faux positifs). Disposer de biomarqueurs biologiques précoces du TDAH permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de ce trouble et apporterait une aide au diagnostic. Ces biomarqueurs permettraient de traiter le plus rapidement possible et de discriminer les patients atteints de TDAH d'autres pathologies comme la déficience intellectuelle, le trouble de l'anxiété généralisée, ou encore d'autres troubles spécifiques de l'apprentissage comme la dyslexie.

Des études ont tenté de mieux comprendre la physiopathologie du TDAH à l'aide de théories neuopsychologiques tandis que d'autres ont essayé d'identifier des marqueurs biologiques à l'aide d'études génétiques, de neuro-imagerie ou des études biochimiques. Ces études ce sont principalement concentrées sur le système dopaminergique mais de plus en plus d'études s'intéressent à d'autres neurotransmetteurs comme la sérotonine voire à d'autres facteurs.

II.1 - Théories neuropsychologiques

De nombreuses théories neuropsychologiques ont été proposées afin de mieux comprendre le TDAH. Une des premières théories, établie par Russel Barkley en 1997, suggère que la physiopathologie du TDAH serait liée à des troubles des fonctions exécutives (Barkley 1997). Les fonctions exécutives sont des processus cognitifs de haut niveau et sont nécessaires pour réaliser des tâches telles que la planification, l'organisation, l'élaboration de stratégies, pour être attentif et se rappeler de détails, et pour gérer le temps et l'espace (Chan et al., 2008). Selon Barkley, les fonctions exécutives les plus altérées dans le TDAH seraient la mémoire de travail, l'internalisation du langage, l'autorégulation des affects, de la motivation et de l'éveil, et les capacités de reconstitution. La mémoire de travail est un type de mémoire à court terme permettant de retenir des informations pendant de courtes périodes afin de réaliser une action. L'internalisation du langage permet à l'homme de se questionner et d'évaluer une situation avant d'y répondre. La gestion des réactions émotionnelles, de la motivation et de l'éveil permet de garder une certaine objectivité dans le choix d'actions pour réaliser une tâche. Enfin, les capacités de reconstitution permettent d'analyser son comportement en fonction d'expériences antérieures. Une altération de ces fonctions chez les patients atteints de TDAH serait à l'origine d'un dysfonctionnement d'inhibition comportementale à l'origine des symptômes (Figure 3).

Un second modèle, plus récent, est le modèle à deux voies de Sonuga-Barke qui ajoute une valence motivationnelle à celui de Barkley. Il suggère une aversion au délai permettant d'expliquer les comportements d'inattention, d'hyperactivité et d'impulsivité, puisqu'en plus des altérations des fonctions exécutives, il ajoute un dysfonctionnement du circuit de la récompense (Sonuga-Barke 2003). Des études montrent que les enfants TDAH sont sensibles aux renforcements mais que cette sensibilité est de courte durée (Sagvolden et al., 1998). De plus, ce modèle stipule qu'un déficit de la capacité à supporter les délais de gratification et par conséquent, une tendance à rechercher des gratifications directes et immédiates serait un des éléments centraux dans le TDAH. D'après ce modèle, les patients atteints de TDAH tenteraient d'avoir une récompense plus rapidement, même si celle-ci est moins importante et donc de prendre une décision plutôt impulsive.
Cependant, lorsque le patient n'a d'autre choix que d'attendre, il va essayer de diminuer le temps d'attente en développant des comportements hyperactifs ou en fixant son attention sur autre chose (Sonuga-Barke 2003) (Figure 4).

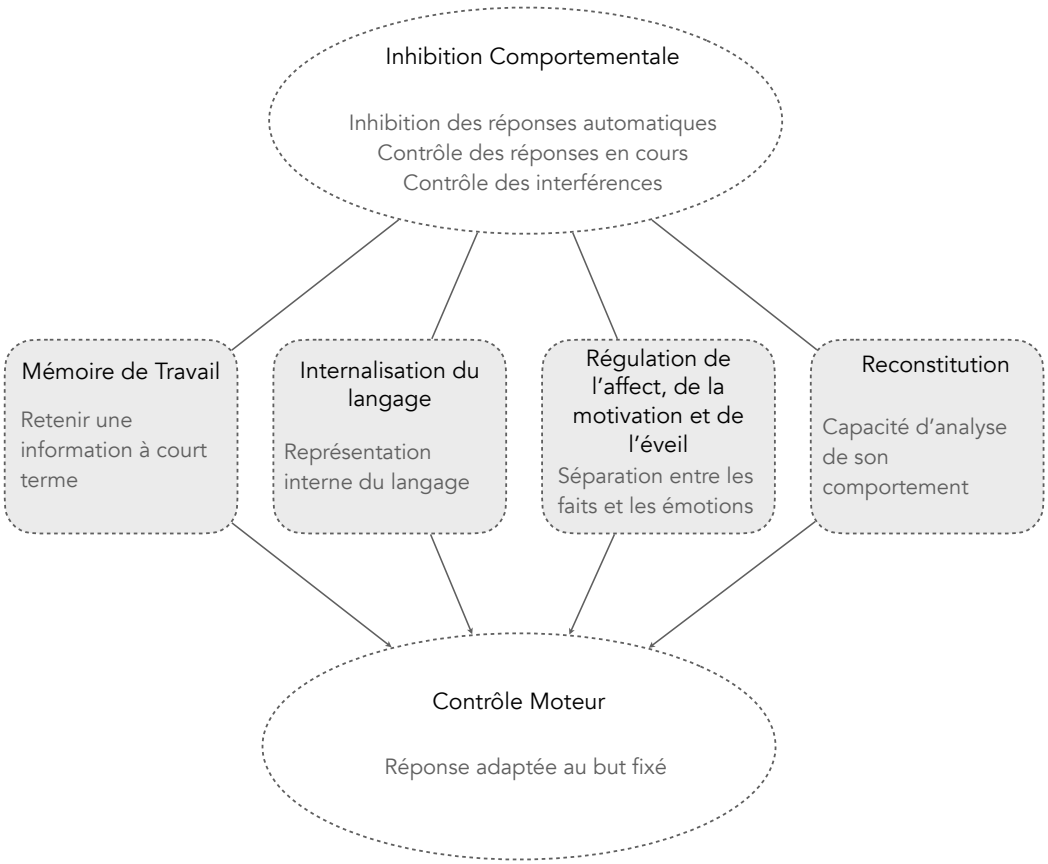


Figure 3 : Schéma simplifié du modèle de Barkley (1997).
Schéma montrant le lien entre l'inhibition comportementale et les fonctions exécutives permettant le contrôle moteur.

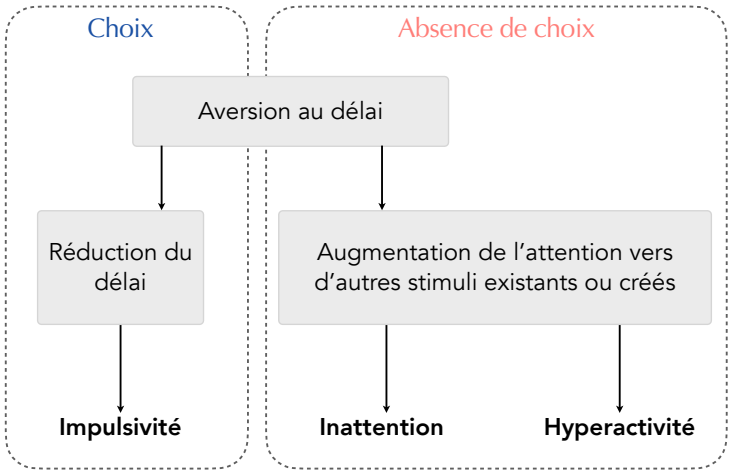


Figure 4 : Représentation schématique de l'aversion au délai en condition de choix et de non choix chez le patient TDAH.

Le modèle « Cognitivo-Affectif » de Nigg et Casey ajoute une altération des circuits fronto-cérébelleux et fronto-limbique pour expliquer des difficultés supplémentaires concernant la perception du temps et les problèmes affectifs. D'après ce modèle, les trois circuits neuronaux pouvant être impliqués dans le TDAH sont :

- Le circuit fronto-striatal impliqué dans les fonctions de mémoire de travail et de sélection des réponses ;
- Le circuit fronto-cérébelleux impliqué dans la gestion des informations temporelles ;
- Le circuit fronto-limbique impliqué dans l'apprentissage des renforcements et punitions ainsi que dans les comportements d'évitement.

Le contrôle cognitif serait lié aux circuits fronto-striatal et fronto-cérébelleux. Le cervelet et le striatum projettent tous les deux vers le cortex pré-frontal via le thalamus (Nigg and Casey 2005). La détection d'un nouvel évènement ou d'une récompense inattendue (« Quoi ») est liée au circuit fronto-striatal alors que l'alerte et la notion de durée (« Quand ») sont liées au circuit fronto-cérébelleux. Un dysfonctionnement de ces circuits pourrait entrainer une altération des capacités de régulation et donc une altération du comportement comme l'inattention. Cette altération pourrait entraîner des problèmes comportementaux lorsque des évènements ne sont pas anticipés par le patient. En ce qui concerne le contrôle affectif, une dérégulation du circuit fronto-limbique entrainerait une mauvaise intégration des conséquences de ses actes, pouvant se refléter dans les comportements hyperactifs-impulsifs des patients atteints de TDAH (Figure 5).

Des chercheurs ont proposé « l'hypothèse neuroénergétique » du TDAH. Issue du modèle cognitivo-énergétique de Sergeant, la théorie neuro-énergétique comportementale est une théorie expliquant le ralentissement et les fluctuations du fonctionnement attentionnel caractéristiques du TDAH (Sergeant, 2005 ; Killeen et al., 2013). Selon Killeen & collaborateurs (2013), les neurones des patients diagnostiqués TDAH ne seraient pas fournis adéquatement en ressources énergétiques (lactate) requises pour délivrer des décharges de manière prolongée et précise. Cette insuffisance énergétique pourrait être liée au dysfonctionnement de l'une ou l'autre des composantes impliquées dans le transport du lactate des astrocytes aux neurones. En l'absence de l'énergie requise, la persistante dans une activité perceptive, cognitive ou motrice serait rendue difficile. (Russell et al., 2006; Killeen et al., 2012).

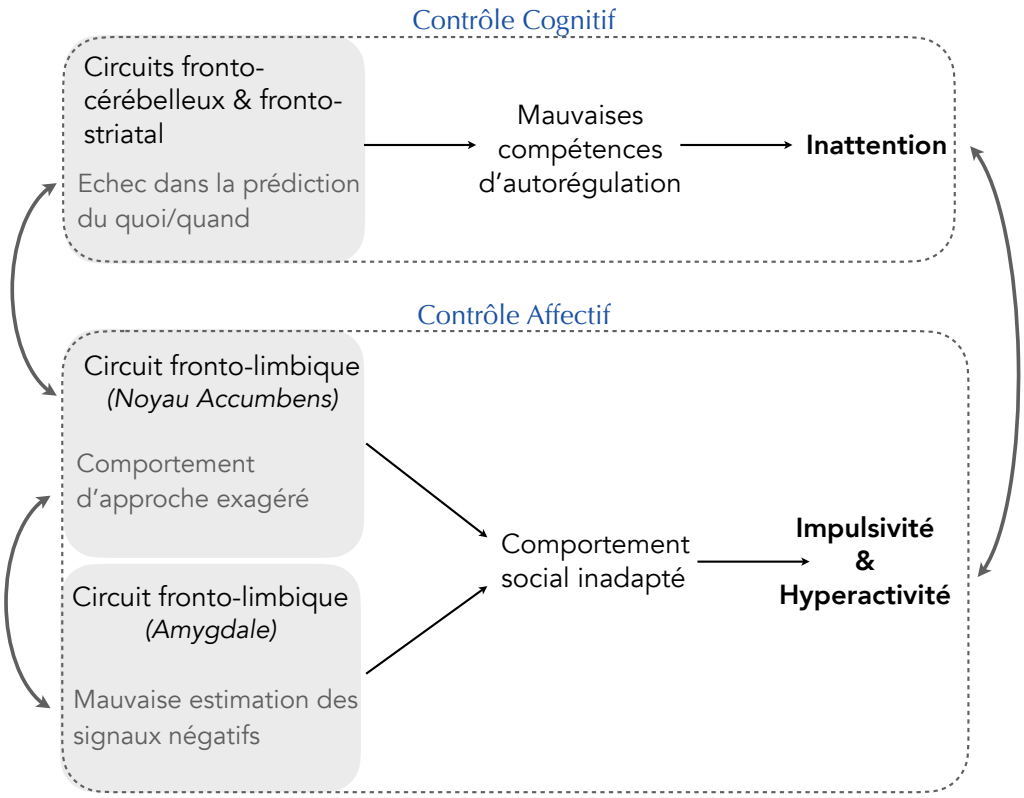


Figure 5 : Représentation schématique des circuits impliqués dans le modèle Cognitivo-Affectif de Nigg & Casey.

Les doubles flèches représentent les interactions possibles entre les différents circuits et les différents symptômes.

II.2 - Marqueurs génétiques

L'étiologie du TDAH demeure inconnue et serait multifactorielle, impliquant à la fois des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux (Faraone et al., 2005). Une récente méta-analyse réalisée sur des jumeaux montre que le taux d'héritabilité du TDAH est estimé entre 77% et 88% (Faraone and Larsson 2019). Les premières études génétiques cherchaient des polymorphismes des gènes possiblement impliqués dans le TDAH, notamment du système dopaminergique.

Le gène du transporteur de la dopamine (DAT1 ; SLC6A3) et le gène du récepteur de la dopamine (DRD4) ont été les plus fréquemment étudiés. Différents polymorphismes de ces gènes ont été associés avec le TDAH (Tong et al., 2015). Le gène DRD4 est situé sur le chromosome 11p15.5, la majorité des études se sont intéressées sur un polymorphisme de l'exon III du gène où se situent des répétitions en tandem à nombre variable (Variable Number of tandem repeat, VNTR). Le nombre de répétitions varie entre 2 et 11 et ce polymorphisme semble fonctionnel. Le polymorphisme contenant 7 répétitions est corrélé avec le TDAH (Faraone et al., 2001; Faraone et al., 2005). Une autre étude a également montré cette association et suggère que le polymorphisme de 5 répétitions augmenterait le risque de développer un TDAH (Li et al., 2006). Le gène du transporteur de la dopamine (SLC6A3) situé sur le chromosome 5p13.3 a longtemps été considéré comme le gène candidat du TDAH. La raison principale est que le DAT est responsable de la recapture pré-synaptique de la dopamine et qu'il est la cible du principal traitement, le MPH (Thapar and Stergiakouli 2008). Le polymorphisme le plus étudié est le VNTR dans la région 3′ UTR du gène avec l'ajout de 480 paires de bases (pb) (Maher et al., 2002; Faraone et al., 2005). Mais ces résultats sont controversés, d'autres études n'ont pas mis en évidence le lien entre cette mutation et le TDAH (Li et al., 2006). Le gène du récepteur DRD5 situé sur le chromosome 4p15.1-15.3 est aussi impliqué dans le TDAH. Une étude a montré qu'un polymorphisme de répétitions de deux nucléotides dans la région 5′ du gène était associé au TDAH (Maher et al., 2002).

Aucun consensus clair ne se dégage vis à vis des polymorphismes du système dopaminergiques associés au TDAH. C'est pourquoi d'autres études ont analysé d'autres systèmes de neurotransmission comme la sérotonine. Un polymorphisme du gène codant pour le transporteur de la sérotonine (5HTT) et des gènes codant pour deux récepteurs (5-HTR1B et 5-HTR2A) sont associés au TDAH (Mick and Faraone 2008).

Plus récemment, les études d'association analysant le génome complet (GWAS) ont été réalisées. Ces analyses ont montré que le TDAH serait très certainement un syndrome polygénique (Faraone and Larsson 2019). La majorité des gènes impliqués dans le TDAH codent pour des protéines (récepteurs ou transporteurs) des neurotransmetteurs et 10 gènes présentent des variations significatives présentées dans le tableau 3 (Gizer et al., 2009; Purper-Ouakil et al., 2011; Hawi et al., 2015).

Les preuves de l'implication des gènes comme facteurs de risque du TDAH n'excluent pas l'impact environnemental. Les facteurs de risques environnementaux peuvent jouer un rôle dans l'étiologie du TDAH, notamment via des mécanismes épigénétiques mais ne sont pas majoritairement étudiés. Des données suggèrent qu'une exposition prénatale à diverses substances toxiques telles que la nicotine, la cocaïne, l'alcool ou encore des expositions à certaines toxines comme des pesticides ou du zinc augmenteraient le risque de développer un TDAH (Linnet et al., 2003; Biederman and Faraone 2005). D'autres évènements prénataux tels que les anémies ou les infections virales seraient aussi des facteurs de risque, de même qu'une naissance prématurée, un stress hypoxique ou un faible poids à la naissance (Millichap 1997; Biederman and Faraone 2005; Faraone et al., 2015; Sciberras et al., 2017).

L'étiologie du TDAH demeure inconnue et serait multifactorielle, impliquant à la fois des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux. Les études génétiques n'ont pas permis d'identifier totalement les causes du TDAH, c'est pourquoi d'autres analyses comme des études d'imagerie ont été réalisées.

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la physiopathologie du TDAH

Gènes impliqués dans neurotransmission monoaminergique			Gènes impliqués dans la neurotransmission
Dopamine	Noradrénergique	Sérotonine	
DAT1/SLC6A3	NET/SLC6A2	5-HTT/SLC6A4	SNAP 25
DRD4	ADRA2A	HTR1B	SLC6A9
DRD5	ADRA2C	HTR2A	LPHN3
DBH			GIT1
			NOS1

Liste des gènes impliqués dans le TDAH codant pour des protéines de la neurotransmission monoaminergique, des protéines de la neurotransmission et de la plasticité. D'après Mick et al., 2008 ; Puper-Ouakil et al., 2010 ; Faraone et al., 2019).

II.3 - Etudes de neuro-imagerie clinique

Les études d'imagerie se sont, elles aussi, largement focalisées sur le système dopaminergique. Les études quantifiant la densité de DAT à l'aide de la Tomographie par Emission de Positons (TEP) présentent des résultats contradictoires. Certaines montrent une augmentation de la densité en DAT dans le striatum (Dougherty et al., 1999), d'autres ne montrent pas de différence (van Dyck et al., 2002) voire même une diminution (Volkow et al., 2007) (Figure 6). Ces différences peuvent être dues à l'hétérogénéité phénotypique des patients atteints de TDAH mais aussi aux différences de méthodologie. En effet, ces études n'utilisent pas les mêmes radiotraceurs. Dougherty et ses collaborateurs et Van Dyck et ses collaborateurs ont utilisé des radiotraceurs présynaptiques ciblant le DAT (123I-Altropane et 123Iß-CIT respectivement) alors que Volkow et ses collaborateurs ont utilisé un radiotraceur postsynaptique ciblant le récepteur dopaminergique D2 (11C raclopride). Ces différences de méthodologie associées à l'hétérogénéité phénotypique du TDAH peuvent expliquer les différences de résultats obtenus.
Une étude s'est intéressée plus précisément au striatum et a montré une augmentation de la densité de DAT spécifiquement dans le noyau caudé (Spencer et al., 2007) (Figure 7). Cette étude a utilisé le radiotraceur ciblant les DAT, le 11C-Altropane qui est la même molécule que dans l'étude de Dougherty ayant des conclusions similaires.
Les résultats de ces études sont contrastés ne permettent pas d'apporter, à l'heure actuelle une aide pour le diagnostic. Dans le but de mieux caractériser ce trouble, d'autres études d'imagerie ont été réalisées.

Une autre étude TEP a utilisé un analogue du glucose radiomarqué (du 18F-Fluoro-2-deoxy-D-glucose, 18F-FDG) pour mesurer le métabolisme cérébral du glucose. Cette étude a montré une diminution de 8,1% du métabolisme global chez les patients ADHD (Zametkin et al., 1990) (Figure 8). Cette diminution du métabolisme global est plus précisément retrouvée dans le cortex cingulaire antérieur, le cortex prémoteur et le cortex somatosensoriel. Des études en IRM fonctionnelle montrent aussi une hypoactivité du cortex cingulaire antérieur qui joue un rôle dans l'attention, la cognition ou encore la prise de décision (Durston et al., 2007; Bush 2010). Le TDAH a aussi été associé avec une hypoactivité du cortex pré-frontal dorso-latéral et ventro-latéral, du cortex pariétal, du noyau caudé et du thalamus (Dickstein et al., 2005) et du cervelet (Schneider et al., 2006). Ces études suggèrent des anomalies des circuits fronto-pariétaux, fronto-striataux et fronto-cérébelleux.

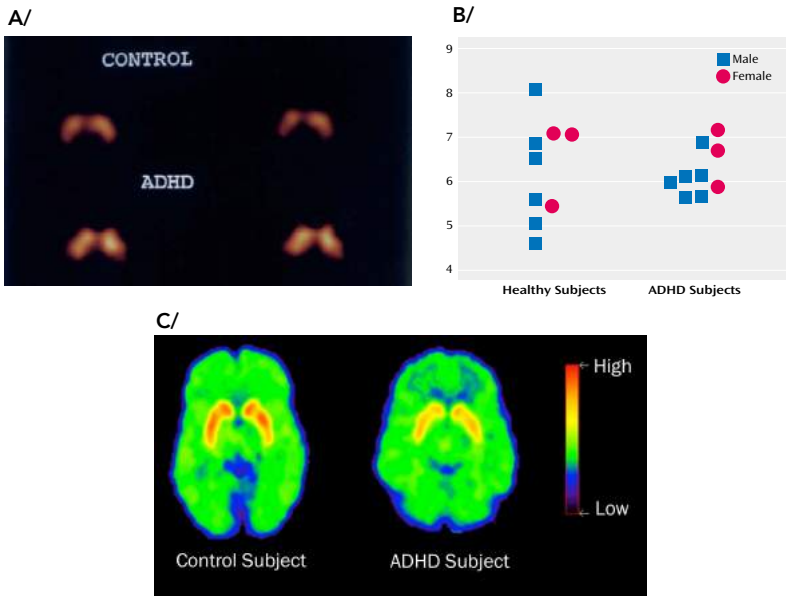
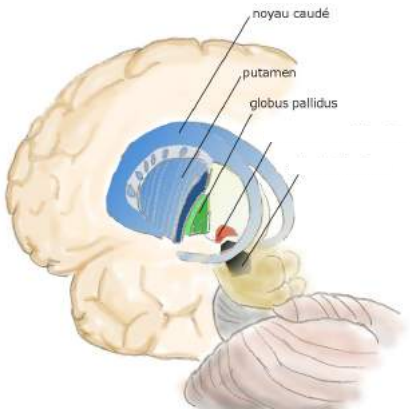


Figure 6 : Imagerie présentant la densité de DAT dans le striatum
A/ Distribution augmentée du DAT dans le striatum chez l'enfant TDAH par rapport aux enfants témoins (Dougherty et al., 1999).
B/ Distribution égale du DAT dans le striatum entre les adultes TDAH et témoins (Van Dyck et al., 2002).
C/ Distribution diminuée du DAT dans le striatum chez l'adulte TDAH comparé aux témoins (Volkow et al., 2005).



	ADHD (N=21)		Controls (N=26)		
	Mean	±SD	Mean	±SD	p-value
Right Putamen	3.07	0.50	3.00	0.40	0.64
Left Putamen	3.13	0.37	3.02	0.39	0.36
Right Caudate	3.44	0.62	2.99	0.48	0.008
Left Caudate	3.41	0.78	3.10	0.55	0.11

Figure 7 : Densité du DAT dans le noyau caudé.
Etude montrant une augmentation de densité de DAT spécifiquement dans le noyau caudé chez les adultes TDAH comparés aux témoins (Spencer et al., 2007).

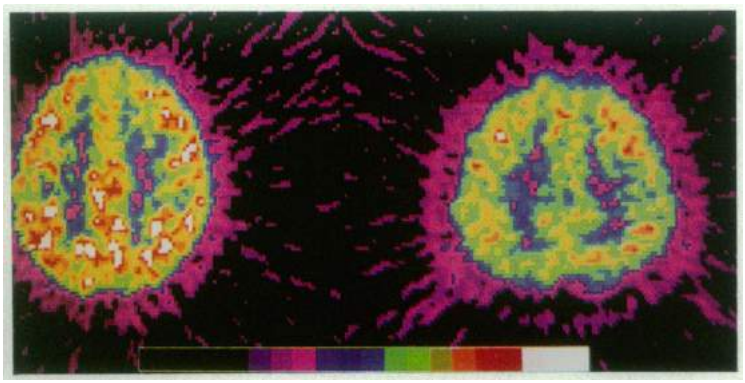


Figure 8 : Image transversale de l'activité métabolique cérébrale représentative d'un sujet sain (à gauche) et d'un patient TDAH (à droite).
Le cortex frontal est orienté vers le haut de l'image. Les couleurs jaune, orange et rouge représentent le métabolisme du glucose le plus élevé et les couleurs bleue, verte et violette représentent le métabolisme du glucose le plus faible (d'après Zametkin et al., 1990).

Des études par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ont été réalisées pour étudier les modifications neuro-anatomiques chez les patients atteints de ce trouble. Plusieurs études ont montré une diminution de 3 à 5% du volume cérébral total (Castellanos 2002; Seidman et al., 2005) confirmée par des études statistiques de méta-analyses (Valera et al., 2007; Nakao et al., 2011; Hoogman et al., 2017). Plus précisément, ces diminutions sont retrouvées dans des régions corticales telles que le cortex pré-frontal et le cortex cingulaire antérieur (Castellanos et al., 1996) ou encore des régions sous-corticales telles que le noyau lenticulaire (putamen et globus pallidus) et le noyau caudé (Valera et al., 2007; Ellison-Wright et al., 2008; Norman et al., 2016) ainsi que le noyau accumbens, l'amygdale et l'hippocampe (Hoogman et al., 2017). De plus, quelques études reportent des différences structurales du cervelet chez les patients atteints de TDAH (Castellanos 2002; Valera et al., 2007; Bledsoe et al., 2009) (Figure 9).

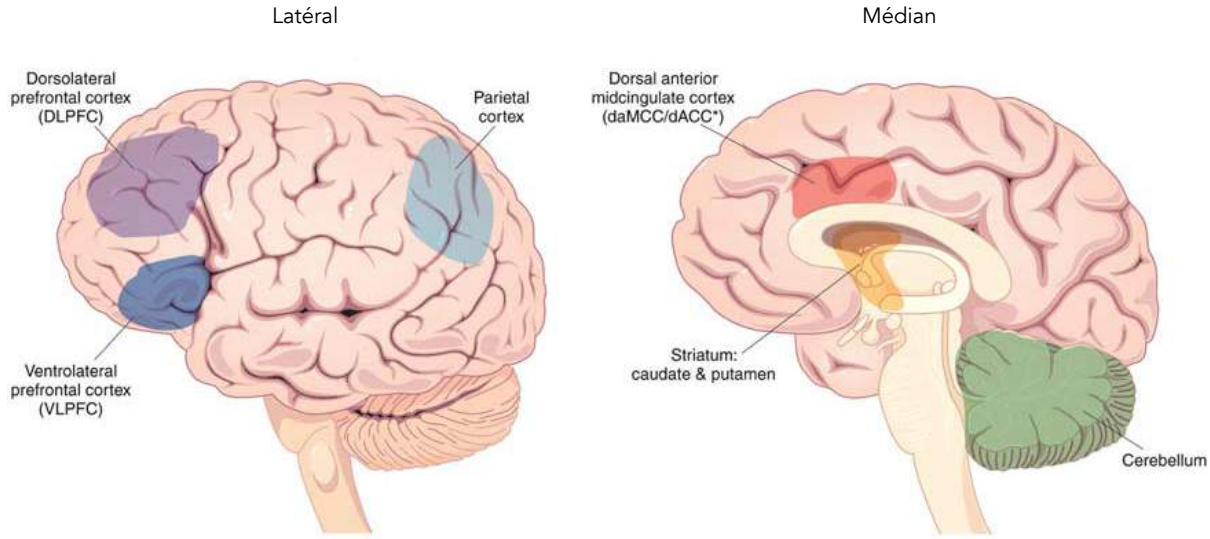


Figure 9 : Schéma représentant les différentes régions cérébrales impliquées dans le TDAH. (d'après Bush, 2010).

Un dernier réseau neuronal est de plus en plus étudié dans le TDAH, il s'agit du réseau du mode par défaut (Default Mode Network ou DMN). Le DMN est composé de différentes régions cérébrales telles que, le précuneus, le cortex cingulaire postérieur, le cortex préfrontal médio-latéral et le cortex pariétal inférieur. Les régions cérébrales du DMN sont actives lorsque le sujet n'est engagé dans aucune tâche cognitive et ces régions doivent se désactiver dès qu'une tâche cognitive est initiée (Raichle et al., 2001; Broyd et al., 2009). Pour réussir une tâche cognitive, il est important que les régions du DMN se désactivent, mais des études sur les patients atteints de TDAH montrent une difficulté de ces régions à se désactiver entraînant un retard à l'initiation de la tâche et un parasitage en cours de réalisation de la tâche (Liddle et al., 2011) (Figure 10).

Les études d'imagerie apportent des informations concernant la physiopathologie du TDAH et suggèrent une altération des réseaux fronto-striataux, fronto-pariétaux, fronto-cérébelleux et du DMN. Mais les résultats cherchant à identifier des biomarqueurs sont contrastés très probablement en raison de l'hétérogénéité des patients et ne permettent pas d'apporter une aide au diagnostic. De plus, les études de neuro-imagerie sont onéreuses pour être réalisées en diagnostic de routine. Des études biochimiques se sont intéressées au marqueurs sanguins et urinaires afin de proposer des potentiels biomarqueurs.

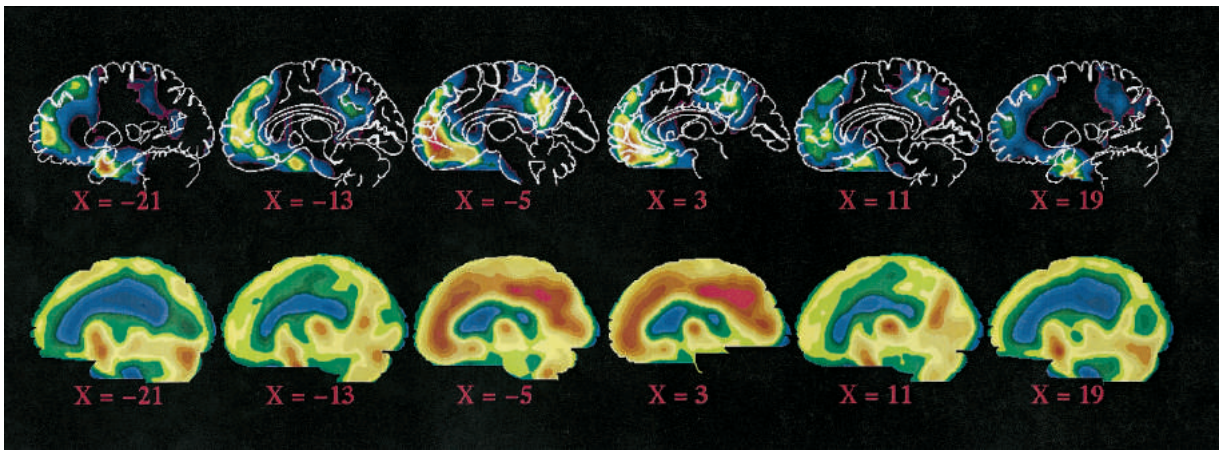


Figure 10 : Réseau du mode par défaut (DMN) chez l'Homme.
Coupes sagittales d'imagerie TEP représentant les régions cérébrales du DMN.
La première ligne représente les régions cérébrales dont l'activité diminue durant une tâche cognitive.
La deuxième ligne correspond aux régions cérébrales actives lorsque la personne est engagée dans aucune tâche cognitive : cortex frontal médian, cortex temporal, lobe pariétal inférieur cortex cingulaire postérieur (cortex associatif participant aux processus attentionnels), hippocampe et cortex para-hippocampique (Raichle et al., 2001).

II.4 - Les biomarqueurs biochimiques du TDAH

II.4.a - Le système dopaminergique

Une étude de Baker et collaborateurs en 1991 a montré une diminution du taux de phénylalanine, précurseur de la synthèse de la dopamine, dans des échantillons plasmatiques d'enfants TDAH non traités par rapport au groupe témoin. Cette diminution n'a pas été retrouvée dans les urines (Baker et al., 1991) (Figure 11). La phénylalanine sanguine peut passer la BHE à travers un transporteur (LAT1) et donc exercer une influence sur la biosynthèse cérébrale de dopamine. Une deuxième étude, mais cette fois sur des enfants traités par un psychostimulant n'a pas montré de différence du taux de phénylalanine dans les urines ni dans le plasma, de même pour le taux de tyrosine (Bergwerff et al., 2016). De plus, une supplémentation en phénylalanine ne montre pas d'amélioration des symptômes (Wood et al., 1985). La phénylalanine étant un acide aminé essentiel, ces résultats peuvent donc être dûs aux différences de régimes alimentaires des patients ou à une différence d'assimilation.

La phénylalanine est métabolisée en phényléthylamine (PEA) et en tyrosine (Figure 11). Deux études ont montré une diminution du taux de PEA dans les urines chez des enfants non traités (Zametkin et al., 1984; Baker et al., 1991). Le PEA est une monoamine présentant des fonctions similaires à l'amphétamine qui pourrait altérer l'attention et l'humeur du patient (Marc et al., 2011). Le PEA est ensuite métabolisé en phénylacétaldéhyde (PAA) mais aucune étude n'a montré de différence entre les patients atteints de TDAH et les témoins (Baker et al., 1991). La phénylalanine peut aussi être métabolisée en tyrosine. A ce jour, aucune étude n'a montré de différences en tyrosine dans le sang ou les urines chez des patients atteints de TDAH par rapport aux témoins (Wood et al., 1985). La tyrosine est ensuite métabolisée en DOPA qui est elle-même métabolisée en dopamine (Figure 11). Deux études ont montré un taux de dopamine plus élevé chez les enfants TDAH non traités dans les urines (Dvorakova et al., 2007) et dans le plasma (Ionescu et al., 1990) par rapport aux témoins.

Contrairement à la dopamine, la tyrosine et la DOPA sont capables de traverser la BHE pour aller vers le cerveau à l'aide de transporteurs. Cependant, les études ne montrent pas de différences sanguines de ces deux molécules chez les patients atteints de TDAH mais montrent des différences de dopamine retrouvées en périphérie. Ce constat suggère que les différences de dopamine chez les patients atteints de TDAH sont en réalité périphériques.

La dopamine est ensuite métabolisée en acide homovanilique et en noradrénaline. L'acide homovanilique urinaire n'est pas modifié chez les patients adultes TDAH traités par MPH (Kusaga et al., 2002). La dopamine peut aussi être métabolisée en noradrénaline grâce à la

dopamine ß-hydroxylase. L'activité enzymatique de cette enzyme est diminuée chez ces patients (Caylak 2012). Une diminution de l'activité de cette enzyme pourrait entrainer une diminution du taux de noradrénaline. Des études ont confirmé cette hypothèse avec un taux plus faible de noradrénaline dans les urines (Oades et al., 1998) mais pas dans le plasma (Ionescu et al., 1990; Oades et al., 1998). Ces études sont en accord avec une altération du métabolisme dopaminergique possiblement due à une altération de l'enzyme ß-hydroxylase.
La noradrénaline peut être métabolisée en adrénaline, 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG), normetanephrine ou en acide vanillymandélique. Ces catabolites sont eux aussi modifiés chez les patients atteints de TDAH, l'adrénaline est diminuée dans les urines des enfants TDAH par rapport aux témoins (Hanna et al., 1996; Konrad et al., 2003) mais pas dans le plasma (Oades et al., 1998). Le DOPEG est lui aussi diminué dans les urines des enfants TDAH non traités (Hanna et al., 1996). La normétanéphrine et l'acide vanillymandélique sont eux augmentés dans les urines des patients traités (Kusaga et al., 2002) ainsi que dans les urines de patients non traités (Pliszka et al., 1994). Ces résultats montrent une altération du catabolisme de la dopamine. Cependant, aucune étude n'a étudié l'ensemble de cette voie métabolique en une seule analyse. De plus, les populations de ces études ne sont pas homogènes, ce qui rend les comparaisons difficiles d'autant plus que le TDAH est une pathologie dont les symptômes évoluent avec l'âge. Des analyses sur l'ensemble de la voie métabolique pourraient permettre de suivre de manière dynamique les modifications présentes chez les patients atteints de TDAH.

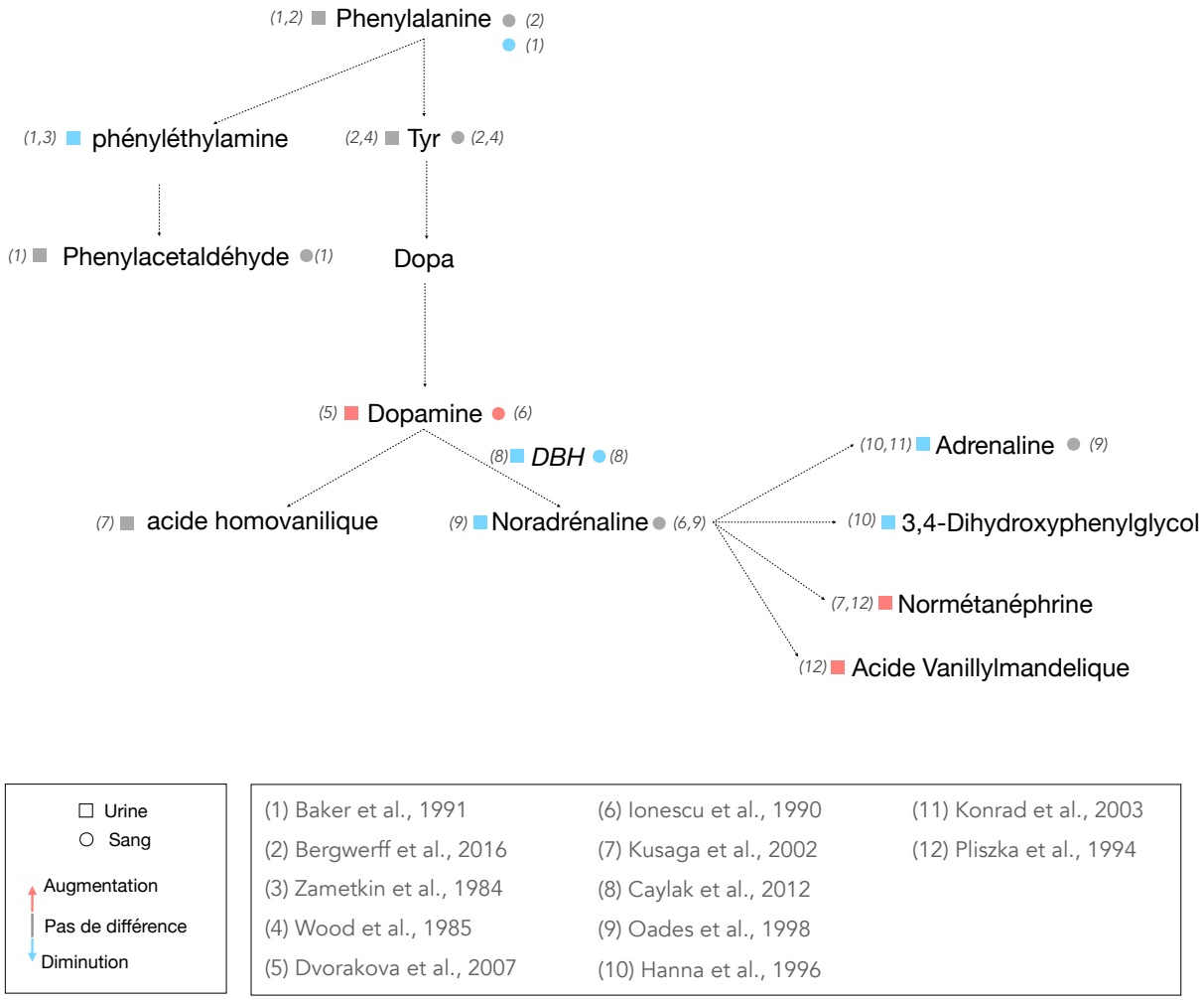


Figure 11 : Schéma de la voie de synthèse de la dopamine.

Schéma de la voie de synthèse dopaminergique, les □ représentent les urines et les ○ représentent le sang. Le rouge montre une augmentation du métabolite chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins, alors que le bleu montre une diminution du métabolite chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. Le gris montre qu'aucune différence n'a été retrouvée pour le métabolite entre les patients atteints de TDAH et les témoins.

II.4.b - Le système sérotoninergique et kynurénique

II.4.b1 - Le système sérotoninergique

Le tryptophane est un acide aminé essentiel précurseur de différents métabolites. La voie du tryptophane peut être divisée en trois parties : la voie de la kynurénine, de la sérotonine, et de l'acide quinolinique (Figure 12).

Le tryptophane peut être métabolisé en sérotonine, un neurotransmetteur essentiel au bon fonctionnement cérébral impliqué dans la régulation comportementale (humeur, appétit, émotion, cognition) (Young 2007; Marazziti 2017). Contrairement au tryptophane, la sérotonine ne peut pas traverser la BHE, ce neurotransmetteur doit donc être synthétisé dans le cerveau à partir du tryptophane. Comme le tryptophane est le précurseur de la sérotonine, des modifications de taux de tryptophane pourraient être à l'origine d'altérations de synthèse de sérotonine et donc de pathologies. Des modifications des taux de tryptophane ont été impliquées dans différentes pathologies telles que les troubles mentaux (Sainio et al., 1996; Russo et al., 2009); les troubles du sommeil (Kaczor and Skalski 2016) ou la schizophrénie (Sainio et al., 1996). Des études ont suggéré un lien entre la quantité de tryptophane circulant et la production de sérotonine, et par conséquent, comme biomarqueur potentiel pour les troubles psychiatriques (Comai et al., 2016).

Le tryptophane est augmenté chez les patients atteints de TDAH non traités par psychostimulant, dans le sérum, dans le plasma (Hoshino et al., 1985; Oades et al., 2010; Evangelisti et al., 2017) et dans les urines (Dolina et al., 2014). Elles sont en faveur d'une augmentation du tryptophane dans les fluides périphériques chez les patients atteints de TDAH et pourraient être le reflet d'un dérèglement central. Une diminution du tryptophane pouvant causer une diminution de la synthèse de la sérotonine, pourrait impacter le système attentionnel (Zepf et al., 2008; Mette et al., 2013) et les comportements impulsifs (Zepf et al., 2008) retrouvés dans le TDAH.

Plusieurs études génétiques ont suggéré un rôle de la sérotonine dans l'étiologie du TDAH. Un polymorphisme du gène codant pour le transporteur de la sérotonine (5HTT) et des gènes codant pour deux récepteurs (5-HTR1B et 5-HTR2A) sont associés au TDAH (Mick and Faraone 2008). Plusieurs études ont montré une diminution du taux de sérotonine chez les patients atteints de TDAH non traités par psychostimulant dans les plaquettes, le plasma et le sérum (Coleman 1971; Bhagavan et al., 1975; Saul and Ashby 1986; Spivak et al., 1999; Hercigonja Novkovic et al., 2009). La sérotonine peut aussi être synthétisée dans le système digestif et elle ne peut pas passer la BHE. Les modifications du taux de sérotonine observées

dans le sang des patients atteints de TDAH suggèrent une modification périphérique de la sérotonine.

Pour pallier à cette diminution, des travaux ont étudié l'impact d'une supplémentation en tryptophane sur la synthèse de sérotonine et ont montré une augmentation de la libération de sérotonine (Haleem 2012). La sérotonine peut être métabolisée en Acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA), qui n'est pas modifié chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins (Kusaga et al., 2002).

L'hypothèse la plus étudiée dans le TDAH suggère une altération dopaminergique mais cette hypothèse se base principalement sur les effets bénéfiques du MPH et les études génétiques. Cependant, des études génétiques montrent des associations entre certain polymorphisme de gènes codant pour des protéines impliquées dans d'autres systèmes de neurotransmission comme les récepteurs de la sérotonine. Les études biochimiques montrent des modifications du système sérotoninergique, il serait donc intéressant d'analyser les autres systèmes de neurotransmission.

II.4.b2 - Le système de la kynurénine

Le tryptophane est majoritairement métabolisé en kynurénine (Wolf 1974) qui peut mener à la production de NAD, un important cofacteur intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction (Khan et al., 2007). La transformation du tryptophane en kynurénine est initiée par deux enzymes : la tryptophane-2,3-dioxygenase (TDO) et l'indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) dont l'activité est régulée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les métabolites de la voie de la kynurénine peuvent avoir des propriétés neuroprotectrices et neurotoxiques pouvant contribuer à la neuroinflammation pouvant entrainer des altérations neurologiques (Cervenka et al., 2017). De plus, des taux plus faibles de tryptophane et plus élevés de kynurénine sont souvent associés aux troubles psychiatriques comme la dépression majeure (Strasser et al., 2015). Chez des patients atteints de TDAH, une augmentation du taux de kynurénine a été retrouvée dans le sérum et les urines (Evangelisti et al., 2017). La kynurénine synthétisée en périphérie peut entrer en compétition avec le tryptophane au niveau du transporteur pour le passage de la BHE (Fukui et al., 1991). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse neuroinflammatoire stipulant qu'une augmentation du taux de kynurénine pourrait entrainer une diminution de la réponse inflammatoire (Cervenka et al., 2017). Les catabolites de la kynurénine comme l'acide xanthurénique, l'acide kynurénique et l'acide anthranilique sont diminués dans le sérum des patients atteints de TDAH (Evangelisti et al., 2017). L'acide kynurénique est produit à partir la transformation de la

kynurénine via une enzyme (KAT). L'acide kynurénique ne passe pas la BHE (Fukui et al., 1991), les modifications retrouvées en périphérie dans le TDAH ne sont pas le reflet d'une altération centrale.

La mélatonine est synthétisée à partir du tryptophane dans l'épiphyse ou dans le système digestif. Elle est connue comme l'hormone du sommeil car elle est principalement libérée le soir pour permettre l'endormissement. L'épiphyse capte le tryptophane directement dans le sang puisqu'elle est située en dehors de la BHE (Yu et al., 2016). Une étude a mesuré le taux de 6-hydroxymelatoninesulfate (6-OH-MS), le produit urinaire majeur de la dégradation de la mélatonine, et a montré son augmentation dans le groupe TDAH par rapport aux témoins (Buber et al., 2016). Les troubles du sommeil sont fréquemment retrouvés chez les patients atteints de TDAH (Cortese et al., 2009) (Annexe 1) et pourraient être en lien avec une modification de la synthèse et/ou dégradation de la mélatonine.

Ces différentes études montrent une implication du métabolisme du tryptophane qui pourrait être en lien avec la physiopathologie du TDAH. Une modification des taux de tryptophane périphérique pourrait entrainer des modifications cérébrales de la biosynthèse de la sérotonine ou de la kynurénine. L'implication de ces métabolites dans le TDAH reste encore à déterminer mais ils pourraient être identifiés comme de potentiels biomarqueurs de la pathologie.

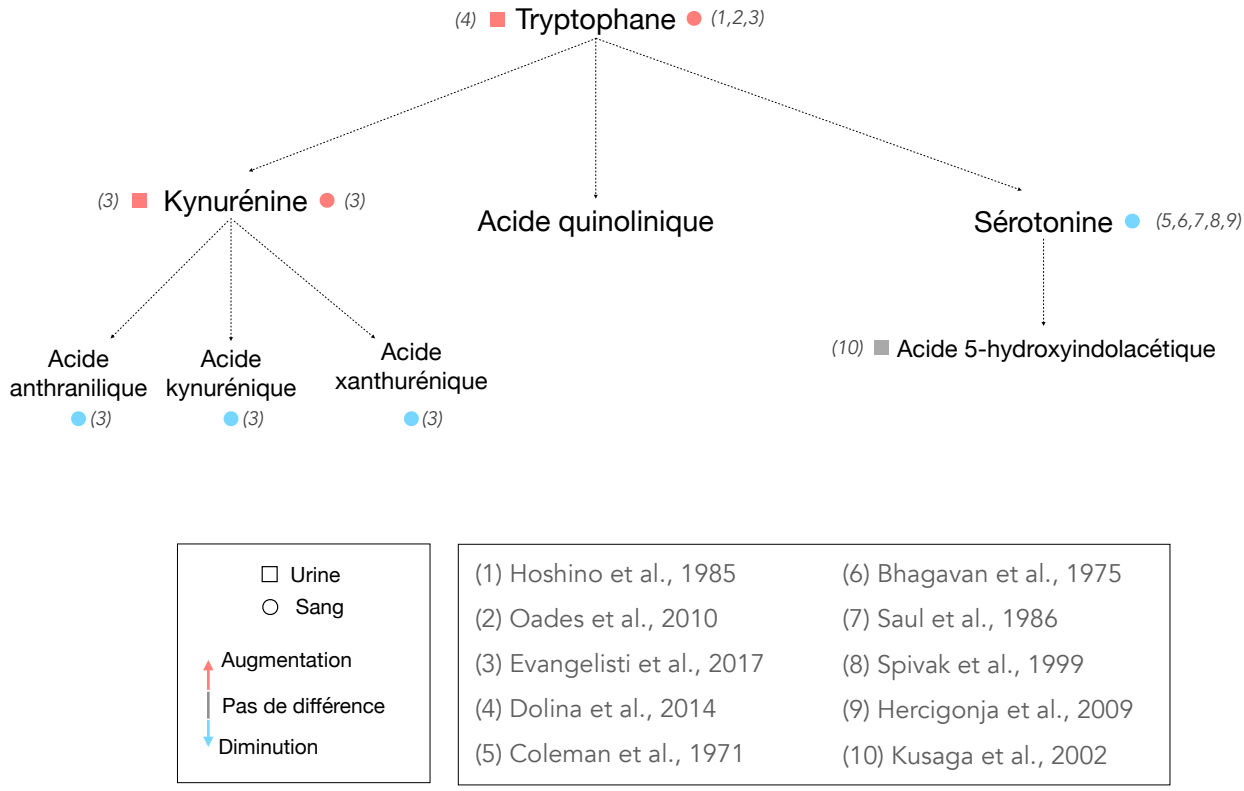


Figure 12 : Schéma de la voie de synthèse de la sérotonine.

Schéma de la voie de synthèse sérotoninergique, les □ représentent les urines et les ○ représentent le sang. Le rouge montre une augmentation du métabolite chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins, alors que le bleu montre une diminution du métabolite chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. Le gris montre qu'aucune différence n'a été retrouvée pour le métabolite entre les patients atteints de TDAH et les témoins.

II.4.c - Les facteurs de croissance

D'autres métabolismes ont été étudiés comme potentiels biomarqueurs du TDAH. C'est le cas pour les facteurs de croissance. Un facteur de croissance est une substance régulatrice présente en petites quantités nécessaire à la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Le tableau 4 résume les facteurs de croissance étudiés dans les différentes matrices du TDAH et seront développés dans les parties suivantes.

Tableau 4 : Liste des facteurs de croissance étudiés dans le TDAH

		Sang	Salive
Les facteurs neurotrophiques	**NGF**	↗ (Guney et 2014) ; — (Bilgic et al 2017)	
	BDNF	↗ (Shim et al 2008) ; — (Bilgic et al 2017) ; ↘ (Corominas-Roso et al 2013)	
	GDNF	↗ (Shim et al, 2008; Bilgic et al 2017)	
	NT3	↗ (Bilgic et al 2017)	
Les hormones	**Ocytocine**	↘ (Sasaki et al 2015)	
	Adiponectine	↘ (Mavroconstanti et al 2014; Yurteri et Sahin, 2020)	
	T4	↘ (Kuppili et al, 2017) ; — (Toren et al, 1997)	
	Cortisol	— (Kuppilie et al, 2017)	↘ (Angeli et al, 2018)
Les vitamines	**B2**	↘ (Landaas et al, 2016)	
	B6	↘ (Landaas et al, 2016)	
	B9	↘ (Landaas et al, 2016)	
	D	↘ (Goksugur et al, 2014; Kamal et al, 2014)	

II.4.c1 - Les facteurs de croissances neurotrophiques

Plus précisément, certains facteurs de croissance neurotrophiques sont nécessaires pour le développement embryonnaire tels que le facteur de croissance nerveux (Nerve Growth Factor, NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) ou encore les facteurs neurotrophiques 3, 4 et 5 (Neutrophic Factor, NT3, NT4 & NT5) (Snider 1994). Les neurotrophines jouent un rôle dans la prolifération des neurones, les fonctions synaptiques et la plasticité cérébrale. Plus précisément, le NGF et le BNDF ont un rôle majeur dans le développement de l'hippocampe et le cortex pré-frontal ; deux régions cérébrales clés dans les pathologies psychiatriques (Guney et al., 2014). Une expression anormale de ces derniers pendant l'embryogenèse pourrait être à l'origine de pathologies du neurodéveloppement comme le TDAH ou les troubles du spectre autistique (TSA). Il est important de noter que les facteurs neurotrophiques peuvent passer la BHE à l'aide de transporteurs, suggérant que les taux retrouvés en périphérie peuvent être le reflet du cerveau (Pan et al., 1998).

Le NGF est principalement impliqué dans la croissance, la prolifération et la survie d'un certain nombre de neurones et plus particulièrement pour les neurones cholinergiques impliqués dans les processus d'apprentissage (Guney et al., 2014). Le NGF a déjà été étudié dans plusieurs pathologies psychiatriques comme la schizophrénie (Xiong et al., 2011), la dépression (Diniz et al., 2013) ou encore les troubles obsessionnels compulsifs (Fontenelle et al., 2012). Dans le TDAH, une étude a montré une augmentation du taux de NGF dans le sérum des patients atteints de TDAH non traités par rapport aux groupes témoins (Guney et al., 2014). Cependant, une autre étude n'a pas montré de différence du taux de NGF entre les groupes TDAH et témoins (Bilgic et al., 2017). Les deux études sélectionnent des patients non traités par MPH à l'aide du DSM-IV et d'un test de WISC, cependant l'étude de Bilgiç inclue presque deux fois plus de patients (154 patients au total contre 80 pour l'étude de Guney). Ces deux études montrent des résultats contradictoires quant à l'implication du NGF dans le TDAH. D'autres facteurs neurotrophiques ont été étudiés dans le TDAH comme le BDNF.

Le BDNF est principalement retrouvé dans l'hippocampe et le cortex (Amiri et al., 2013), il est essentiel pour la synthèse, la libération et la recapture de la dopamine dans les neurones nigrostriés. Une étude n'a pas montré de différence de BDNF dans le sérum d'enfants TDAH non traités par rapport aux contrôles (Bilgic et al., 2017) mais une autre étude a montré une augmentation du taux de BDNF dans le plasma d'enfants TDAH (Shim et al., 2008). Une

troisième étude analysant le sérum de patients atteints de TDAH adultes a montré une diminution du taux de BNDF par rapport aux témoins (Corominas-Roso et al., 2013). Là encore, les résultats sont contradictoires mais peuvent être dus à l'hétérogénéité des patients. Toutes ces études incluent un nombre conséquent d'individus en se basant sur le DSM-IV avec des critères d'exclusions similaires.

Le facteur neurotrophique dérivé de la glie (Glial-Derived Neurotrophic Factor, GDNF) a un rôle important dans le développement et la survie des neurones dopaminergiques et des motoneurones (Granholm et al., 2000) ainsi que dans les fonctions cognitives (Gerlai et al., 2001). Deux études ont montré une augmentation du taux de GDNF chez les enfants TDAH dans le plasma et le sérum, avec une corrélation positive entre le taux de GDNF et la sévérité des symptômes (Shim et al., 2015; Bilgic et al., 2017), ce qui suggère le rôle du GDNF dans la physiopathologie du TDAH.

Le facteur neurotrophique 3 (NT3) joue un rôle dans le développement des neurones dopaminergiques mésolimbiques et des neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Maness et al., 1994). Une étude a montré une augmentation significative du taux de NT3 dans le sérum d'enfants TDAH non traités qui pourrait justifier d'un possible rôle du NT3 dans ce trouble (Bilgic et al., 2017).

Le TDAH est un trouble du neurodéveloppement, il est donc intéressant de s'intéresser aux molécules participant au développement embryonnaire. Aucune étude ne montre une modification du taux des facteurs neurotrophiques pendant le développement embryonnaire. Mais différentes études suggèrent des modifications périphériques chez les enfants TDAH par rapport aux témoins. Ces modifications sont principalement retrouvées dans le sang, et comme les facteurs neurotrophiques peuvent traverser la BHE à l'aide de transporteurs, ces modifications périphériques pourraient refléter des modifications cérébrales. Des études complémentaires s'intéressant à plusieurs facteurs en même temps seraient pertinentes pour statuer sur l'implication de ses facteurs dans la physiopathologie du TDAH.

II.4.c2 - Les hormones

Les hormones sont des petites molécules messagères actives, synthétisées par une glande ou tissus endocrine. Les hormones sont libérées dans la circulation sanguine et agissent sur des cellules à distance en se fixant sur leur récepteur. Les hormones sont de plus en plus étudiées comme potentiels biomarqueurs. L'ocytocine (OC) est un neuropeptide synthétisé par l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse postérieure. L'OC présente différents rôles notamment dans la reproduction, l'accouchement pour les contractions utérines, dans les comportements maternels mais aussi pour la confiance en soi ou encore l'empathie (Insel et al., 1999). Dans un modèle de souris KO pour l'OC, ces souris présentent un déficit d'interactions sociales, une augmentation de l'agressivité et un déficit en mémoire sociale (Ferguson et al., 2000). Une étude a montré une diminution du taux d'OC dans le sérum d'enfants TDAH non traités par rapport au groupe de témoins (Sasaki et al., 2015). La capacité de l'ocytocine à franchir la BHE reste limitée, les résultats montrant une diminution du taux d'ocytocine sanguin restent à modérer quant à l'implication de l'ocytocine dans la physiopathologie du TDAH. Cependant, le dosage de ce dernier pourrait être utilisé en tant que biomarqueur (Nicolas et al., 2018).

L'adiponectine est une molécule produite par les adipocytes impliquée dans le métabolisme des lipides et du glucose. Son taux plasmatique est diminué chez les personnes en surpoids ainsi que chez les patients diabétiques. Un taux anormal de cette hormone est retrouvé dans l'obésité mais aussi dans certains troubles psychiatriques comme la dépression majeure (Leo et al., 2006), la schizophrénie (Cohn et al., 2006) et les troubles bipolaires (Barbosa et al., 2012). Une étude montre que les patients atteints de TDAH présentent un taux plus faible d'adiponectine dans le sérum, et une corrélation négative avec les symptômes a été établie (Mavroconstanti et al., 2014). Une deuxième étude montre le même résultat avec une population d'enfants TDAH ne présentant pas d'obésité (Yurteri and Sahin 2020). L'obésité est une comorbidité fréquemment retrouvée dans le TDAH (Annexe 1) ce qui pourrait expliquer les faibles taux d'adiponectine dans le TDAH. Mais la corrélation négative entre les symptômes et la diminution du taux d'adiponectine chez des patients atteints de TDAH non obèses suggère un possible rôle de cette hormone dans la physiopathologie du TDAH. Certaines formes d'adiponectine sont capables de franchir la BHE et des récepteurs sont exprimés dans l'hypothalamus et le gyrus denté de l'hippocampe (Nicolas et al., 2018).

Différentes anomalies thyroïdiennes sont retrouvées dans le TDAH telles que l'hypothyroïdisme, l'hyperthyroïdisme ou encore la résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes (Millichap 2008). La thyroxine 4 (T4) est l'hormone thyroïdienne la plus abondante et est majoritairement convertie en triiodothyronine (T3) beaucoup plus active. Cette hormone a un rôle central dans l'organisme pour la croissance ou la maturation du système nerveux central. Une étude montre que la T4 est diminuée dans le sérum de patients atteints de TDAH (Kuppili et al., 2017) mais une autre étude ne confirme pas ce résultat (Toren et al., 1997). Une corrélation entre le taux de T4 et les symptômes a été montrée (Murphy et al., 1990), une autre corrélation entre le taux de T3 et les symptômes d'hyperactivité-impulsivité également (Hauser et al., 1997), mais l'étude la plus récente de Kuppili et ses collaborateurs ne retrouve pas ces corrélations. Ces résultats contradictoires pourraient être en lien avec les différences de diagnostics, en effet, entre les années 1990 et aujourd'hui, le diagnostic a beaucoup évolué et caractérise mieux les patients. Le rôle des hormones thyroïdiennes dans le TDAH n'est pas encore déterminé mais un dysfonctionnement de ce système hormonal pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie du TDAH.

Le cortisol est une hormone stéroïdienne synthétisée par la glande surrénale à partir du cholestérol. Il permet l'augmentation de la glycémie, l'inhibition de certaines réponses du système immunitaire, la régulation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique. Une des théories stipule que l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) serait dysfonctionnel dans le TDAH (Corominas et al., 2012). L'anxiété est fréquemment observée dans le TDAH et fait partie des principales comorbidités (Annexe 1). Plusieurs études montrent une diminution du taux de cortisol salivaire chez des enfants TDAH (Angeli et al., 2018). Une autre étude montre une modification du rythme de libération salivaire du cortisol sur la journée (6 prélèvements entre 8 et 22 heures) chez des enfants TDAH (Corominas et al., 2012). Une troisième étude ne montre pas de différence du taux de cortisol sanguin entre les patients atteints de TDAH et témoins (Kuppili et al., 2017). Différentes études ont étudié les taux de cortisol salivaire et sanguin dans le TDAH, mais les différences de types, du lieu et d'heure de prélèvement rendent les comparaisons et interprétations difficiles.

II.4.c3 - Les vitamines

Les vitamines sont des composés organiques essentiels pour le bon fonctionnement de l'organisme dont certaines doivent être apportées par le régime alimentaire.

Les vitamines B sont hydrosolubles, ont des rôles importants dans différents aspects du fonctionnement cérébral et agissent comme des coenzymes. De nombreuses enzymes nécessitent la fixation d'une autre molécule, appelée coenzyme, pour être actives. La forme active de la vitamine B6 est le Pyridoxal-5'-phosphate, coenzyme de plusieurs enzymes utiles dans la synthèse ou la dégradation d'acides aminés (Kennedy 2016). Son rôle dans la synthèse des acides aminés lui confère aussi un rôle dans la synthèse des neurotransmetteurs comme la dopamine, la sérotonine, le GABA, la noradrénaline ou encore la mélatonine. La vitamine B2 aussi appelée Riboflavine est nécessaire à la synthèse de deux coenzymes, la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ces deux coenzymes ont des rôles cruciaux dans la majorité des processus enzymatiques énergétiques comme le métabolisme des acides gras cérébraux. La vitamine B9 également appelée Folate est impliquée dans la synthèse des bases nucléiques (purines et pyrimidines) constituants de l'ADN. L'importance des vitamines B pour les fonctions cérébrales peut être illustrée par les différents symptômes associés à leurs déficits. Par exemple, une déficience en vitamine B6 (pyridoxine) est retrouvée dans la dépression, la démence ou encore associée à une augmentation de l'irritabilité. Une déficience en vitamine B2, Riboflavine est associée à la fatigue et aux changements d'humeur. Une déficience en folate est associée aux troubles affectifs, aux changements d'humeur ainsi qu'aux déclins cognitifs (Kennedy 2016). Dans le TDAH, une étude a montré un taux plus faible de ces 3 vitamines (B2, B9 et B6) dans le sérum de patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. De plus, la diminution en vitamine B2 et B6 est corrélée avec la sévérité des symptômes (Landaas et al., 2016). Les changements d'humeur ou encore les troubles cognitifs observés à la suite d'une déficience en vitamines sont en accord avec les symptômes observés dans le TDAH. Les déficiences en vitamine B2, B6 et B9 observés chez les patients atteints de TDAH pourraient indiquer une mauvaise absorption de celles-ci.

La vitamine D est liposoluble et est synthétisée à partir d'un dérivé du cholestérol et de l'action des rayons UV du soleil dans la peau. Le foie permet la synthèse de la 25-hydroxy-vitamine D_3 qui sera par la suite métabolisée par le rein en 1,25-dihydroxy-vitamine-D, qui est la forme active également appelée calcitriol. La vitamine D intervient dans l'absorption du calcium et du phosphore par les intestins et régule la croissance tissulaire et la différenciation cellulaire. Une déficience en vitamine D est associée aux déficits cognitifs, à

la démence et même aux troubles du spectre autistique (Maddock et al., 2017; Anjum et al., 2018). La 25(OH) vitamine D circulante traverse la barrière hémato-encéphalique et pénètre dans les cellules gliales et neuronales pour se transformer en calcitriol (Tissandie et al., 2006; Holick 2015). Le calcitriol présente un rôle dans le développement neuronal ainsi que dans la synthèse des facteurs de croissance neurotrophiques. Une étude pré-natale montre que les vitamines A et D sont nécessaires pendant la grossesse pour réduire le risque de schizophrénie et d'autres maladies mentales chez les enfants. Dans le cadre du TDAH, deux études ont montré une diminution de la vitamine D chez les patients atteints de TDAH par rapport aux té moins (Goksugur et al., 2014; Kamal et al., 2014) suggérant l'implication de la vitamine D dans la physiopathologie du TDAH. Une autre étude a montré qu'une diminution des symptômes étaient observés grâce à une supplémentation en vitamine D (Rucklidge et al., 2014). La vitamine D serait importante chez les adultes pour maintenir de bonnes capacités cognitives (Lau et al., 2017), sa diminution observée chez les patients atteints de TDAH pourrait impacter leurs fonctions cognitives.

Ces études suggèrent une implication des vitamines dans la physiopathologie du TDAH mais aucune ne montre si ces déficiences apparaissent avant le développement des symptômes ou si elles sont la conséquence d'autres altérations physiologiques. Les études ne montrent pas s'il existe un défaut de synthèse des vitamines ou mal-absorption chez ces patients. Le dosage de ces vitamines afin d'éviter les carences semble important dès la mise en place du diagnostic. Certaines de ces vitamines pourraient même être de potentiels biomarqueurs de la pathologie.

Un des challenges des troubles du neurodéveloppement est la recherche de nouveaux biomarqueurs pour améliorer le diagnostic, le pronostic mais aussi la réponse aux traitements. Dans le cadre du TDAH, il existe un réel manque de biomarqueurs pour mieux comprendre la physiopathologie de ce trouble mais aussi pour améliorer le diagnostic qui reste un enjeu majeur. La métabolomique est une technologie récente permettant d'identifier une empreinte métabolique à partir de différents types d'échantillons comme le sang ou les urines. L'utilisation de cette technologie dans le cadre du TDAH pourrait permettre d'identifier de potentiels biomarqueurs de ce trouble.

CHAPITRE III – La métabolomique

III.1 - Généralités

III.1.a - Les sciences -omiques

Les sciences -omiques définissent l'ensemble des approches moléculaires telles que :

- La génomique pour l'étude des gènes
- La transcriptomique pour l'étude des ARN messagers
- La protéomique pour l'étude des protéines
- La métabolomique pour l'étude des métabolites

Dans un premier temps, le développement de la génomique a permis de séquencer le génome de bactéries puis de levures et enfin de l'espèce humaine en 2001. Ces développements associés à des avancées technologiques ont permis la progression d'autres sciences -omiques comme la transcriptomique et la protéomique dans l'objectif d'appréhender un système biologique dans sa globalité : de l'expression des gènes au fonctionnement des protéines (Bujak et al., 2015).

La métabolomique est le dernier niveau de la cascade des approches -omiques. Elle reflète la réponse d'un organisme à une altération génétique, une pathologie ou à une exposition à un facteur susceptible de perturber son fonctionnement. C'est une approche globale qui repose sur la comparaison d'empreintes métaboliques grâce à l'analyse des métabolites présents dans la cellule, le tissu ou encore les fluides biologiques qui peuvent varier dans des conditions pathologiques (Raja et al., 2017).

La métabolomique s'intéresse à l'identification, la quantification et la caractérisation de métabolites. Ceux sont des petites molécules de poids moléculaires inférieurs à 1500 Da comme les acides aminés, les acides gras, les peptides, les sucres ou encore les acides organiques (German et al., 2005). Les métabolites représentent l'organisme à l'échelle moléculaire et peuvent être considérés comme le point final de la cascade -omique (Pezzatti et al., 2020) (Figure 13). Les processus de la métabolomique appliquée aux systèmes biologiques permettent de découvrir de nouveaux biomarqueurs, de comprendre des systèmes et d'étudier l'activité des métabolites de certains phénotypes particuliers. Le métabolome est en perpétuelle évolution et dépend de l'état physiologique, développemental ou pathologique d'un organisme (Raamsdonk et al., 2001). L'étudier doit permettre la mise en évidence de perturbations physiologiques.

Dans le cadre du TDAH, les biomarqueurs cliniques, génétiques ou encore d'imagerie n'ont à ce jour pas réussi à apporter les informations d'aide au diagnostic. La métabolomique en comparant les empreintes métaboliques entre les patients atteints de TDAH et témoins a pour objectif de découvrir des biomarqueurs. De plus, la métabolomique peut être réalisée à partir d'échantillons de fluides biologiques comme le sang et les urines, facilement accessibles chez l'Homme et notamment chez les enfants, ce qui en fait une technique particulièrement adéquate pour un futur diagnostic du métabolisme d'une personne TDAH. La métabolomique permet également de réaliser un suivi longitudinal pour mieux comprendre et appréhender l'évolution de la pathologie. Enfin, la métabolomique peut avoir un rôle pour déterminer l'efficacité d'un traitement, ce qui pourrait être utile pour prédire la réponse au traitement tout en suivant son efficacité.

En 1998, le terme « métabolome » est défini pour la première fois comme un ensemble de molécules de faible poids moléculaires (<1500Da) (Fiehn 2002) synthétisées par les cellules représentant une empreinte chimique spécifique des processus cellulaires (Gonzalez-Riano et al., 2016). Depuis, la métabolomique est devenue un nouveau champ d'études biochimiques dans le but d'identifier, de quantifier et de caractériser les métabolites.

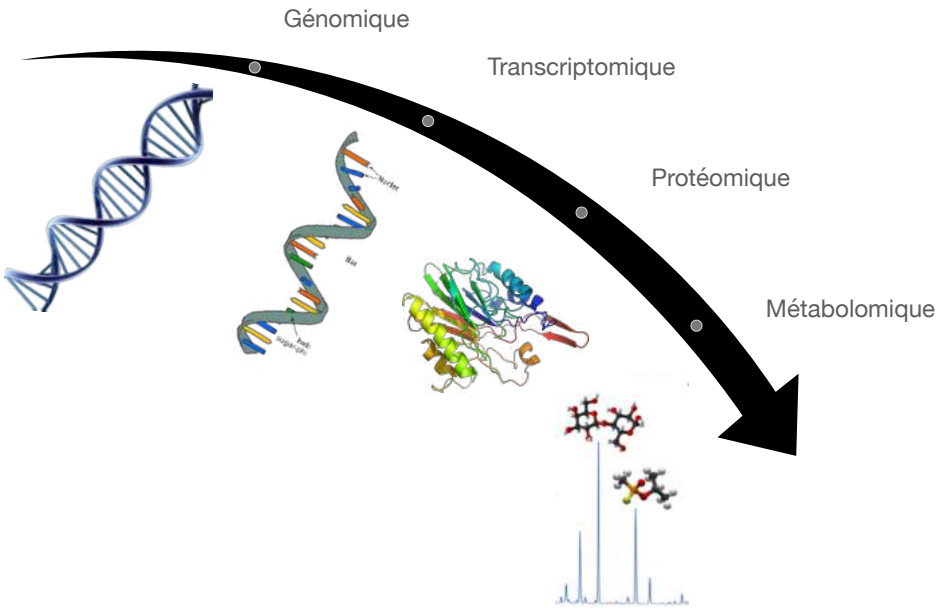


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des sciences -omiques.

III.1.b - Métabolome et Métabolites

Le métabolome est défini comme l'ensemble des métabolites présents dans un organisme à un temps donné, dépendant du contexte et variant en fonction de la physiologie ou d'un état pathologique (Monteiro et al., 2013). La composition du métabolome d'un individu n'est pas encore totalement identifiée et il est en constante évolution en fonction de l'état physiologique, de la nutrition ou encore de l'environnement (Bujak et al., 2015). Le métabolome comprend une large gamme de molécules endogènes, des métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont des molécules essentielles au fonctionnement d'un organisme et sont impliqués dans les processus tels que la croissance, le développement et la reproduction. Les métabolites primaires regroupent les sucres, les acides organiques ou encore les acides aminés. Les métabolites secondaires ne sont pas directement impliqués dans les processus physiologiques fondamentaux et sont propres à chaque espèce. Ces métabolites sont définis comme les produits finaux des processus cellulaires (D'Auria and Gershenzon 2005; Fernie 2007).

III.1.c - Applications

La métabolomique peut avoir plusieurs rôles : descriptif et comparatif, prédictif ou informatif. Le rôle descriptif et comparatif détermine un profil biologique à l'aide d'une empreinte métabolique. Le rôle prédictif permet la recherche et l'identification des biomarqueurs d'une situation particulière comme une pathologie. Enfin, le rôle informatif permet de décrypter les réseaux métaboliques et les liens complexes entre les voies métaboliques.

Les domaines d'applications sont très vastes et incluent les sciences de l'alimentation (traçabilité des aliments), la microbiobologie (métabolome des bactéries comme E.Coli), les biotechnologies, la biologie animale et végétale (étude des maladies de la vigne), les sciences environnementales (étude métabolomique de l'air) ou encore le domaine de la santé (cancer, cardiologie, psychiatrie) (Figure 14).

Cette thèse se concentre sur l'application de la métabolomique dans le domaine de la santé, et plus spécifiquement, sur un trouble du neurodéveloppement. Le rôle de la métabolomique dans les pathologies psychiatriques peut être de mieux comprendre la physiopathologie, d'identifier des molécules pour le diagnostic ou encore de prédire la réponse au traitement. L'accès au cerveau n'étant pas possible, d'autres prélèvements permettent d'étudier les maladie du système nerveux. Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est un liquide dans lequel

baignent le cerveau et la moelle épinière, c'est donc un prélèvement majoritairement analysé pour représenter des modifications cérébrales. D'autres échantillons comme le sang et les urines sont aussi analysés, avec à leur avantage, plus de facilité à collecter. Mais l'analyse de prélèvements périphériques pour refléter le cerveau a ses limites, la principale étant la barrière hématoencéphalique (BHE). La BHE est une barrière physique servant à limiter le passage des molécules du sang vers le cerveau. Malgré cet obstacle, ces compartiments périphériques sont les plus utilisés de par la difficulté d'accès au tissu cérébral (Ivanisevic et al., 2014). L'utilisation des modèles animaux est très pertinente dans le cas des pathologies cérébrales car elle permet d'étudier directement le métabolome du tissu cérébral.

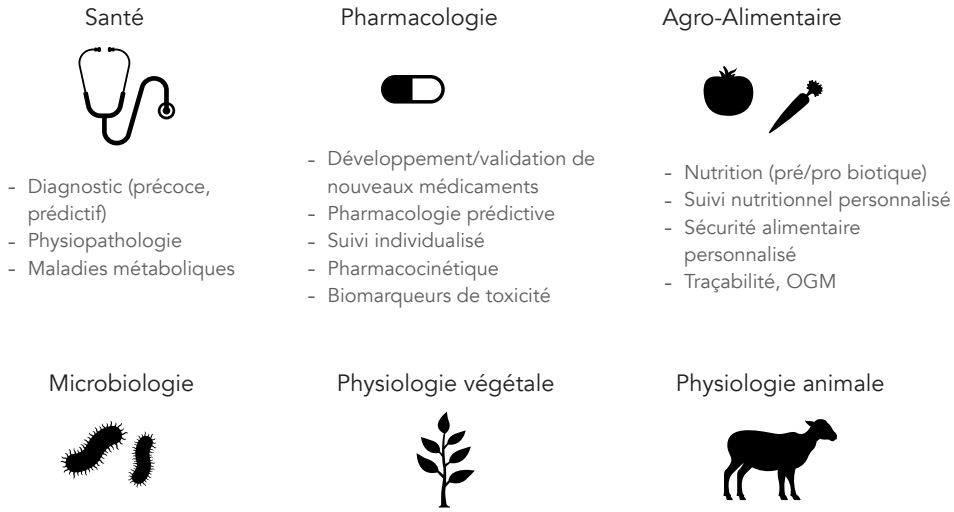


Figure 14 : Principales applications de la métabolomique.
D'après la thèse de Binta Diémé, 2016.

III.1.d - Biomarqueurs

La métabolomique est actuellement utilisée afin d'identifier des métabolites associés à certaines pathologies ou certains états physiologiques (Nordstrom and Lewensohn 2010; Mamas et al., 2011). La métabolomique permet une meilleure compréhension du statut biologique du patient par rapport à la mesure d'un unique métabolite appelé biomarqueur. Un biomarqueur est un indicateur de modifications mesurables dans l'organisme pendant ou à la suite d'une pathologie (Bennett and Waters 2000). Cette partie a été développée dans le chapitre II.

III.2 - L'approche métabolomique

III.2.a - Principe

La métabolomique est une démarche scientifique et méthodologique qui a pour vocation d'établir une image, la plus exhaustive possible, du métabolome d'un échantillon. Deux types d'études peuvent être réalisés, la métabolomique non ciblée et la métabolomique ciblée.

La métabolomique non ciblée ou exploratoire consiste à analyser l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon. C'est une analyse globale qui permet de comparer différentes conditions afin de déterminer de nouvelles hypothèses. La métabolomique non ciblée est très souvent utilisée en première intention comme une première étape pour acquérir le maximum d'informations sans *a priori* afin de déterminer le plus grand nombre de métabolites provenant de différentes classes chimiques et biologiques. Dans la majorité de cas, l'approche non ciblée donne des informations quantitatives relatives (Gonzalez-Ruiz et al., 2017).

La métabolomique ciblée est dirigée par une ou plusieurs hypothèses et se concentre sur l'analyse de quelques métabolites, ou quelques voies métaboliques. Ce type d'étude est souvent complémentaire à l'approche non ciblée et permet de quantifier de manière absolue comme un dosage dans un milieu biologique (Naz et al., 2014; Johnson et al., 2016).

III.2.b - Les différentes étapes

Le déroulement d'une étude métabolomique se fait en plusieurs étapes souvent énoncées sous le terme « workflow » (Figure 15) (Wu and Li 2016).

Après avoir déterminé les questions biologiques nécessitant une étude métabolomique, la première étape est la collecte et la préparation des échantillons. Une fois les échantillons préparés, les données sont acquises avec la technique analytique prévue. L'étape d'acquisition des données permet de générer, dans la majorité des cas, un très grand nombre de données qu'il faut épurer, pour ne garder que les données pertinentes. Les données sont ensuite analysées à l'aide d'outils statistiques afin de trouver les métabolites discriminants et les replacer dans leurs voies métaboliques pour tenter de répondre à la question biologique (Pezzatti et al., 2020).

Ces étapes seront détaillées dans les paragraphes suivants.

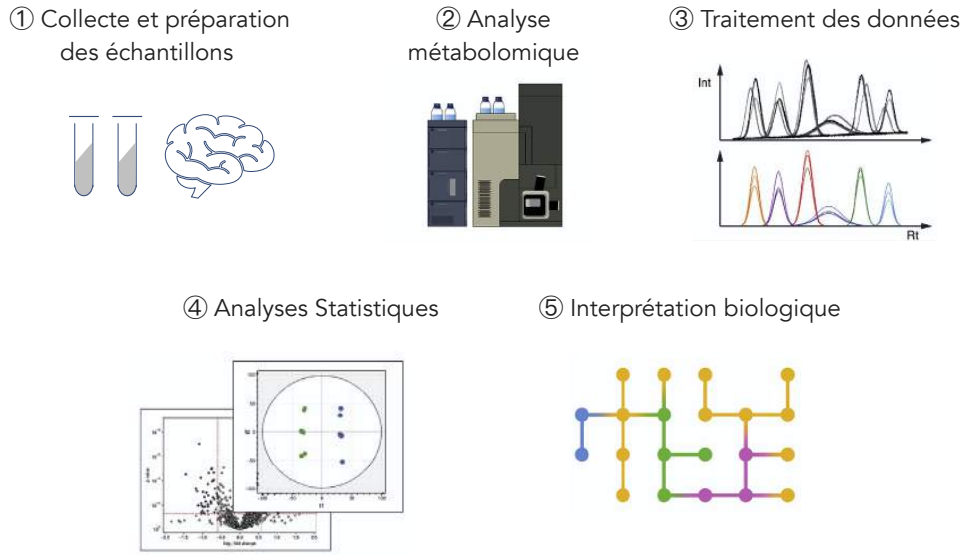


Figure 15 : Principales étapes d'une étude métabolomique (Workflow).
Les différentes étapes d'une étude métabolomique, de la préparation des échantillons à l'interprétation des résultats.

III.3 - Collecte et préparation des échantillons

La question biologique préalablement définie influence directement la manière dont les échantillons seront collectés, aliquotés, stockés et préparés. En fonction du type d'échantillons, il est parfois nécessaire de les collecter au même moment de la journée pour tous les individus dû au rythme circadien ou à cause à l'effet de l'alimentation sur le métabolome (Chetwynd et al., 2017). La quantité d'échantillons nécessaires pour l'analyse doit être ajustée en fonction de l'analyse. De plus, il est préférable d'éviter au maximum les cycles de congélations-décongélations de l'échantillon, il faut donc réfléchir au nombre d'aliquots à faire à l'issue de la collecte. Il est aussi important d'utiliser les mêmes contenants de stockage pour tous les échantillons afin d'éviter les biais (Khadka et al., 2019; Pezzatti et al., 2020).

La préparation des échantillons est nécessaire afin que les échantillons soient analysables et présente deux objectifs principaux : l'arrêt rapide des réactions métaboliques (quenching) et l'extraction de molécules de faibles poids de l'échantillon. Le quenching stoppe les activités enzymatiques de l'échantillon, avec l'utilisation d'azote liquide ou de méthanol froid.
L'extraction des molécules de faible poids diffère en fonction de la nature de l'échantillon, une simple dilution peut suffire pour l'analyse d'échantillons urinaires mais pour des échantillons sanguins ou tissulaires, la préparation peut être plus élaborée avec des étapes de lyophilisation et d'extractions. La préparation est aussi adaptée en fonction de la technique analytique utilisée. C'est une étape importante puisqu'elle va permettre d'éliminer les protéines présentes dans l'échantillon qui pourraient biaiser l'analyse métabolomique. Pour chaque type d'échantillon et pour chaque technique analytique il est primordial de développer un protocole de préparation unique (Pezzatti et al., 2020).

III.4 - Analyse métabolomique : les différentes techniques

Depuis les dix dernières années, le nombre de métabolites intégrés dans la base de données Human Metabolome Data Base (HMDB 4.0) a rapidement augmenté pour atteindre 114 000 métabolites regroupés en 4 groupes : métabolites détectés et quantifiés, détectés mais non quantifiés, attendus ou prédis (Wishart et al., 2018). En plus du grand nombre de métabolites, ces derniers présentent une très grande diversité chimique et une grande variation de concentration. Une seule technique analytique ne permet pas de couvrir toutes ces variabilités (Nicholson et al., 1999; Fiehn 2002). Actuellement, deux techniques analytiques sont majoritairement utilisées : la spectrométrie de masse (MS) couplée à des méthodes séparatives et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

III.4.a - La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode analytique largement utilisé en métabolomique. Elle est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux ayant un spin nucléaire intrinsèque non nul. Les spins nucléaires de ces atomes placés dans un champ magnétique externe (B0) s'orienteront selon B0. L'envoi d'une radiofréquence spécifique entrainera l'excitation des spins nucléaires. Lors de l'arrêt de cette radiofréquence, le retour à l'état d'équilibre des spins nucléaires est enregistré. Ce retour à l'équilibre (FID) se fait selon deux phénomènes de relaxation (T1 et T2) caractérisant chaque molécule (ou groupement moléculaire). En milieu liquide soit en métabolomique, la RMN est principalement basée sur la détection du 1H ou du 13C (en 1D ou 2D). Les principaux avantages de la RMN sont le fait qu'elle soit non destructive, très reproductible et demande très peu de préparation de l'échantillon (Leenders et al., 2015). Elle permet une quantification absolue fiable et simple utilisant un standard interne tel que le TSP ou le DSS qui en ont fait un outil de choix. Cependant sa faible sensibilité et son cout élevé ont permis à la SM de se développer de façon importante depuis une décennie (Letertre et al., 2021).

III.4.b - La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique basée sur l'ionisation des molécules permettant la mesure, après leur ionisation, de leur rapport masse sur charge (m/z).

Le spectromètre de masse se compose de 3 modules (Figure 16) :

- La source qui permet d'ioniser les molécules (en phase gazeuse)
- L'analyseur qui permet le transport et la séparation des ions en fonction de leur rapport m/z

Il existe différents analyseurs ayant des caractéristiques propres.
Les analyseurs quadripolaires ont une faible résolution et sont souvent utilisés en routine ou pour des analyses ciblées.
Les analyseurs à temps de vol (Time-Of-Flight ou TOF) sont des analyseurs rapides à résolution variable. Ils sont souvent utilisés pour des analyses à haute cadence.
Enfin, les analyseurs à très haute résolution de type Orbitrap ont une haute résolution et une bonne précision en masse. Cependant, cet analyseur ne permet pas une cadence d'analyse aussi rapide que le TOF, mais il est largement utilisé pour l'analyse d'échantillon inconnu afin d'obtenir une identification maximale des ions.

- Le détecteur qui permet de détecter les ions sortant de l'analyseur.

La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) est largement utilisée depuis ces 10 dernières années principalement grâce à sa meilleure sensibilité et sélectivité ainsi qu'une meilleure couverture du métabolome par rapport à la RMN (Theodoridis et al., 2012).
Pour augmenter les performances de l'analyse, la spectrométrie de masse peut être couplée à des techniques séparatives telle que l'électrophorèse capillaire, la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide.



Figure 16 : Spectre de masse

III.4.b1 - couplée à la chromatographie gazeuse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse a été la technique de référence pour analyser des composés volatils grâce à sa sensibilité, sa résolution et sa reproductibilité de fragmentation (Haggarty and Burgess 2017).

Cette technique se limite à l'étude des composés sous forme gazeuse et il est souvent nécessaire d'effectuer une étape de modification chimique (dérivation) afin d'améliorer la volatilité des composés polaires et peu volatils. L'étape de dérivation peut conduire à des réactions de dégradation et entrainer une perte de métabolites. De plus, cette technique ne permet pas d'observer des composées très polaires comme les nucléotides (Lee et al., 2013).

III.4.b2 - couplée à la chromatographie liquide (LC-MS)

Actuellement la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide est la technique la plus largement utilisée en métabolomique (Theodoridis et al., 2012; Pezzatti et al., 2019). Contrairement à la GC-MS, la LC-MS peut être appliquée à l'analyse de composés non volatils.

La LC-MS permet de détecter un large panel de métabolites grâce aux types de colonnes chromatographiques utilisées, et aux modes d'ionisation possibles (mode positif et négatif).

La séparation chromatographique permet de séparer les composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques comme la polarité. Le principe de la chromatographie liquide est que l'échantillon à analyser est entrainé par un liquide appelé phase mobile dans une colonne remplie d'une phase stationnaire. Il existe différents types de colonnes, comme les chromatographies en phase normale ou en phase inverse. Les colonnes phase inverse (C18) sont utilisées pour la rétention des composés apolaires (Randazzo et al., 2017) alors que les colonnes en phase normale (HILIC) sont utilisées pour l'analyse de composés polaires (Periat et al., 2015).

La chromatographie en phase normale permet de séparer les différents métabolites en fonction de leur polarité en faisant intervenir des interactions polaires. La phase mobile contenant les analytes est apolaire ce qui va entrainer un mécanisme de compétition entre la rétention des solutés dans la phase stationnaire polaire et l'élution des solutés dans la phase mobile. Les solutés les plus retenus dans la phase stationnaire seront élués en dernier alors que les solutés les moins retenus seront élués en premier.

A l'inverse, la chromatographie en phase inverse est utilisée pour la rétention des composés apolaires avec une phase mobile polaire et une phase stationnaire apolaire et hydrophobe.

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide est actuellement la technique analytique la plus utilisée en métabolomique et on peut désormais distinguer plusieurs systèmes chromatographiques notamment la chromatographie à haute performance (HPLC) ou ultra-haute performance (UHPLC).

III.5 - Analyse métabolomique : l'acquisition des données LC-HRMS

Après la préparation des échantillons et pendant l'acquisition des données avec la technique analytique choisie il est important d'avoir des échantillons de contrôle en plus des échantillons à analyser. Ces échantillons de contrôle sont appelés CQ (Contrôle Qualité) et doivent représenter les caractéristiques qualitatives et quantitatives de tous les échantillons de l'analyse (Dunn et al., 2012). Les CQs sont injectés au début, à la fin et à des intervalles réguliers pendant la séquence analytique afin de suivre les performances de la méthode (Godzien et al., 2015). Les CQs sont dans la majorité des études un mélange de tous les échantillons de la campagne d'analyse. L'injection de CQ en début d'analyse permet de stabiliser le système. Pendant l'analyse, il est recommandé d'inclure un CQ tous les 5 à 10 échantillons. De plus il est aussi fortement recommandé de randomiser l'ordre des échantillons dans la campagne d'analyse. A la fin de l'analyse, il est préférable de terminer par un CQ afin de pouvoir analyser la dérive analytique pendant la campagne d'analyse (Pezzatti et al., 2020).

III.6 - Le traitement des données et identification des métabolites

III.6.a - Traitement des données

Après acquisition, les données sont compilées dans le logiciel XCalibur® sous forme de données brutes présentant les 3 informations principales : le temps de rétention (TR), le rapport masse sur charge (m/z) et l'intensité. Il faut traiter les données brutes pour supprimer le bruit de fond et réaligner les spectres si besoin pour présenter les données sous formes de tableaux pour les études statistiques. Le pré-traitement des données permet de convertir ces informations en un seul tableau à deux dimensions fait à l'aide de logiciels permettant de traiter la grande quantité de données. Le logiciel XCalibur® permet d'intégrer automatiquement les signaux à partir de la base de données IROA de 495 composés dont le temps de rétention et le rapport masse sur charge (m/z) sont connus (Figure 17). Chaque couple TR et m/z est associé à un métabolite identifié et une intensité ce qui permet la création d'un tableau de données.

Le tri se fait à partir des CQs, tous les métabolites ayant une intensité inférieure au bruit de fond dans les CQs sont supprimés. Ensuite, le tri se fait à partir du calcul du coefficient de variation (CV) [CV% = (écart type / moyenne)*100] dans les CQs. Le calcul du CV dans les CQs permet de contrôler la variabilité de l'appareillage dans le temps tandis que le CV dans les échantillons permet de calculer la variabilité biologique. Les métabolites ayant un coefficient de variation supérieur à 30% dans les CQs sont supprimés car le métabolite présente une variabilité analytique trop élevée. Ce tri permet d'obtenir les métabolites d'interêt à partir desquels les statistiques seront réalisées.

Une fois le tableau de données créé, une étape de tri et de normalisation est obligatoire pour éliminer le plus de biais analytiques possibles tout en conservant les variations biologiques. La normalisation peut se faire de différentes manières, avec l'ajout de standards pendant l'analyse ou à l'aide d'une normalisation à l'aire totale. Actuellement, il n'existe pas de méthodes de normalisation permettant d'éliminer toute la variabilité analytique tout en gardant la variabilité biologique.

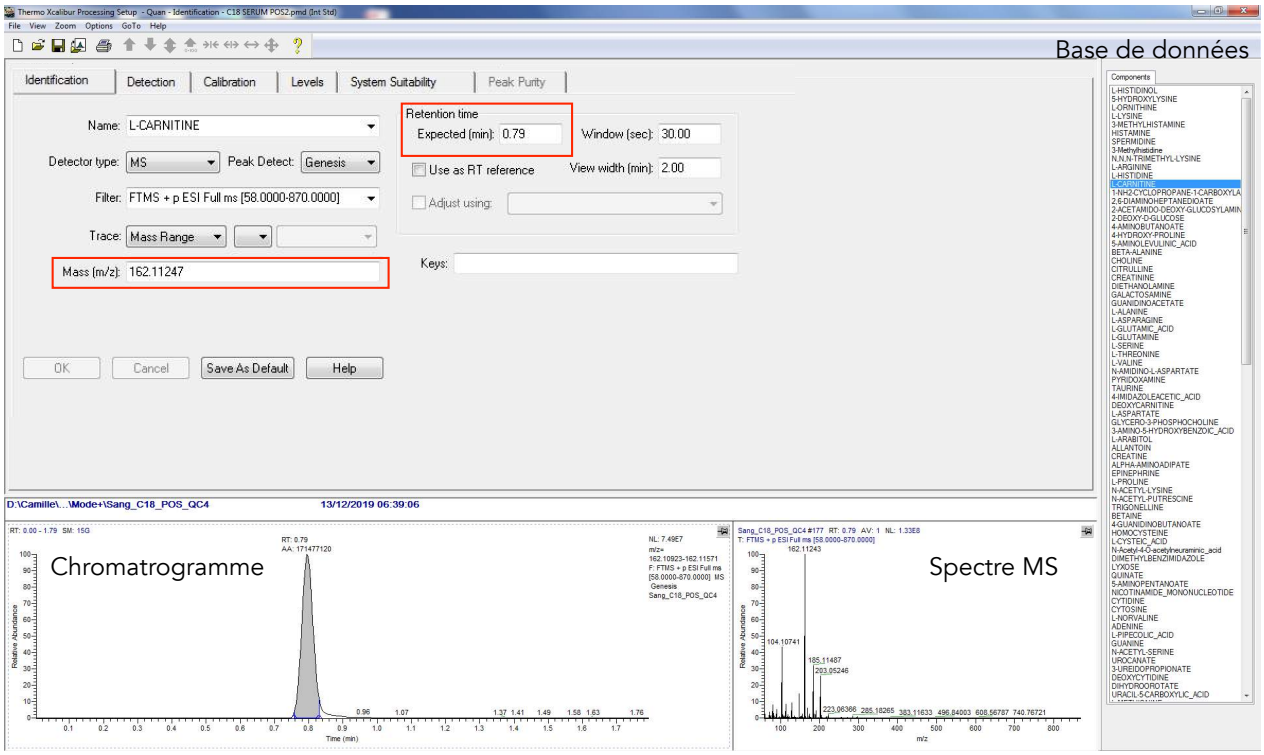


Figure 17 : Capture d'écran du logiciel XCalibur®.
Cette image représente l'intégration d'un métabolite issu d'une base donnée à partir de son RT et de son m/z.

III.6.b - Identification des métabolites

L'identification des métabolites peut avoir cinq niveaux de confiance :

- niveau 5 « Unique Feature » permet de rechercher tous les métabolites ayant la même masse. Plus la masse sera précise, plus la liste sera réduite (environ 10 000 molécules).
- Niveau 4 « Molecular Formula » permet d'identifier les métabolites ayant la même masse et la même distribution des atomes.
- Niveau 3 « Tentative Structure » permet d'identifier les molécules à partir de ratio masse/charge (m/z) d'une base de données telle que HMDB, KEGG ou encore Metaboanalyst.
- Niveau 2 « Putative Identification » permet de connaitre les fragments du métabolites grâce une analyse MS/MS.
- Niveau 1 « Validated Identification » est le niveau d'identification le plus sûr, il faut ajouter une analyse avec un standard interne dans les mêmes conditions expérimentales (Schrimpe-Rutledge et al., 2016).

III.7 - Analyses statistiques et interprétation biologiques

Les analyses statistiques univariées et multivariées sont utilisées pour trouver l'information métabolique d'intérêt. Ces deux approches sont complémentaires ; les analyses statistiques univariées sont basées sur les différences statistiques pour chaque métabolite alors que les statistiques multivariées considèrent tous les métabolites en même temps afin de faire ressortir un panel de métabolites discriminants (Boccard et al., 2010).

III.7.a - Analyses statistiques univariées

L'objectif d'études métabolomiques est très souvent de comparer différentes conditions. Les tests statistiques univariées permettent de comparer les intensités entre deux groupes pour chaque métabolite. Le test le plus utilisé est le test de comparaison de moyenne appelé test de Student (t-test) et son équivalent non paramétrique le test de Wilcoxon. Ces tests donnent des indicateurs pouvant se représenter à l'aide de boxplot ou d'astérisque pour montrer la significativité.
La métabolomique offre très souvent de grands jeux de données, il est important d'appliquer un test de correction multiple de type FDR (False Discovery Rate) ou Bonferoni pour éviter les faux-positifs (Broadhurst and Kell 2006).

III.7.b - Analyses statistiques multivariées

Des centaines de signaux sont détectés avec la métabolomique, il y a donc un besoin d'outils statistiques puissant permettant de traiter l'ensemble des données et des analyses multivariées sont particulièrement adaptées. Lorsque l'on détecte X variables par observation, chaque observation est alors représentée par un point dans un espace à X dimensions.

Les méthodes d'analyses multivariées non supervisées offrent des solutions efficaces pour traiter de manière adaptée ces grands ensembles de données. Ces outils permettent de dégager les regroupements d'échantillons sans *a priori*, et permettent également de mettre en évidence les liens potentiels entre les métabolites (variables).
Une des méthodes d'analyses multivariées non supervisée très souvent utilisée est l'Analyse en Composante Principale (ACP). C'est une méthode de projection permettant de décrire et de représenter un jeu de données métabolomiques.
Une seconde méthode d'analyse multivariée non supervisée est la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH). Cette méthode permet de classifier des groupes d'observations similaires et est représentée sous forme d'arbre appelé dendrogramme.

Ces deux méthodes d'analyses descriptives permettent de rendre compte de la variabilité et des similarités entre les observations.

Les méthodes d'analyses multivariées supervisées, méthode d'analyses explicatives, permettent de prédire une réponse. Ces méthodes permettent de créer un modèle statistique à partir des profils métaboliques. L'objectif de ces analyses est d'expliquer une ou plusieurs informations Y (continues ou discrètes) en fonction des variables X. Les méthodes sont la régression PLS (Partial Least Squares) ou régression des moindres carrés partiels et l'OPLS (Orthogonal Partial Least Squares). Le but est de maximiser les corrélations entre les variables expliquées X et les variables à expliquer Y. Les analyses PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis) et OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis) ont pour but de construire des modèles maximisant la séparation entre les classes d'appartenance des observations. Il permet ainsi de mettre en évidence les métabolites qui permettent de discriminer les groupes.

III.7.c - Interprétation biologique

Une fois que les métabolites discriminants ou significatifs sont déterminés, il faut donner un sens biologique aux variations entre les différentes conditions. Le réseau métabolique est souvent divisé en voies métaboliques comme le cycle de Krebs ou encore la glycolyse. A l'aide de bases de données telles que KEGG ou HMDB, il est possible de replacer les métabolites d'intérêt dans leur voies biochimiques respectives. A la suite de cela des tests statistiques sont réalisés pour déterminer si la voie métabolique est significativement altérée ou non.

Le TDAH est une pathologie complexe avec un diagnostic pouvant être long et compliqué et une neurobiologie non élucidée. La métabolomique est une technique récente qui pourrait permettre de mieux comprendre et caractériser la pathologie ainsi que d'identifier de potentiels biomarqueurs. L'hétérogénéité phénotypique et temporelle de ce trouble ne facilite pas la recherche de potentiels biomarqueurs. De plus, les études cliniques sont limitées aux types d'échantillons possibles, il n'est pas possible d'accéder à des échantillons cérébraux sauf post-mortem. C'est pourquoi l'utilisation d'un modèle animal est une bonne opportunité de s'affranchir de l'hétérogénéité mais aussi d'utiliser des techniques et des échantillons qui ne seraient pas possible chez l'homme. Les modèles rongeurs de TDAH sont les plus largement utilisés, leur système nerveux est plus simple mais reste très proche de celui de

l'Homme. De plus, les rongeurs possèdent les mêmes comportements de base que l'homme, tout comme les réseaux neuronaux impliqués dans ces comportements (Russell 2011). Le modèle animal utilisé dans cette thèse sera développé dans le quatrième chapitre portant sur l'analyse du métabolome cérébral et périphérique dans un modèle animal de TDAH.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le TDAH est le trouble du neurodéveloppement le plus fréquemment rencontré chez les enfants. Cependant, à l'heure actuelle, l'étiologie de ce trouble demeure inconnue et poser un diagnostic est un processus long qui nécessite souvent l'intervention de nombreux acteurs (médecins, pédiatres, neuropédiatres, pédopsychiatres, psychologues, neuropsychologues et orthophonistes notamment). Les symptômes principaux du TDAH : l'inattention, l'hyperactivité et l'impulsivité ont un impact sur le parcours scolaire, familial et social des enfants. Il est donc important de poser le diagnostic et de traiter efficacement les symptômes le plus tôt possible. Bien que plusieurs études se soient intéressées à la recherche de biomarqueurs cliniques, génétiques ou moléculaires, il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique permettant de mieux caractériser la pathologie ni d'aider au diagnostic fiable et rapide du TDAH. Disposer de biomarqueurs biologiques du TDAH offrirait une aide au diagnostic précoce et différentiel et permettrait de suivre l'évolution de la maladie voire peut-être également de différencier des différents sous-types de patients afin d'adapter au mieux les traitements.

Grâce à une approche transversale préclinique et clinique, ce travail de thèse se divise en deux parties. La première partie a pour but de mieux comprendre les caractéristiques physiopathologiques du TDAH à l'aide d'un modèle animal. La deuxième partie a pour objectif de déterminer des biomarqueurs prédictifs cliniques sanguins et urinaires du TDAH.

A l'aide d'un modèle animal et d'une approche métabolique, la première étude ce travail de thèse est de caractériser le métabolome cérébral global des rats TDAH, mais aussi de définir, dans quelle mesure, les altérations observées du métabolome central sont retrouvées en périphérie. Comme l'accès aux échantillons cérébraux n'est pas possible en clinique, il est intéressant de voir si le métabolome central chez le rat est en lien avec les métabolomes périphériques. La deuxième étude de ce travail a pour objectif de caractériser, si possible, un métabolome spécifique des régions cérébrales qui semblent être le plus impliquées dans la pathologie. Enfin, la troisième étude de ce travail préclinique est d'étudier plus spécifiquement les anomalies de la neurotransmission. En effet, les principales hypothèses causales du TDAH se rapprochent d'un problème de neurotransmission notamment dopaminergique, c'est pourquoi, une étude de dosage des différents neurotransmetteurs a été réalisée sur les mêmes régions cérébrales.

La deuxième partie de cette thèse est de déterminer un profil métabolique urinaire et sanguin de patients atteints de TDAH afin d'améliorer le diagnostic à l'aide de biomarqueurs. Un panel de biomarqueurs pourrait être utilisé pour le diagnostic de routine à l'aide d'une approche métabolomique. Bien que les traitements ciblent le système dopaminergique, il est intéressant de pouvoir explorer le profil métabolique des patients atteints de TDAH dans sa globalité. Pour cela, une étude utilisant la métabolomique a été mise en place pour analyser le métabolome sanguin et urinaire de patients atteints de TDAH en comparaison avec un groupe de sujets témoins. Le but ultime de ce travail est de proposer un panel de biomarqueurs potentiels utilisables en routine pour le diagnostic clinique.

Chapitre IV - Les études précliniques

Analyse du métabolome cérébral et périphérique dans un modèle de TDAH chez le rat

IV.1 - Les modèles animaux de TDAH

L'approche préclinique permet de s'affranchir de l'hétérogénéité retrouvée en clinique et permet d'analyser des échantillons de tissus cérébraux non accessibles chez l'Homme.
Les modèles animaux permettant d'étudier les pathologies psychiatriques doivent présenter différents critères afin de valider le modèle (Willner 1986; Belzung and Lemoine 2011) :

- La validité de ressemblance se définit par la présence des mêmes symptômes/ comportements que chez l'Homme.
- La validité de construction est définie par la même étiologie et les mêmes conditions physiopathologiques chez le modèle et chez l'Homme.
- La validité prédictive correspond au fait que l'animal répond de la même manière que l'Homme aux traitements pharmacologiques.

Il existe différents types de modèles animaux du TDAH : des modèles chimiquement induits ou induits par une exposition environnementale, des modèles génétiques ou encore des modèles basés sur une sélection comportementale. Concernant les modèles chimiquement induits ou induits par une exposition environnementale, 14 articles ont été publiés avant les années 2000 et 33 après les années 2000. Dans cette catégorie de modèles, le plus étudié est un modèle de lésion striatale à l'aide de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (3 publications avant les années 2000 et 17 après les années 2000). Concernant les modèles génétiques, aucun article n'a été publié avant les années 2000 et 21 ont été publiés après les 2000, dont 9 concernant le modèle DAT KO. Concernant les modèles sélectionnés phénotypiquement, 19 publications ont été rédigées avant les années 2000, dont 16 sur le modèle SHR, et 256 après les années 2000 dont 230 sur le modèle SHR. Le modèle SHR est le modèle le plus caractérisé et le plus étudié pour le TDAH ces 20 dernières années (Figure 18). Ces rats ont été sélectionnés sur leur phénotype et ils présentent les 3 symptômes principaux du TDAH : l'inattention, l'hyperactivité et l'impulsivité (Sagvolden et al., 2009). Ce modèle a été utilisé pour ce travail de thèse et il sera décrit plus précisément dans la partie suivante.

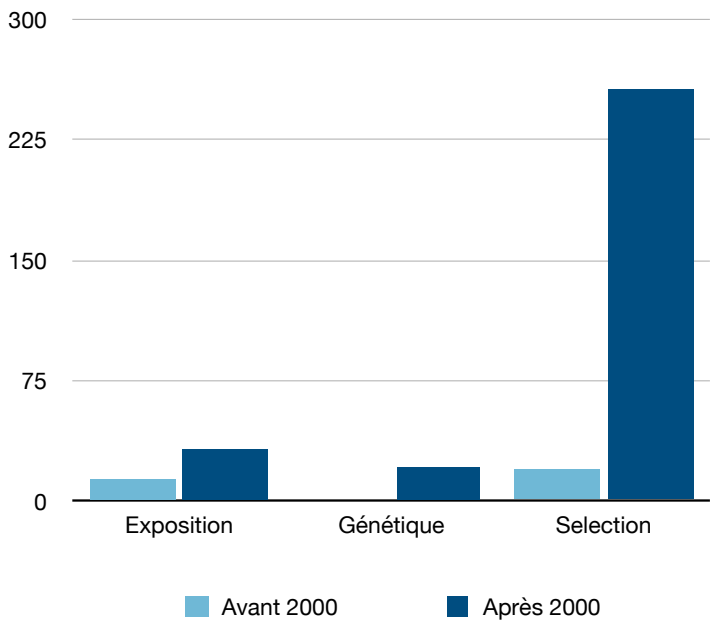


Figure 18 : Nombre de publications en fonction du type de modèle.

IV.2 -Le modèle SHR/NCrl

La souche de rats SHR a été développée à l'université de Kyoto au Japon dans les années 70. Elle dérive de la souche Wistar Kyoto (WKY) avec une sélection des animaux ayant une hypertension artérielle (Okamoto and Aoki 1963). Des études comportementales ont révélées que les rats SHR présentaient des modifications comportementales avant de développer l'hypertension artérielle, suggérant les rats SHR comme modèle de TDAH (Sagvolden et al., 1992; Davids et al., 2003; Sagvolden et al., 2005; Sagvolden et al., 2009).

Actuellement, les rats SHR sont les plus utilisés dans les études précliniques du TDAH car ils présentent le phénotype le plus proche de celui retrouvé en clinique (Sagvolden et al., 2009). Ces caractéristiques ont été déterminées par des tests comportementaux.

IV.2.a - données comportementales *(validité de ressemblance)*

Les rats SHR/NCrl présentent toutes les caractéristiques comportementales du TDAH telles que de mauvaises performances d'attention soutenue, une hyperactivité et une impulsivité non dépendante de la nouveauté (Russell 2011).
Un test comportemental « Fixed-interval/extinction schedules of reinforcement (FI/Ext) » initialement réalisé en clinique a été utilisé sur les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd (Sagvolden 2000) (Figure 19). Ce test s'appuie sur une tâche de discrimination visuelle et l'utilisation de renforçateurs. Le test se divise en deux phases alternées, répétées six fois pendant 30 minutes au total.
La première phase est la composante d'intervalle fixe (FI), c'est à dire que le renforçateur est donné à la suite d'une réponse souhaitée après un laps de temps spécifique. Cette phase dure 2,5 minutes avec un laps de temps de 30 secondes entre les réponses. Un signal lumineux permet au rat de comprendre qu'il doit appuyer sur le levier pour obtenir un renforçateur. Chaque appui sur le bon levier entraine la délivrance du renforçateur, ce qui fait 5 renforçateurs maximum par FI.
Le deuxième intervalle est la composante d'extinction (Ext) signalée par l'extinction totale des lumières dans la cage opérante. Durant cette phase aucun renforçateur n'est libéré, peu importe le nombre d'appuis sur le levier renforçateur.
Pour chaque intervalle le nombre moyen d'appuis sur le levier est comptabilisé ainsi que les temps inter-réponse. Les intervalles fixes permettent de mesurer l'activité motrice, l'apprentissage et l'impulsivité en comptabilisant le nombre d'appuis sur le levier renforçateur. Les intervalles d'extinction permettent de mesurer la sensibilité des animaux au

changement de stimulus et la capacité d'attention soutenue en mesurant le nombre d'appuis sur le levier malgré la non délivrance de renforçateur et l'extinction des lumières.

Les résultats de ces tests révèlent une hyperactivité, une impulsivité et un déficit d'attention soutenue des rats SHR/NCrl comparés aux témoins, les rats WKY/NHsd. En effet, l'impulsivité chez les rats SHR/NCrl se présente sous la forme d'un nombre important d'appuis sur le levier comparé aux rats témoins avec des temps inter-réponse de plus en plus courts. Pendant la phase d'extinction, les rats SHR/NCrl continuent d'appuyer ce qui peut signifier un déficit d'attention.

L'activité motrice peut aussi être étudiée à l'aide de tests comportementaux de type « open-field » et peut être qualifiée d'hyperactivité constitutive (Sagvolden et al., 1992; Sagvolden et al., 2005)

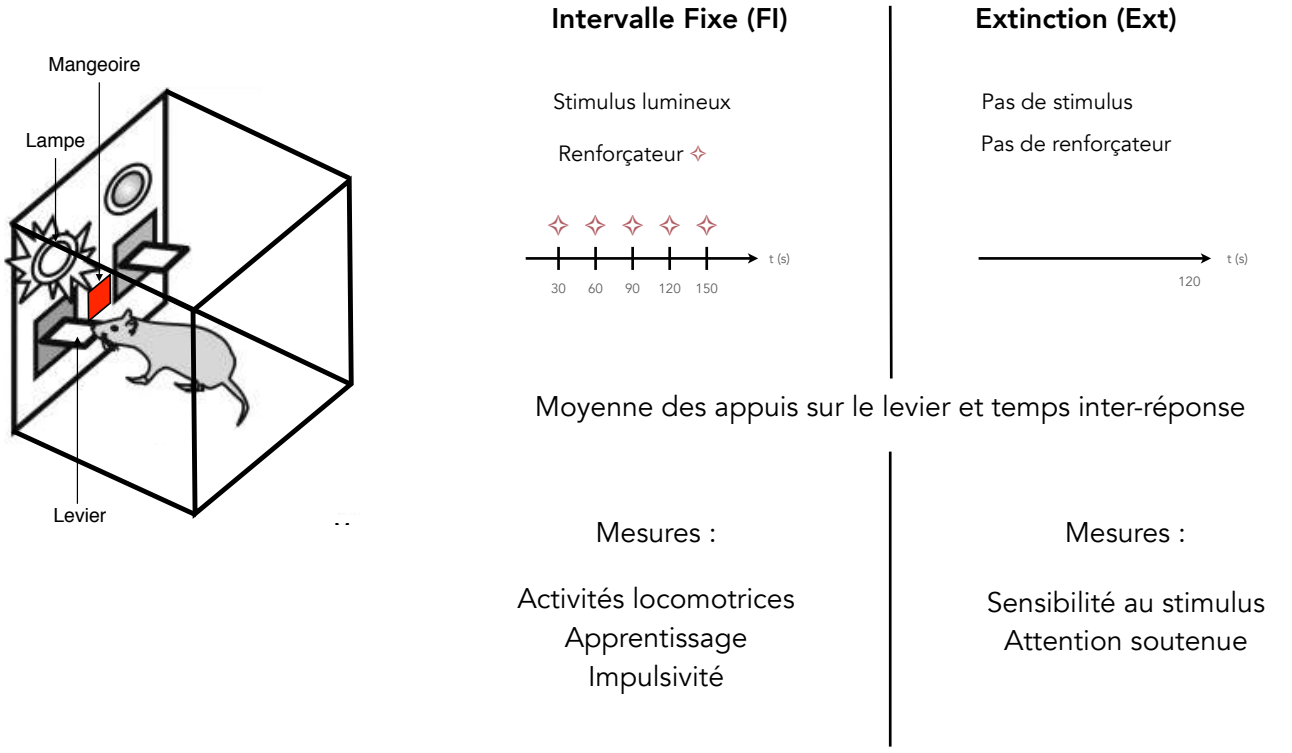


Figure 19 : Principe du test FI/Ext.

A gauche est schématisée une cage de comportement opérant avec une lumière et un levier. A droite est représenté le déroulement du test FI/Ext.

Le test des cinq choix en série (5-CSRTT Five-choice serial réaction time task) montre des résultats similaires. Ce test se déroule dans une cage de conditionnement opérant équipée de 5 orifices contenant chacun une lumière, un levier ou un système de capteur pour le museau appelé « nose-poke » et un système de libération de récompense (Figure 20). Lorsqu'une lumière d'un des orifices s'allume, le rat doit aller appuyer sur le levier ou poser son museau pour obtenir une récompense. La difficulté du test peut être augmentée en contrôlant la durée d'éclairage. Si elle est plus courte cela nécessite que le rat soit plus attentif (Dalley et al., 2004). Si le rat répond avant le stimulus lumineux (réponse prématurée) ou sur un mauvais trou (réponse incorrecte), un temps mort de 5 secondes est appliqué durant lequel la lumière de la cage est éteinte et aucun essai n'est débuté (Higgins and Silenieks 2017). Si le rat ne répond pas dans le temps imparti après l'émission du stimulus lumineux, un temps mort est aussi appliqué. Si la réponse est correcte, un nouvel essai débute (Bari et al., 2008).
Les rats SHR/NCrl présentent tous les phénotypes comportementaux du TDAH ce qui permet de valider le critère de ressemblance (Sagvolden 2000).

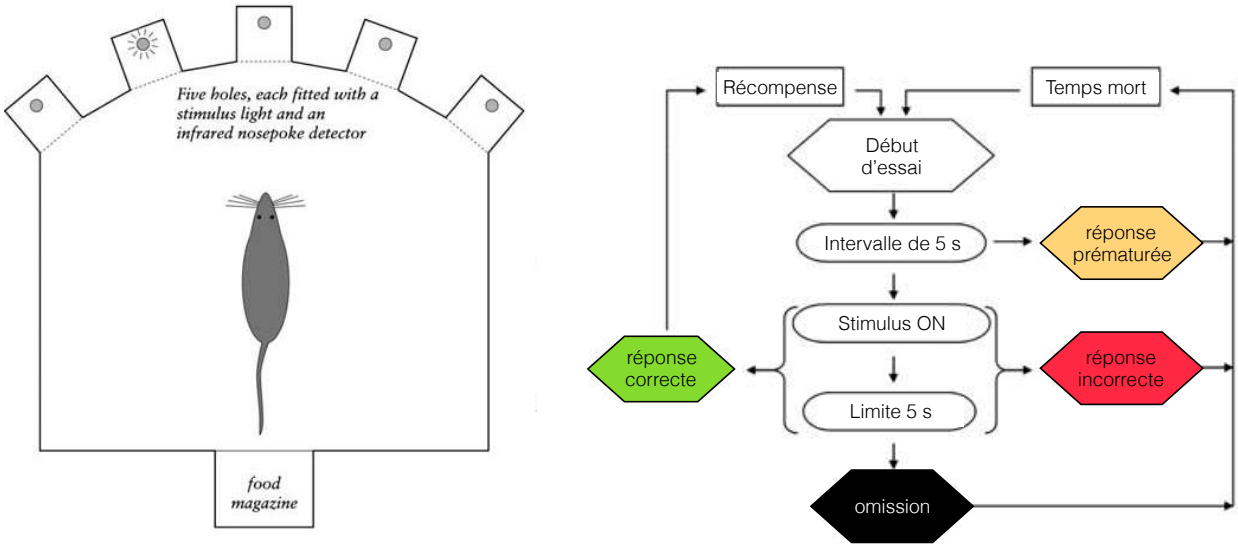


Figure 20 : Principe du test 5-CSRTT.
A gauche est représentée une cage de comportement avec les 5 orifices où sont placés les lumières et leviers. A droite est schématisé le déroulement du test 5-CSRTT.

IV.2.b - données génétiques et neurobiologiques *(validité de construction)*

D'un point de vue génétique, ces animaux présentent tout comme en clinique des anomalies génétiques.

Les rats SHR/NCrl ont des différences liées au sexe, en effet les données suggèrent que les mâles SHR/NCrl seraient plus hyperactifs et impulsifs que les femelles, alors que les femelles seraient plus inattentives que les mâles (Berger and Sagvolden 1998). De plus, les rats SHR/NCrl ont une diminution du volume global du cerveau (Bendel and Eilam 1992). Ces animaux présentent une insertion de 160 paires des bases dans la région de l'exon 3 du gène codant pour le transporteur de la dopamine (DAT1) décrite à la fois chez le rats SHR/NCrl et en clinique (Kuntsi et al., 2006; DasBanerjee et al., 2008). Cette mutation entrainerait une modification de l'expression du DAT, des études ont montré une augmentation de la densité de DAT chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats contrôles (Russell et al., 1995; Watanabe et al., 1997; Leo et al., 2003; Miller et al., 2012). De plus, les rats SHR/NCrl ont une altération de la libération de dopamine dans le cortex pré-frontal, le noyau accumbens, le noyau caudé et le putamen (Deutch and Roth 1990). Les jeunes mâles SHR/NCrl présentent aussi une diminution de la densité de récepteurs dopaminergiques D1 et D5 dans le striatum (Carey et al., 1998), ainsi qu'une réduction de l'expression du récepteur dopaminergique D4 dans le cortex pré-frontal (Li et al., 2007). Le système noradrénergique semble aussi altéré chez ces animaux, différentes études ont montré une hypernoradrénergie corticale (Russell and Wiggins 2000). En effet, l'ensemble de ces données montre la validité de construction des rats SHR/NCrl en tant que modèle du TDAH (Russell 2011).

IV.2.c - données comportementales après un traitement *(validité prédictive)*

Le méthylphénidate est le médicament le plus couramment utilisé en clinique. Plusieurs études comportementales ont mis en évidence l'efficacité du méthylphénidate sur le comportement des rats SHR/NCrl. La prise de méthylphénidate permet de diminuer l'activité locomotrice et exploratoire des rats SHR/NCrl ainsi qu'une sensibilité moins importante au délai (Wultz et al., 1990; Sagvolden et al., 1992). Par la suite, différentes études ont confirmé l'efficacité du méthylphénidate à l'aide de différents tests comportementaux tels que l'open field pour mesurer l'activité locomotrice, « l'attentional set-shifting task » pour mesurer la capacité attentionnelle ou encore le « delay discouting task » pour mesurer la résistance au délai (Slezak and Anderson 2011; Cao et al., 2012; Harvey et al., 2013; Umehara et al., 2013). Des études ont montré l'efficacité du MPH et de la d-amphétamine sur les performances des rats lors du test FI/Ext (Sagvolden et al., 2005).

Il existe cependant d'autres études contredisant ces résultats. Il a été montré que le MPH n'avait aucun effet sur l'hyperactivité locomotrice (Thanos et al., 2007) ni sur l'impulsivité (Dommett 2014). Ces données suggèrent que le modèle SHR/NCrl ne présenterait pas une bonne validité prédictive. Il est toutefois important de noter que certains patients atteints de TDAH ne répondent pas non plus au MPH (Sagvolden and Johansen 2012). De plus, les études n'utilisent pas les mêmes tests comportementaux ni les mêmes doses de MPH ce qui empêche de les comparer. Dans certains cas, l'utilisation de rats témoins ne respectant pas les recommandations peuvent entrainer des mauvaises interprétations. La validité prédictive de ce modèle est remise en doute par certaines études mais le modèle SHR/NCrl comparé aux rats WKY/NHsd reste à l'heure actuelle le modèle de TDAH le plus utilisé et caractérisé.

IV.2.d - Limites du modèle

L'hypertension artérielle pourrait être à l'origine de dommages cérébraux entraînant les symptômes observés. Cependant des études cliniques n'ont pas montré de lien entre l'hypertension et des effets cognitifs (Anstey and Christensen 2000; Birkenhager et al., 2001). De plus, les jeunes rats SHR/NCrl ne présentent ni d'hypertension artérielle ni d'altération cognitive comparés aux rats WKY/NHsd (Diana 2002). Ces données suggèrent que l'hypertension n'influe pas sur les déficits cognitifs observés chez ces rats.

IV. A - Etude 1 - Etude du métabolome cérébral et périphérique dans un modèle animal de TDAH

La physiopathologie du TDAH n'est pas totalement élucidée ce qui rend l'objectif d'identification de biomarqueurs compliqué. Les modèles animaux représentent une opportunité intéressante d'avoir accès à la fois aux compartiments centraux et périphériques.
La première étude de ce travail porte sur l'étude métabolomique du cerveau et des métabolomes périphériques sanguin et urinaire. Les objectifs sont de :

- Discriminer, si possible, les rats SHR/NCrl des rats WKY/NHsd sur la base de leur métabolome cérébral.
- Discriminer, si possible, les rats SHR/NCrl des rats WKY/NHsd sur la base de leur métabolome sanguin et urinaire.
- Déterminer une signature métabolomique centrale et périphérique spécifique des rats SHR/NCrl.
- Mettre en lien les modifications cérébrales et périphériques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans le journal Translational Psychiatry présentée ci-après.

IV.A.1 - Publication scientifique « Les rats SHR/NCrl, modèle animal de TDAH, peuvent être discriminés des rats contrôles à partir de leur métabolome cérébral, sanguin et urinaire »

Dupuy et al. *Translational Psychiatry* (2021)11:235
https://doi.org/10.1038/s41398-021-01344-4

Translational Psychiatry

ARTICLE Open Access

SHR/NCrl rats as a model of ADHD can be discriminated from controls based on their brain, blood, or urine metabolomes

Camille Dupuy[1], Pierre Castelnau[1,2], Sylvie Mavel[1], Antoine Lefevre[1], Lydie Nadal-Desbarats[1], Sylvie Bodard[1], Julie Busson[1], Diane Dufour-Rainfray[1,2], Helene Blasco[1,2], Patrick Emond[1,2] and Laurent Galineau[1]

Abstract

Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common neurodevelopmental disorder characterized by inattention, impulsivity, and hyperactivity. The neurobiological mechanisms underlying ADHD are still poorly understood, and its diagnosis remains difficult due to its heterogeneity. Metabolomics is a recent strategy for the holistic exploration of metabolism and is well suited for investigating the pathophysiology of diseases and finding molecular biomarkers. A few clinical metabolomic studies have been performed on peripheral samples from ADHD patients but are limited by their access to the brain. Here, we investigated the brain, blood, and urine metabolomes of SHR/NCrl vs WKY/NHsd rats to better understand the neurobiology and to find potential peripheral biomarkers underlying the ADHD-like phenotype of this animal model. We showed that SHR/NCrl rats can be differentiated from controls based on their brain, blood, and urine metabolomes. In the brain, SHR/NCrl rats displayed modifications in metabolic pathways related to energy metabolism and oxidative stress further supporting their importance in the pathophysiology of ADHD bringing news arguments in favor of the Neuroenergetic theory of ADHD. Besides, the peripheral metabolome of SHR/NCrl rats also shared more than half of these differences further supporting the importance of looking at multiple matrices to characterize a pathophysiological condition of an individual. This also stresses out the importance of investigating the peripheral energy and oxidative stress metabolic pathways in the search of biomarkers of ADHD.

Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common neurodevelopmental disorder affecting 5.3% of school-aged children[1] and 2.5–4.9% of adults[2,3]. ADHD symptoms include inattention and hyperactivity/impulsivity, with three symptom presentations described by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5): predominantly inattentive, predominantly hyperactive/impulsive, and combined profiles, which may vary over time. The diagnosis mainly relies on detailed clinical evaluations of the symptoms and careful assessment of the attention and executive functions[4]. However, the high heterogeneities of the phenotypic presentations and temporal courses of the disorder, along with the numerous comorbidities, render this diagnosis difficult to establish and often delayed[5]. Besides, false positives and false negatives are not unusual. Thus, there is a crucial need for biomarkers to facilitate an early and reproducible ADHD diagnosis in order to promote appropriate care and follow-up of the patients. Toward this aim, numerous genetic and neuroimaging studies were conducted in ADHD patients over the past two decades but failed to provide relevant tools for reliable diagnosis on a routine basis[4].

Correspondence: Laurent Galineau (galineau@univ-tours.fr)
[1]UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France
[2]CHRU Tours, Tours, France
These authors contributed equally: Patrick Emond, Laurent Galineau

© The Author(s) 2021
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

To date, metabolomic strategies remain largely unexplored in the search for ADHD biomarkers[6]. Only a few hypothesis-driven and one nonhypothesis-driven studies using various sample types have been performed in ADHD patients. Therefore, additional studies are needed to identify useful peripheral biomarkers[7,8]. Metabolomics aims at providing qualitative and quantitative changes of hundreds of metabolites[9] and has been increasingly used to identify molecular fingerprints in neurodevelopmental disorders. In this context, metabolomic studies in animal models are of a great interest as it allows to access peripheral but also central compartments to better evaluate how potential peripheral metabolomic changes can reflect central modifications.

The goal of the present study was to explore the cerebral and peripheral metabolomes of SHR/NCrl vs WKY/NHsd rats, which is one of the most extensively studied and characterized animal model of ADHD with good face and construct validities[10–15]. Our specific objectives were (i) to characterize the modifications in the brain, blood, and urine metabolomes in this animal model of ADHD, and (ii) to identify peripheral modifications in metabolites/metabolic pathways related to the reported cerebral changes.

Materials and methods

Subjects

The subjects were eight male SHR/NCrl rats (Charles River, Germany), which were compared to eight male WKY/NHsd control rats (Harlan, United Kingdom); all rats were 8 weeks old, i.e., before the onset of hypertension in the SHR/NCrl rats, as described by Sagvolden et al.[11]. Animals were housed in groups of 2 or 3 under humidity—and temperature-controlled conditions and a 12:12 light-dark cycle (light on at 7:00 AM) with ad libitum access to food and water. All animal experiments were conducted in accordance with EU guidelines (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), and approved by a local Ethics Committee (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale—Pays de la Loire—France).

Sample collection

Urine samples were collected before sacrifice by handling the animals. Immediately after decapitation, blood samples were collected in vials filled with 1.8 mg of EDTA (Sigma–Aldrich, France), centrifuged at 11,500 × *g* and 4 °C for 10 min and the plasma retrieved. Samples were stored at −80 °C. The brains were quickly removed and prepared as described below.

Sample preparation

Brain samples were freeze-dried (FreeZone® 4.5 L, Labconco, USA) at −107 °C and 0.2 mbar for 12 h. The lyophilized material (3 mg) was mixed with 750 µL of ACN/H_2O (1:1), vortexed for 15 s, homogenized by gentle planar shaking at 4 °C for 30 min and centrifuged at 11,500 × *g* and 4 °C for 15 min (Thermo Fischer, USA). Supernatants (500 µL) were concentrated under vacuum (SpeedVac, Thermo Fischer, USA) at 45 °C for 4 h. The resultant dry residues were reconstituted in 100 µL of MeOH/H_2O (1:9).

Urine samples were diluted to the tenth with ultrapure water and vortexed for 15 s.

Metabolites were extracted from 100 µL of plasma by adding 800 µL of MeOH/H_2O (1:1). The samples were then vortexed for 15 s, homogenized by gentle planar shaking at 4 °C for 30 min, and centrifugated at 11,500 × *g* and 4 °C for 10 min to collect 500 µL of supernatant. Supernatants were concentrated under vacuum (SpeedVac, Thermo Fischer, USA) at 45 °C for 4 h. The dried residues were reconstituted in 100 µL of MeOH/H_2O (1:9). Each prepared sample was then transferred to a 96-well plate for liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis. Quality control samples (QCs) were obtained from a pooled mixture of equal volumes of all samples for each matrix. Fifteen QCs were injected to equilibrate the chromatographic system before each analytic batch and QCs were analyzed every 10 samples.

Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Analysis (LC-HRMS)

LC-HRMS analysis was performed on a UPLC Ultimate 3000 system (Dionex, Germany) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher, Germany) and operated in positive and negative electro spray ionization (ESI + and ESI−). Chromatography was performed as previously described[16]. For both modes, heated ESI source parameters consisted in a spray voltage of 3 kV, a capillary temperature of 380 °C, a heater temperature of 350 °C, a sheath gas flow of 40 arbitrary units (AU), an auxiliary gas flow of 20 AU, a spare gas flow of 2 AU, and a tube lens voltage of 50 V. The full-scan acquisition ranged from 58 to 870 *m/z* and the instrument operated at 70,000 resolution (*m/z* = 200), with an automatic gain control target of 1×10^6 charges and a maximum injection time of 250 ms. The identity of each sample was processed by experimenters blinded its experimental group.

Data processing for targeted LC-HRMS

A library of 495 standard metabolites (Mass Spectroscopy Metabolite Library, IROA technologies, USA) was used for the construction of an in-house metabolite database. Targeted molecules from our database were selected and integrated into Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher, USA) as previously described[17]. Each peak area was normalized to the total of peak areas of interest. Metabolites

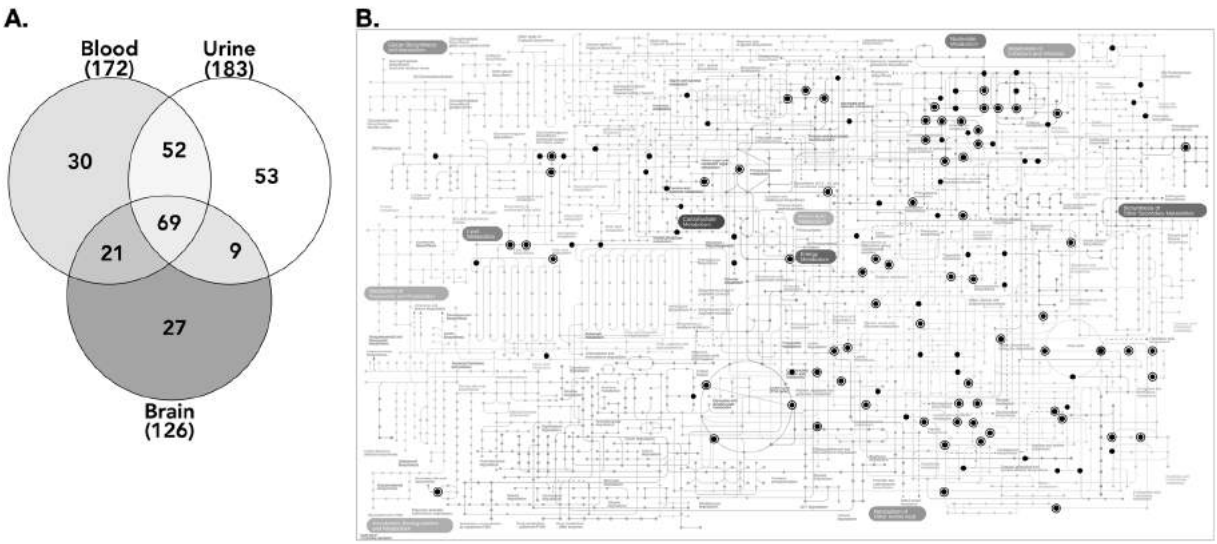


Fig. 1 Number of metabolites detected in the brain, blood, and urines of SHR/NCrl and WKY/NHsd rats. A Venn diagram presenting the number of metabolites detected in each compartment. **B** Black circles representing metabolites detected in the blood or urine compartments of SHR/NCrl and WKY/NHsd rats. The open circles correspond to the metabolites detected in the brain of SHR/NCrl and WKY/NHsd rats.

detected with greater than 30% variance (CV%) in QC samples were not selected for further analysis.

Statistical analysis

The metabolic card was performed using the web-based tool iPath 3.0 to represent all the metabolites detected in the brain on the metabolic pathways based on the latest version of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, www.kegg.jp). A Venn diagram was performed to assess the complementarity between the rat's brain, plasma, and urines samples using the jvenn online tool (http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/index.html).

Multivariate analyses were performed using Metaboanalyst 4.0[18], and included principal component analyses (PCA) and partial least squares discriminant analyses (PLS-DA). PCA were performed on brain, plasma, and urine samples to identify outliers (one rat from each group of the brain samples was excluded), and to perform unsupervised clustering of SHR/NCrl and WKY/NHsd rats. PLS-DA were performed on brain, plasma, and urine samples to build discriminant models between the two strains. Each model was characterized by the cumulative modeled variation in the Y matrix R^2Y, and the cross-validated predictive ability Q^2 values, providing the discriminant metabolites called variable importance in projection (VIP). Metaboanalyst 4.0 was also used for univariate analyses using volcano plots on brain, plasma, and urine samples to select the metabolites whose levels were statistically significantly different between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats (p-value corrected for False Discovery Rate = [FDR] values), and whose concentrations differed between SHR/NCrl rats and controls by less than 0.75-fold or more than 1.25-fold. Pathway analyses using Metaboanalyst 4.0 were conducted on the VIP metabolites. The pathways were considered when displaying FDR values <0.05 and a non-null impact value. Correlation analyses were performed for metabolites that were significantly altered in the brain and plasma and/or urines samples using Metaboanalyst 4.0 and were considered significant when $p < 0.05$. Linear regression curves were generated using GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism, USA).

Results

Metabolic profile of the central and peripheral compartments of SHR/NCrl and WKY/NHsd rats

Starting from a library of 495 compounds, the number of metabolites detected in both rat strains ranged from 125 to 182, representing 25–37% of the whole library (Fig. 1A). The number of metabolites detected in the brain was slightly smaller compared to the peripheral compartments (125 metabolites in the brain vs 171 and 182 in blood and urine, respectively; Fig. 1A). In addition, the brain shared 77 metabolites (61%) with the urine compartment, and 89 (71%) with the blood compartment (Fig. 1A). Finally, 68 metabolites (55% of the cerebral metabolites) were detected in all the matrices (Fig. 1A). Based on pathway analyses performed on each dataset, the detected metabolites were involved in 47, 50, and 51 metabolic pathways, respectively, described in the rat urine, blood, and brain compartments (Fig. 1B).

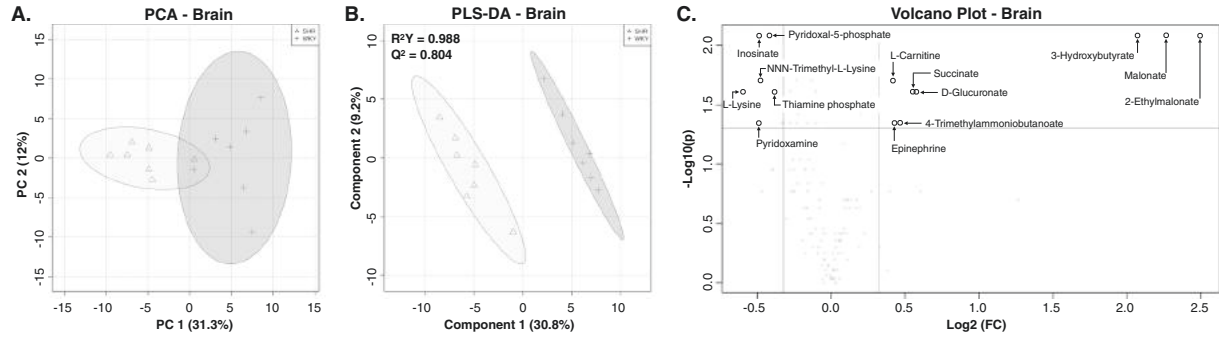


Fig. 2 Distinction between the SHR/NCrl and WKY/NHsd rats ($n = 7$ per group) based on brain metabolome. A Principal component analysis (PCA) score plot differentiating two groups corresponding to the brain metabolomes of SHR/NCrl (triangles) and WKY/NHsd (crosses) rats. **B** Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) showing the discriminant model based on two components built to separate SHR/NCrl (triangles) from WKY/NHsd brain metabolomes (crosses). **C** Volcano plot showing the metabolites with significant FDR values between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats and fold differences lower than 0.75 or greater than 1.25.

SHR/NCrl rats can be differentiated from controls based on their cerebral metabolome

Applying a PCA to the 125 metabolites detected in the brain enabled to clearly differentiate the SHR/NCrl rats from controls using two components representing 43% of their overall variations between the two strains (Fig. 2A). In addition, the distance between the subjects in the SHR/NCrl group suggests a low interindividual variability of their brain metabolome (Fig. 2A). The SHR/NCrl rats were separated from controls using a PLS-DA analysis based on a model showing an accuracy of 0.929, a R^2Y value of 0.988, and a predictive ability (Q^2) of 0.804 for the two first components (Fig. 2B). Fifty-three metabolites showed variable importance in prediction (VIP) scores superior to 1 (Table S1). Among them, 31 displayed significantly different brain concentrations in SHR/NCrl rats vs controls (Table S1). Of these 31 metabolites, 14 had concentrations that differed between SHR/NCrl rats and controls by less than 0.75-fold or more than 1.25-fold (Fig. 2C, Table S1). In detail, the brain concentrations of 2-ethylmalonate, malonate, 3-hydroxybutyrate, glucuronate, succinate, 4-trimethylammoniobutanoate, epinephrine, and carnitine were significantly higher in SHR/NCrl rats vs controls, while the concentrations of lysine, pyridoxamine, inosinate, NNN-trimethyl-lysine, pyridoxal-5-phosphate, and thiamine phosphate were significantly lower (Table S1). A pathway analysis performed using the 31 significantly different metabolites revealed modifications in 14 metabolic pathways between SHR/NCrl and control animals (Table 1). Among them, five pathways were related to amino acids metabolism (alanine and beta-alanine metabolism; aspartate and glutamate metabolism; lysine degradation; arginine and proline metabolism and tyrosine metabolism), four to energy metabolism (pantothenate and CoA biosynthesis; butanoate metabolism; citrate cycle and pentose and glucuronate interconversions), three to nucleotide metabolism (purine, pyrimidine and nicotinate metabolisms), and two to vitamin metabolism (vitamin B6 and ascorbate metabolisms) (Table 1). This pathway analysis did not include five metabolites of the VIPs, which are also involved in energy (2-ethylmalonate, malonate, 3-hydroxybutyrate, and carnitine), and vitamin (thiamine phosphate) metabolisms.

SHR/NCrl rats can also be differentiated from controls based on their peripheral metabolomes

Applying a PCA to the metabolites detected in the blood, and urine enabled to clearly differentiate the SHR/NCrl rats from the controls (Fig. 3A, D). Based on the metabolites detected in the blood, the PCA analysis differentiated the SHR/NCrl rats *vs* controls using two components representing 44% of the overall variation between the two strains (Fig. 3A). Similarly, the PCA based on the metabolites detected in the urine compartment enabled to easily divide the animals into two distinct populations corresponding to SHR/NCrl and control rats (Fig. 3D). This was achieved using two components representing 60% of the overall variation existing between the two strains (Fig. 3D).

The SHR/NCrl rats were also differentiated from controls using a PLS-DA based on blood and urine metabolites (Fig. 3B, E). The model obtained on the blood metabolites had an accuracy of 1.0, a R^2Y value of 0.989, and a Q^2 of 0.913 for two components (Fig. 3B). The model obtained on urine metabolites showed an accuracy of 1.0, a R^2Y value of 0.986, and a Q^2 of 0.944 for two components (Fig. 3E). Sixty-seven VIPs were observed for the blood compartment including 41 metabolites with statistically significant distinct concentrations between SHR/NCrl rats and controls (Table S2). A total of 105 metabolites (including 90 VIPs) showed significantly different urine concentrations between SHR/NCrl rats and controls (Table S3).

Table 1 Significant brain, blood, and urine pathways involved in the distinction between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats based on the variable importance in projection (discriminant metabolites) determined by the PLS-DA.

Compartment	Significant metabolic pathways		Match status	Matching metabolites	Holm p	FDR	Impact
Brain	Amino acid metabolism	Beta-Alanine metabolism	1/21	3-Ureidopropionate, Aspartate	0.0006	0.0001	0.104
		Alanine, aspartate, and glutamate metabolism	5/28	N-Acetyl-Aspartate, Aspartte, Asparagine, 4-Aminobutanoate, **Succinate**	0.0001	0.0001	0.400
		Lysine degradation	3/25	**Lysine**, **4-Trimethylammoniobutanoate**, **NNN-Trimethyl-Lysine**	0.0026	0.0005	0.005
		Arginine and proline metabolism	2/38	4-Aminobutanoate, 4-Guanidinobutanoate	0.0011	0.0003	0.024
		Tyrosine metabolism	1/42	**Epinephrine**	0.0089	0.0019	0.012
	Energy metabolism	Pantothenate and CoA biosynthesis	1/19	3-Ureidopropionate, Aspartate	0.0006	0.0001	0.029
		Butanoate metabolism	3/15	Hydroxybutanoate, 4-Aminobutanoate, **Succinate**	0.0005	0.0001	0.032
		Citrate cycle (TCA cycle)	1/20	**Succinate**	0.0059	0.0009	0.033
		Pentose and glucuronate interconversions	1/18	**Glucuronate**	0.0067	0.0010	0.125
	Nucleotide metabolism	Pyrimidine metabolism	1/39	3-Ureidopropionate	<0.0001	<0.0001	0.013
		Purine metabolism	2/66	**Inosinate**, Adenine	0.0010	0.0025	0.130
		Nicotinate and nicotinamide metabolism	3/15	Aspartate, Nicotinamide, Nicotinate	0.1231	0.0476	0.194
	Vitamin metabolism	Vitamin B6 metabolism	2/9	**Pyridoxamine, Pyridoxal-5-phosphate**	0.0018	0.0003	0.333
		Ascorbate and aldarate metabolism	1/10	**Glucuronate**	0.0068	0.0010	0.250
Blood	Amino acid metabolism	Beta-Alanine metabolism	4/21	Beta-Alanine, Beta-alanyl-N-methyl-histidine, Dihydrouracil, Spermidine	0.0014	0.0002	0.455
		Alanine, aspartate and glutamate metabolism	5/28	Alanine, Asparagine, 4-Aminobutanoate, Glutamine, Succinate	<0.0001	<0.0001	0.200
		Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1/4	Phenylalanine	0.0170	0.0019	0.500
		Arginine and proline metabolism	3/38	4-Aminobutanoate, Creatine, Spermidine	<0.0001	<0.0001	0.070
		Tryptophan metabolism	5/41	Indole-3-Acetaldehyde, Kynurenine, N-Acetylserotonin, N-Methyltryptamine, Tryptophan	<0.0001	<0.0001	0.291
		Glycine, serine, threonine metabolism	2/34	Creatine, Threonine	0.0036	0.0005	0.024
		Histidine metabolism	2/16	Beta-Alanyl-N-Methyl-Histidine, N-Methyl-Histidine	<0.0001	<0.0001	0.049
	Energy metabolism	Pantothenate and coA biosynthesis	3/19	Panthotenate, Dihydrouracil, Beta-Alanine	0.2713	0.0426	0.500
		Butanoate metabolism	2/15	4-Aminobutanoate, Succinate	0.0237	0.0032	0.032

Table 1 continued

Compartment	Significant metabolic pathways		Match status	Matching metabolites	Holm p	FDR	Impact
		Pentose and glucuronate interconversions	1/18	Glucuronate	0.0052	0.0010	0.125
	Nucleotide metabolism	Pyrimidine metabolism	4/39	Beta-Alanine, Dihydrouracil, Glutamine, Thymine	0.0002	<0.0001	0.063
		Caffeine metabolism	1/12	Dimethylxanthine	0.0011	0.0015	0.692
	Vitamin metabolism	Vitamin B6 metabolism	1/9	Pyridoxamine	0.2113	0.0426	0.078
	Lipid metabolism	Sphingolipid metabolism	1/21	Sphinganine	0.1564	0.0193	0.154
Urine	Amino acid metabolism	Beta-alanine metabolism	2/21	3-Ureidopropionate, Aspartate	0.0028	0.0014	0.105
		Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3/28	Asparagine, Aspartate, Glutamate	0.0011	0.0001	0.420
		Cysteine and methionine metabolism	1/33	Serine	0.0018	0.0004	0.022
		Arginine and proline metabolism	5/38	Arginine, Glutamate, Guanidinoacetate, Hydroxyproline, Proline	<0.0001	<0.0001	0.306
		Glutamate and glutamine metabolism	1/6	Glutamate	0.0016	0.0002	0.500
		Glycine, serine, threonine metabolism	3/34	5-Aminolevulinate, Guanidinoacetate, Serine	<0.0001	<0.0001	0.231
		Histidine metabolism	4/16	Aspartate, Glutamate, Histamine, N-Methyl-Histidiine	<0.0001	<0.0001	0.189
		Arginine biosynthesis	4/14	Arginine, Aspartate, Glutamate, N-Acetyl-Glutamate	0.0015	0.0002	0.193
	Energy metabolism	Pantothenate and coA biosynthesis	2/19	3-Ureidopropionate, Aspartate	0.0028	0.0014	0.029
		Glyoxylate metabolism	2/32	Glutamate, Serine	0.0005	<0.0001	0.042
		Sucrose metabolism	1/18	Glucose	0.0011	0.0001	0.421
		Pentose and glucuronate interconversions	1/18	Glucuronate	0.0016	0.0002	0.125
		Galactose metabolism	1/27	Glucose	0.0011	0.0001	0.035
	Nucleotide metabolism	Pyrimidine metabolism	1/39	3-Ureidoproppionate	0.0016	0.0002	0.013
		Caffeine metabolism	1/12	Dimethylxanthine	0.0011	0.0015	0.693
	Vitamin metabolism	Ascorbate metabolism	1/10	Glucuronate	0.0016	0.0002	0.250
	Antioxidative metabolism	Glutathione metabolism	1/28	Glutamate	0.0016	0.0002	0.020
		Porphyrin metabolism	2/30	5-Aminolevulinate, Glutamate	0.0003	<0.0001	0.028

For the brain, the metabolites written in bold characters correspond to those showing significant FDR and fold difference values.

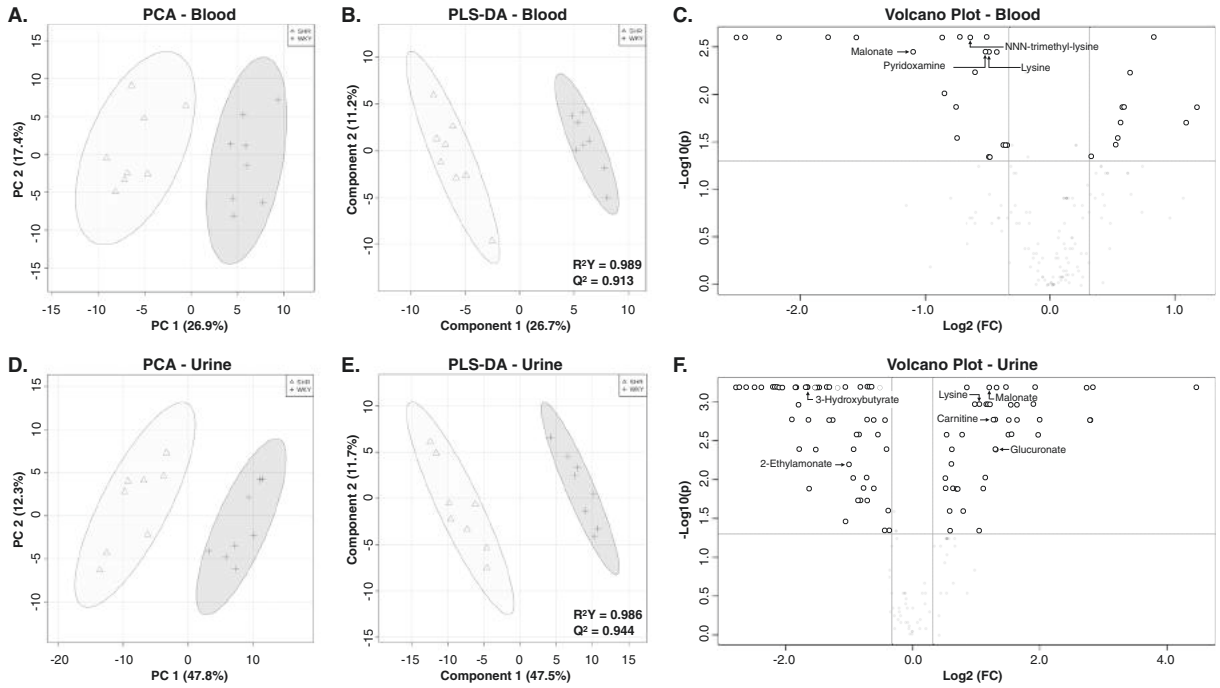


Fig. 3 Distinction between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats ($n = 8$ per group) based on peripheral metabolomes. A PCA score plot differentiating two groups corresponding to the blood metabolomes of SHR/NCrl (triangles) and WKY/NHsd (crosses) rats. **B** PLS-DA showing the discriminant model based on two components built to separate SHR/NCrl (triangles) from WKY/NHsd blood metabolomes (crosses). **C** Volcano plot showing the significant metabolites in the brain that also present significant FDR values between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats and fold differences lower than 0.75 or greater than 1.25 in blood samples. **D** PCA score plot differentiating two groups corresponding to the urine metabolomes of SHR/NCrl (triangles) and WKY/NHsd (crosses) rats. **E** PLS-DA showing the discriminant model based on two components built to separate SHR/NCrl (triangles) from WKY/NHsd urine metabolomes (crosses). **F** Volcano plot showing the significant metabolites in the brain that also present significant FDR values between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats and fold differences lower than 0.75 or greater than 1.25 in urine samples.

The pathway analysis showed significant modifications in 14 and 18 metabolic pathways in blood and urines of SHR/NCrl rats, respectively (Table 1). Interestingly, more than half of the pathways detected in the brain were also observed in the periphery (i.e., significant changes in 8 of the 14 brain pathways were found in the periphery; Fig. 4B). Thus, SHR/NCrl rats showed significant modifications in the amino acids, energy, nucleotides, and vitamin metabolisms in all the peripheral compartments as observed in the brain, as well as changes in the lipid metabolism in the blood and antioxidant metabolism in urines (Table 1).

Only looking at metabolites with significant FDR and fold-change values between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats, six metabolites were significantly modified in both brain and urine compartments, and four were significantly modified in both brain and blood compartments. Malonate and lysine concentrations between SHR/NCrl and WKY/NHsd rats were different in brain, blood, and urines. Changes in pyridoxamine and NNN-trimethyl-lysine between SHR/NCrl vs WKY/NHsd rats were specific to the brain and blood compartments, while changes in 2-ethylmalonate, 3-hydroxybutyrate, carnitine, and glucuronate were specific to brain and urines compartments.

Relationships between the brain and peripheral metabolomes

A hierarchical clustering revealed that the compartment has more impact than the strain on the metabolomic differences observed, with a clear distinction of the central vs peripheral metabolomes (Fig. 4A). Significant correlations between brain and peripheral concentrations of gluruconate and malonate were specifically observed in SHR/NCrl rats (Fig. 4B). A significant negative correlation between the levels of glucuronate in the brain and in the urines ($r^2 = 0.849$, $p = 0.002$) (Fig. 4B). In addition, malonate concentrations in brain and urines were positively correlated to each other in SHR/NCrl rats ($r^2 = 0.815$, $p = 0.026$) (Fig. 4B).

Discussion

This study provides the first metabolomic characterization of the ADHD model based on the comparison of

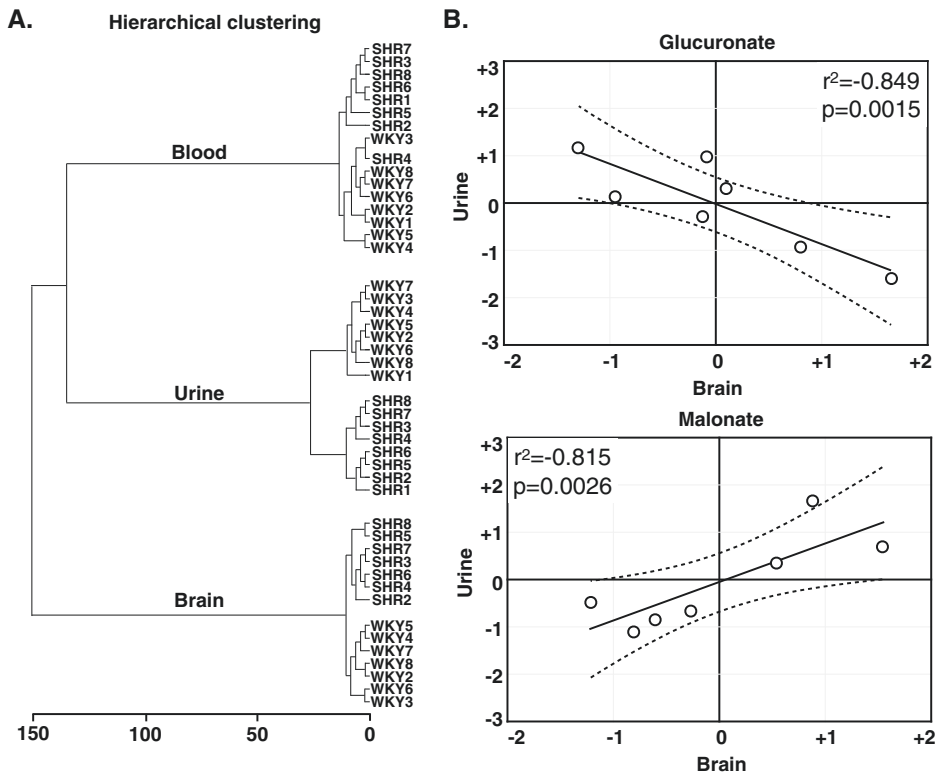


Fig. 4 Relationships between the brain and peripheral metabolomes. A Hierarchical clustering analysis showing differences between brain and peripheral metabolomes in SHR/NCrl and WKY/NHsd rats. **B** Correlation between brain and peripheral concentrations of glucuronate and malonate in SHR/NCrl rats.

SHR/NCrl rats vs WKY/NHsd animals used as controls. Here we extensively studied the differences existing between SHR/NCrl rats vs controls in the brain and in the peripheral matrices. We showed that the brain, blood, and urine metabolomes can be used to discriminate SHR/NCrl rats from controls. The main cerebral differences between the two strains mainly consist in modifications in amino acid, energy, and vitamin metabolisms, that were also observed in blood and urines. In addition, malonate and glucuronate concentrations in the brain and urine compartments of SHR/NCrl rats were significantly correlated.

Limitations of the animal model

Even though SHR compared to WKY rats are one of the mostly used animal model of ADHD, it has also been criticized for its face and predictive validities, based on studies showing no differences in locomotor activity between SHR rats and controls, and others suggesting a lack of effect of methylphenidate on the ADHD-related phenotypes of this animal model[19–23]. Sagvolden and collaborators reported genetic and behavioral differences in existing among the strains of SHR and WKY rats, and showed the importance of using specifically SHR rats from Charles River Germany (SHR/NCrl) compared to WKY rats from Envigo U.K. (WKY/NHsd) to model the ADHD-related inattention, impulsivity, and hyperactivity[11]. As also highlighted by Sagvolden and collaborators, most of the studies questioning the face and predictive validities of SHR/NCrl vs WKY/NHsd rats as a model of ADHD were confounded by the settings used to assess rat's behaviors[11]. In this study, we used the recommended strains of SHR and WKY rats to match with the studies that extensively characterized the ADHD-related behaviors of the animal model.

This animal model of ADHD is also confounded by the development of hypertension from 10 to 12 weeks of age[24], and cognitive deficits observed in 11-week-old animals[25]. A recent metabolomic study performed in urine and plasma samples of 40-weeks-old SHR and WKY rats described a significant correlation between urine and blood variations of several metabolites and hypertension[26] (urine levels of dimethylarginine, N2-acetyl-L-ornithine, buthionine sulfoximine, uric acid, L-isoleucine, and creatinine; blood levels of Vitamine E and phospholipids). Although we cannot completely rule out that our metabolic data could be related to the development of hypertension in our experimental conditions, we worked on

8-weeks-old animals, and our peripheral data are not in line with the urinary and plasma biomarkers significantly correlated with hypertension in these studies.

SHR/NCrl rats mainly differed from controls through their cerebral energy and adrenaline metabolisms

SHR/NCrl rats showed lower brain levels in thiamine phosphate compared to controls. Interestingly, old reports suggested that vitamin supplementations, including thiamine, could carry beneficial effects on ADHD symptoms[27,28]. Thiamine phosphate is a cofactor of the pyruvate dehydrogenase, alpha-ketoglutarate dehydrogenase, and trans-ketolase[29], involved in the glycolysis, pentose phosphate pathway and Krebs cycle. Therefore, significant alterations of the cerebral energy metabolism were expected in this ADHD animal model. This is consistent with studies reporting decreased expression of the dihydrolipoyl dehydrogenase, a part of the pyruvate dehydrogenase complex in the medulla oblongata of SHR/NCrl rats[30], along with decreased ATP production capacities in discrete brain regions in this animal model of ADHD[30,31].

In line with such hypothesis, we observed significantly elevated levels in succinate, malonate and 2-ethylmalonate in SHR/NCrl rats compared to controls. Both malonate and 2-ethylmalonate inhibit several Krebs cycle's enzymes, including the succinate dehydrogenase[32,33] fitting well with the higher levels of succinate detected. Based on the key role of succinate in the Krebs cycle and in the respiratory chain, these results further support a dysfunctional brain energy metabolism in this animal model of ADHD. In addition, elevated succinate levels and mitochondrial dysfunctions have been associated to an increased oxidative stress, which has been extensively described in the brain of this animal model[34,35], and in ADHD patients[36–39]. The higher brain levels of 2-ethylmalonate also observed in SHR/NCrl rats are consistent with an increased oxidative stress as it is a reliable lipid peroxidation biomarker[40]. Thus, the higher brain levels of glucuronate detected could reflect an elevated activity of the pentose phosphate pathway due to the increased oxidative stress, as the pentose phosphate pathway is used by neurons to regenerate glutathione[41]. In line with these results and other studies reporting protective effects of methylphenidate on oxidative stress[37,38], Fagundes and collaborators already showed that a methylphenidate treatment increases the succinate dehydrogenase and activates the mitochondrial respiratory chain of young Wistar rats further supporting our hypothesis[42].

We also detected higher carnitine and 3-hydroxybutyrate brain levels in SHR/NCrl rats *vs* controls. Carnitine plays a key role in energy metabolism by transporting long-chain fatty acids to the mitochondria for the production of acetyl-CoA via the beta-oxidation, and removes short and medium chain fatty acids formed by metabolic processes to prevent their accumulation in the mitochondria[43]. Thus, these higher brain carnitine levels could reflect modifications in the lipid metabolism in SHR/NCrl rats. Fatty acids and ketone bodies such as 3-hydroxybutyrate are alternative energy substrates during development or when glucose availability is limited[31]. In our experimental conditions, the cerebral glucose concentrations in the SHR/NCrl rats were not different from controls. Moreover, 3-hydroxybutyrate is no longer a substitute of glucose for brain energy metabolism after 30 days of life in rats[44]. Studies reported a switch towards other energy substrates to maintain the Krebs cycle supply with acetyl-CoA in conditions of decreased pyruvate dehydrogenase activity[45–47]. Based on the lower thiamine levels we observed in SHR/NCrl rats, and on its role as cofactor of enzymes including the pyruvate dehydrogenase, we cannot exclude that the higher carnitine and 3-hydroxybutyrate levels we observed could reflect such a switch in energy substrates. Another explanation could rely in their antioxidant properties[43,48–50] in response to the higher oxidative stress detected in this animal model of ADHD[34,35].

Intracerebral injections of malonate have been used as an inducer of energy mitochondrial metabolic dysfunctions, and have been shown to induce modifications in dopamine neurotransmission[51]. Based on the implication of dopamine in the pathophysiology of ADHD, this support that such abnormalities related to neuroenergetic[52–54] and oxidative stress could be one of the molecular mechanism involved in the pathophysiology of ADHD-related phenotypes in SHR/NCrl vs WKY/NHsd rats. Thus, we expected to see modifications in the cerebral levels of various neurotransmitters in SHR/NCrl rats vs controls, as the implication of multiple neurotransmitters has already been suggested in ADHD[55–57], and dopamine along with noradrenaline modifications have already been described in discrete regions in this animal model[13]. The fact that we analyzed the whole brain rather than discrete regions could explain the lack of results related to neurotransmitters metabolism in our experiments. Instead, we observed the lower brain levels of pyridoxamine-related compounds and higher adrenaline levels at the whole-brain scale in SHR/NCrl rats. Interestingly, lower peripheral levels of pyridoxamine have been reported in ADHD patients, and pyridoxamine supplementation has been suggested to normalize ADHD symptoms[58–60]. Pyridoxamine derivatives are co-factors of enzymes crucial to the biosynthesis of multiple neurotransmitters such as GABA, glutamate and monoamines[61] further supporting that the lower pyrixodamine levels observed in our study could be related to modifications in neurotransmitters contents in this animal model of ADHD.

Concerning adrenaline, higher brain concentrations have already been reported in the medulla oblongata in this animal model, along with greater expression of the phenylethanolamine N-methyltransferase, which is responsible for adrenaline biosynthesis[62–67]. Because the adrenergic neurons of the medulla oblongata are involved in the regulation of blood pressure, these higher levels were associated with the development of hypertension elicited by adult SHR rats. Even though our study was conducted before the appearance of hypertension in this animal model[13], we cannot exclude that the higher adrenaline levels we observed could be involved in the hypertension development in these rats. However, adrenergic neurons do not only send axonal projections in areas regulating autonomic functions, but also to the locus coeruleus and ventral tegmental area containing noradrenergic and dopaminergic neurons known to be involved in the pathophysiology of ADHD[47,68]. Thus, it cannot be excluded that higher adrenaline levels could be related to modifications in dopamine and noradrenaline contents in specific brain regions in this animal model of ADHD.

SHR/NCrl rats also exhibited unique peripheral metabolomes

In this study, we were able to differentiate SHR/NCrl rats from controls using discriminant models based on blood and urine samples with accuracies and predictive abilities superior to what was obtained in the brain. Besides, 61% of the metabolites involved in the discriminant model in the brain were also involved in the peripheral models, and almost all these metabolites were significantly different between SHR/NCrl rats and controls in central and peripheral compartments. This good coverage of the brain by the peripheral metabolomes should enable to identify valuable peripheral biomarkers related to the neurobiology underpinning this animal ADHD model. At the scale of metabolomic pathways, the urine compartment shared almost 80% of the differences detected in the blood. The interest of looking at the urine compartment in the context of neuropsychiatric diseases has already been highlighted, as this compartment is not subjected to the homeostatic changes observed in the blood[69]. Since a large number of metabolites are concentrated in urines, this could result in an enhanced sensitivity for the detection of low metabolic variations. In addition, the easy access to urines in humans makes it a compartment of choice for patients in which blood sampling can be more complex to collect. Thus, this further highlight the complementarity between peripheral compartments, and the interest at looking at multiple peripheral matrices to better reflect a cerebral pathophysiological condition.

As in the brain, our blood and urine results revealed significantly modified pathways related to amino acids, energetic, and vitamin metabolisms along with oxidative stress in SHR/NCrl rats vs controls. Clinical studies already explored peripheral matrices such as plasma, serum, saliva, and urine in ADHD subjects. Most of these studies have examined levels of growth factors, cortisol, melatonin, catecholamines, fatty acids, amino acids, oxidative stress, and pyridoxine metabolisms in ADHD patients, but no reliable biomarkers of ADHD have been uncovered to date[7,8,70,71]. However, studies showed results consistent with our findings: (i) impaired responses to oxidative stress have been observed in blood samples of ADHD patients, along with a relationship between low levels of pyridoxine and ADHD;[47,58,71,72] (ii) despite inconsistent results regarding tryptophan pathway changes in the blood of ADHD children[61,62], lower serum levels of tryptophan and related metabolites have been reported in adult patients[73], in line with the association between altered tryptophan and the ADHD-like behaviors exhibited by dogs[60], and as we observed in SHR/NCrl rats. Taken together, this further support the interest of exploring distinct peripheral matrices and metabolic pathways related to energy metabolism, oxidative stress, vitamins, and amino acids in the search for biomarkers of ADHD.

Questioning the relevance of potential peripheral metabolites of interest in ADHD, animal models represent an interesting opportunity to have access to both central and peripheral compartments. In addition to common differences observed at the scale of metabolic pathways between the brain and periphery of SHR/NCrl rats, we also detected metabolites that were significantly modified in the brain and periphery between SHR/NCrl rats and controls. These metabolites were related to energy metabolism and oxidative stress reinforcing the interest of investigating these metabolic pathways in peripheral compartments in the search of metabolic signature of ADHD. Significant correlations between the brain and urine variations of malonate and glucuronate were also specifically detected in SHR/NCrl rats. Such a relationship is of a great interest as these results emphasize the relevance to look at the whole individual, using cerebral but also peripheral matrices to better understand the biological modifications underlying pathological behaviors.

Conclusion

Fifteen years ago, Russell and colleagues proposed the so-called “Neuroenergetic hypothesis” of ADHD[52]. This hypothesis suggested alterations in neuronal transmissions due to deficits in energy supply to explain moment-to-moment fluctuations in task performance, which is a common feature of ADHD[52]. Our results are consistent

with this hypothesis and give new insights into the molecular mechanisms underlying such energetic dysfunction. Based on the limited access to brain metabolites in humans, the use of animal models to better understand the molecular mechanisms underlying ADHD pathogenesis remains an important avenue of research. The presence of such metabolomic modifications both in the brain and in the peripheral compartments, further support the relevance to look at these common metabolites and related metabolic pathways in the search of potential clinical ADHD biomarkers.

Acknowledgements
This study was funded by the INSERM, the Tours University and the Hyper Super TDAH France association (https://www.tdah-france.fr/). C.D. was the recipient of a PhD fellowship by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. We would like to thank Florence Paillard for editing the manuscript.

Conflict of interest
The authors declare no competing interests.

Publisher's note
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41398-021-01344-4.

Received: 8 September 2020 Revised: 18 March 2021 Accepted: 30 March 2021
Published online: 22 April 2021

References

1. Polanczyk, G. V. et al. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *Int. J. Epidemiol.* **43**, 434–442 (2014).
2. Simon, V. et al. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* **194**, 204–211 (2009).
3. Ramos-Quiroga, J. A. et al. Addressing the lack of studies in attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. *Expert Rev. Neurother.* **14**, 553–567 (2014).
4. Faraone, S. V. Attention deficit hyperactivity disorder and premature death. *Lancet* **385**, 2132–2133 (2015).
5. Jensen, P. S. et al. ADHD comorbidity findings from the MTA study: comparing comorbid subgroups. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **40**, 147–158 (2001).
6. Humer, E., Probst, T. & Pieh, C. Metabolomics in psychiatric disorders: what we learn from animal models. *Metabolites* **10**, 106–125 (2020).
7. Faraone, S. V., Bonvicini, C. & Scassellati, C. Biomarkers in the diagnosis of ADHD–promising directions. *Curr. Psychiatry Rep.* **16**, 497 (2014).
8. Wang, L. J. et al. Novel plasma metabolite markers of attention-deficit/hyperactivity disorder identified using high-performance chemical isotope labelling-based liquid chromatography-mass spectrometry. *World J. Biol. Psychiatry* **21**, 1–10 (2020).
9. Kristal, B. S. et al. Metabolomics in the study of aging and caloric restriction. *Methods Mol. Biol.* **371**, 393–409 (2007).
10. Bizot, J. C. et al. Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacology* **193**, 215–223 (2007).
11. Sagvolden, T. et al. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD–the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology* **57**, 619–626 (2009).
12. Meneses, A. et al. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Rev. Neurosci.* **22**, 365–371 (2011).
13. Russell, V. A. Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Curr. Protoc. Neurosci.* **54**, 9.35.1–9.35.25 (2011).
14. Sagvolden, T. & Johansen, E. B. Rat models of ADHD. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **9**, 301–315 (2012).
15. Bayless, D. W., Perez, M. C. & Daniel, J. M. Comparison of the validity of the use of the spontaneously hypertensive rat as a model of attention deficit hyperactivity disorder in males and females. *Behav. Brain Res.* **286**, 85–92 (2015).
16. Dieme, B. et al. Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC-MS and GC-MS analytical platforms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **142**, 270–278 (2017).
17. Bitar, T. et al. Identification of metabolic pathway disturbances using multimodal metabolomics in autistic disorders in a Middle Eastern population. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **152**, 57–65 (2018).
18. Chong, J., Wishart, D. S. & Xia, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **68**, e86 (2019).
19. van den Bergh, F. S. et al. Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **83**, 380–390 (2006).
20. Peres, F. F. et al. A schizophrenia-like behavioral trait in the SHR model: applying confirmatory factor analysis as a new statistical tool. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **85**, 16–22 (2018).
21. Aparicio, C. F. et al. Spontaneously hypertensive (SHR) rats choose more impulsively than Wistar-Kyoto (WKY) rats on a delay discounting task. *Behav. Brain Res.* **364**, 480–493 (2019).
22. Leffa, D. T. et al. Systematic review and meta-analysis of the behavioral effects of methylphenidate in the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **100**, 166–179 (2019).
23. Niigaki, S. T. et al. Young spontaneously hypertensive rats (SHRs) display prodromal schizophrenia-like behavioral abnormalities. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **90**, 169–176 (2019).
24. Calderon-Zamora, L. et al. Changes in expression of orphan receptors GPR99 and GPR107 during the development and establishment of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **29**, 1–8 (2020).
25. Weise, G. et al. Transplantation of cryopreserved human umbilical cord blood mononuclear cells does not induce sustained recovery after experimental stroke in spontaneously hypertensive rats. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **34**, e1–9 (2014).
26. Onuh, J. O. & Aliani, M. Metabolomics profiling in hypertension and blood pressure regulation: a review. *Clin. Hypertens.* **26**, 23 (2020).
27. Coleman, M. et al. A preliminary study of the effect of pyridoxine administration in a subgroup of hyperkinetic children: a double-blind crossover comparison with methylphenidate. *Biol. Psychiatry* **14**, 741–751 (1979).
28. Brenner, A. The effects of megadoses of selected B complex vitamins on children with hyperkinesis: controlled studies with long-term follow-up. *J. Learn Disabil.* **15**, 258–264 (1982).
29. Dhir, S. et al. Neurological, psychiatric, and biochemical aspects of thiamine deficiency in children and adults. *Front. Psychiatry* **10**, 207 (2019).
30. Sun, D. et al. Quantitative proteome of medulla oblongata in spontaneously hypertensive rats. *J. Proteome Res.* **12**, 390–395 (2013).
31. Dimatelis, J. J. et al. Impaired energy metabolism and disturbed dopamine and glutamate signalling in the striatum and prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Mol. Neurosci.* **56**, 696–707 (2015).
32. Mirandola, S. R. et al. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J. Inherit. Metab. Dis.* **31**, 44–54 (2008).
33. Amaral, A. U. et al. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 84–90 (2012).
34. Leffa, D. T. et al. Increased oxidative parameters and decreased cytokine levels in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurochem. Res.* **42**, 3084–3092 (2017).
35. Reckelhoff, J. F., Romero, D. G. & Yanes, L. L. Cardozo, sex, oxidative stress, and hypertension: insights from animal models. *Physiology (Bethesda)* **34**, 178–188 (2019).
36. Bulut, M. et al. Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* **32**, 435–438 (2007).
37. Guney, E. et al. Attention deficit hyperactivity disorder and oxidative stress: a short term follow up study. *Psychiatry Res.* **229**, 310–317 (2015).

38. Zhu, B., Gusdon, A. M. & Qu, S. Weight or metabolism: which deserve more attention in obesity?. *Ann. Transl. Med.* **6**, S127 (2018).
39. Corona, J. C. Role of oxidative stress and neuroinflammation in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Antioxidants (Basel)* **9**, 1039–1056 (2020).
40. Schuck, P. F. et al. Brain and muscle redox imbalance elicited by acute ethylmalonic acid administration. *PLoS ONE* **10**, e0126606 (2015).
41. Bordone, M. P. et al. The energetic brain—a review from students to students. *J. Neurochem.* **151**, 139–165 (2019).
42. Fagundes, A. O. et al. Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **25**, 47–51 (2007).
43. Traina, G. The neurobiology of acetyl-L-carnitine. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **21**, 1314–1329 (2016).
44. Nehlig, A. Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 265–275 (2004).
45. Pierre, K. & Pellerin, L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* **94**, 1–14 (2005).
46. Hertz, L. & Kala, G. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab. Brain Dis.* **22**, 199–218 (2007).
47. Joseph, N. et al. Oxidative stress and ADHD: a meta-analysis. *J. Atten. Disord.* **19**, 915–924 (2015).
48. Guzman, M. & Blazquez, C. Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 287–292 (2004).
49. Harris, C. & Hansen, J. M. Oxidative stress, thiols, and redox profiles. *Methods Mol. Biol.* **889**, 325–346 (2012).
50. Popa-Wagner, A. et al. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, 963520 (2013).
51. Moy, L. Y., Wang, S. P. & Sonsalla, P. K. Mitochondrial stress-induced dopamine efflux and neuronal damage by malonate involves the dopamine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 747–756 (2007).
52. Russell, V. A. et al. Response variability in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a neuronal and glial energetics hypothesis. *Behav. Brain Funct.* **2**, 30 (2006).
53. Killeen, P. R., Russell, V. A. & Sergeant, J. A. A behavioral neuroenergetics theory of ADHD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **37**, 625–657 (2013).
54. Killeen, P. R. Models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav. Process.* **162**, 205–214 (2019).
55. Purper-Ouakil, D. et al. Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr. Res* **69**, 69R–76R (2011).
56. Cortese, S. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **16**, 422–433 (2012).
57. Faraone, S. V. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15020 (2015).
58. Dolina, S. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) as a pyridoxine-dependent condition: urinary diagnostic biomarkers. *Med. Hypotheses* **82**, 111–116 (2014).
59. Landaas, E. T. et al. Vitamin levels in adults with ADHD. *BJPsych Open* **2**, 377–384 (2016).
60. Altun, H. et al. Homocysteine, pyridoxine, folate and vitamin B12 levels in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr. Danub* **30**, 310–316 (2018).
61. Kennedy, D. O. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients* **8**, 68 (2016).
62. Grobecker, H. et al. Peripheral and central catecholaminergic neurons in genetic and experimental hypertension in rats. *Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.* **3**, 377s–380s (1976).
63. Wocial, B. et al. Tissue catecholamine concentrations in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Pol.* **28**, 303–312 (1977).
64. Saavedra, J. M. Adrenaline levels in brain stem nuclei and effects of a PNMT inhibitor on spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* **166**, 283–292 (1979).
65. Chalmers, J. P. et al. Brainstem PNMT neurons and experimental hypertension in the rat. *Clin. Exp. Hypertens. A* **6**, 243–258 (1984).
66. Louis, W. J. et al. Neurotransmitters and neuropeptides in blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 1633–1637 (1987).
67. Grandbois, J. et al. Phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in adrenergic neurons of spontaneously hypertensive rats. *Neurosci. Lett.* **635**, 103–110 (2016).
68. Sevigny C. P. et al. in *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*, (ed. G. Fink), Academic Press, Chapter 3, 29–37 (2017).
69. An, M. & Gao, Y. Urinary biomarkers of brain diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13**, 345–354 (2015).
70. Scassellati, C. et al. Biomarkers and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analyses. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **51**, 1003–1019.e20 (2012).
71. Bonvicini, C., Faraone, S. V. & Scassellati, C. Common and specific genes and peripheral biomarkers in children and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *World J. Biol. Psychiatry* **19**, 80–100 (2018).
72. Ozcan, O. et al. Plasma leptin, adiponectin, neuropeptide Y levels in drug naive children with ADHD. *J. Atten. Disord.* **22**, 896–900 (2018).
73. Aarsland, T. I. et al. Serum concentrations of kynurenines in adult patients with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): a case-control study. *Behav. Brain Funct.* **11**, 36 (2015).

Legends for Supplementary Tables

Table S1 List of the discriminant metabolites involved in the PLS-DA model built from brain samples. The variable importance in projection score, p-value corrected for false discovery rate (FDR), and fold change (FC) is noted for each metabolite.

Table S2 List of the discriminant metabolites involved in the PLS-DA model built from blood samples. The variable importance in projection score, p-value corrected for FDR, and FC is noted for each metabolite.

Table S3 List of the discriminant metabolites involved in the PLS-DA model built from urine samples. The variable importance in projection score, p-value corrected for FDR, and FC is noted for each metabolite.

Table S1

Brain VIPs	VIP Score	FDR	FC
2-Deoxygalactopyranose	1.183	-	0.92
2-Ethylmalonate	1.848	<0.0001	5.68
3-Hydroxybutyrate	1.822	<0.0001	4.24
3-Methylhistidine	1.265	0.0496	0.84
4-Guanidinobutanoate	1.427	0.0172	0.83
4-Hydroxy-proline	1.231	-	0.76
4-Trimethylammoniobutanoate	1.579	0.0046	1.39
5-Aminolevulinate	1.231	-	0.76
Adenine	1.262	0.0496	0.85
ADP-glucose	1.313	0.0383	1.15
Anserine	1.146	-	0.89
Glucose	1.169	-	0.90
Glucuronate	1.464	0.0134	1.50
Diaminopimelate	1.330	0.0343	0.86
Epinephrine	1.380	0.0252	1.35
GABA	1.582	0.0046	0.85
Glyceraldehyde-3-Phosphate	1.476	0.0125	0.85
Glyceryl monoacetate	1.431	0.0172	0.66
Glycine	1.118	-	0.86
Guanidoacetate	1.145	-	0.86
Guanosine monophosphate	1.117	-	0.80
Histamine	1.044	-	0.84
Inosinate	1.671	0.0018	0.72
Arginine	1.067	-	0.90
Asparagine	1.789	0.0001	1.11
Aspartate	1.266	0.0496	0.90
Carnitine	1.557	0.0058	1.34
Glutamate	1.193	-	1.08
Lysine	1.603	0.0041	0.67
Phenylalanine	1.154	-	0.93
Proline	1.044	-	1.06
Serine	1.214	-	1.06
Lumichrome	1.270	0.0496	0.87
Maleimide	1.368	0.0256	0.93
Malonate	1.580	0.0046	4.84
Myo-Inositol	1.047	-	0.82
Myristate	1.174	-	0.89
N-Acetyl-acetylneuraminate	1.024	-	0.95
N-Acetyl-L-aspartate	1.616	0.0038	0.95
N-Acetylglutamate	1.073	-	0.95
N-Acetylserine	1.193	-	1.08
N6-Δ2-Isopentenyl-adenine	1.086	-	1.21
Niacinamide	1.538	0.0070	0.94
Nicotinate	1.368	0.0256	0.91
NNN-Trimethyl-lysine	1.637	0.0030	0.72
Pyridoxal-5-phosphate	1.702	0.0011	0.75
Pyridoxamine	1.439	0.0167	0.72

Spermine	1.132	-	0.94
Succinate	1.517	0.0086	1.48
Thiamine monophosphate	1.484	0.0121	0.77
Trans-Aconitate	1.067	-	0.90
Trigonelline	1.379	0.0252	0.83
Ureidopropionate	1.788	0.0001	1.11

Table S2

Blood VIPs	VIP score	FDR	FC
1-Aminocyclopropanecarboxylate	1.003	-	0.88
3-Dehydroshikimate	1.263	-	1.45
3-Hydroxybutyrate	1.189	-	1.68
3-methyl-2-oxindole	1.843	<0.0001	0.29
3-Methylhistidine	1.887	<0.0001	1.78
4-Hydroxyproline	1.029	-	1.09
5-Aminolevulinate	1.029	0.0302	1.09
5-Aminopentanoate	1.112	0.0094	1.10
Adipate	1.297	0.0003	0.81
Anserine	1.471	0.0414	0.60
Azelate	1.476	-	1.50
Benzyl alcohol	1.724	-	0.18
Beta-Alanine	1.245	0.0178	1.16
Betaine	1.112	<0.0001	1.10
Citrulline	1.064	-	1.20
Creatine	1.377	-	1.26
Creatinine	1.846	0.0321	0.71
Cytosine	1.008	0.0092	0.90
Deoxyuridine	1.013	0.0219	0.65
Diaminopimelate	1.286	-	0.72
Dihydrouracil	1.481	<0.0001	0.56
Formyl-L-Methionyl	1.341	-	1.34
Galactarate	1.141	-	1.55
GABA	1.895	-	0.55
Glucarate	1.141	-	1.55
Gluconate	1.157	0.0185	1.24
Glycine	1.035	-	1.14
Hippurate	1.162	-	1.35
Hydroxyphenyllactate	1.368	0.0185	1.46
Indoleacetaldehyde	1.565	0.0034	1.56
Indoleacetate	1.502	0.0076	2.14
Inosine	1.203	-	1.95
Alanine	1.245	0.0414	1.16
Asparagine	1.352	0.0209	0.79
Glutamine	1.347	0.0214	0.89
Kynurenine	1.876	<0.0001	0.34
Lactate	1.117	-	0.83
Lysine	1.675	0.0006	0.71
Phenylalanine	1.637	0.0012	0.75
Pipecolate	1.725	0.0003	0.61
Threonine	1.463	0.0097	0.88
Tryptophan	1.415	0.0139	0.78
Valine	1.112	-	1.10
Malonate	1.709	0.0004	0.47
Methyl indole-3-acetate	1.376	0.0178	0.72
N-Acetylneuraminate	1.447	0.0112	1.48
N-Acetylserotonin	1.924	<0.0001	0.18

N-Methyltryptamine	1.814	<0.0001	0.22
N6-Δ2-Isopentenyl-adenine	1.418	0.0139	1.52
Nicotinate	1.068	-	1.26
NNN-Trimethyl-lysine	1.877	<0.0001	0.64
Norvaline	1.112	-	1.10
Pantothenate	1.404	0.0151	0.79
Paraxanthine	1.218	0.0483	1.38
Phosphorylcholine	1.298	0.0302	0.60
Pyridoxamine	1.678	0.0006	0.70
Serotonin	1.127	-	1.30
Spermidine	1.437	0.0120	0.68
Sphinganine	1.053	-	2.27
Succinate	1.213	0.0487	0.82
Theobromine	1.182	-	1.37
Theophylline	1.218	0.0483	1.38
Thymine	1.386	0.0174	0.82
Trans-Ferullate	1.025	-	1.36
Trigonelline	1.596	0.0023	0.66
Uracil	1.150	-	0.67
Xanthine	1.197	-	2.10

Table S3

Urine VIPs	VIP score	FDR	FC
Aminocyclopropanecarboxylate	1.497	<0.0001	0.28
1H-Indole-3-acetamide	1.428	<0.0001	0.22
2-Amino-2-deoxy-gluconate	1.107	0.0033	2.87
2-Aminophenol	1.431	<0.0001	0.24
2-Deoxygalactopyranose	1.124	0.0027	6.95
2-Ethylmalonate	1.127	0.0027	0.50
2.3-Dihydroxybutanedioate	1.215	0.0007	0.41
3-Hydroxybutyrate	1.233	0.0005	0.35
3-Hydroxymethylglutarate	1.337	0.0001	0.41
3-Methyl-2-Oxindole	1.382	<0.0001	0.18
3-Methylhistidine	1.349	<0.0001	2.32
4-Guanidinobutanoate	1.086	0.0043	1.44
4-Hydroxycinnamate	1.274	0.0002	0.32
4-Hydroxyproline	1.041	0.0072	0.52
5-Aminolevulinate	1.295	0.0001	3.75
5-Hydroxy-tryptophan	1.476	<0.0001	22.28
5-Hydroxyindoleacetate	1.367	<0.0001	0.19
5-Hydroxymethyluracil	1.171	0.0015	1.46
5-Methylcytosine	1.051	0.0064	1.62
5-Thymidylate	1.245	0.0004	0.27
5'-Methylthioadenosine	1.029	0.0080	0.57
Acetylcysteine	1.430	<0.0001	0.44
Adipate	1.406	<0.0001	0.32
Aminoadipate	1.165	0.0016	0.74
Benzyl alcohol	1.393	<0.0001	0.15
Beta-Alanine	1.360	<0.0001	0.61
Cadaverine	1.342	<0.0001	0.48
Catechol	1.201	0.0009	0.42
Citramalate	1.185	0.0012	0.55
Creatine	1.324	0.0001	2.91
Creatinine	1.106	0.0033	1.64
Cytidine	1.088	0.0043	3.14
Cytosine	1.324	0.0001	2.32
Glucose	1.265	0.0003	0.22
Glucuronated	1.127	0.0027	2.48
Deoxycytidine	1.134	0.0025	2.22
Deoxyguanosine	1.219	0.0007	0.36
Diethanolamine	1.300	0.0001	2.27
Dihydrouracil	1.368	<0.0001	0.63
Dimethylbenzimidazole	1.134	0.0025	1.54
Divalonate	1.066	0.0054	0.69
DL-O-Phosphoserine	1.190	0.0011	3.94
dUMP	1.117	0.0030	0.35
Gluconate	1.140	0.0023	2.46
Glyceraldehyde-3-Phosphate	1.110	0.0032	1.71
Guanidinosuccinate	1.255	0.0003	4.00
Guanidoacetate	1.487	<0.0001	7.19

Histamine	1.124	0.0027	0.29
Imidazoleacetate	1.303	0.0001	0.61
Indoleacetate	1.204	0.0009	2.48
Kynurenate	1.368	<0.0001	0.44
Asparagine	1.340	<0.0001	0.64
Carnitine	1.296	0.0001	3.12
Cystine	1.358	<0.0001	6.70
Dihydroorotate	1.423	<0.0001	3.83
Glutamate	1.200	0.0010	2.96
Histidine	1.048	0.0066	2.18
Histidinol	1.405	<0.0001	2.77
Lysine	1.307	0.0001	2.07
Malate	1.328	0.0001	0.24
Pipecolate	1.290	0.0002	0.61
Proline	1.193	0.0011	1.80
Serine	1.229	0.0006	0.57
Threonine	1.228	0.0006	2.86
Tyrosine	1.150	0.0020	1.53
Malonate	1.160	0.0018	1.98
Methylglutarate	1.406	<0.0001	0.32
N-Acetyl-acetylneuraminate	1.117	0.0030	1.44
N-Acetyl-glucosamine	1.054	0.0063	0.53
N-Acetyl-methionine	1.010	0.0100	0.65
N-Acetyl-phenylalanine	1.372	<0.0001	0.15
N-Acetylglutamate	1.080	0.0046	0.59
N-Acetylleucine	1.348	<0.0001	0.34
N-Acetylserine	1.157	0.0018	0.65
N-Acetylserotonin	1.423	<0.0001	0.28
N-acetyltryptophan	1.032	0.0078	0.61
N-Formyl-methionine	1.334	0.0001	0.32
N6-Δ2-Isopentenyl-adenine	1.263	0.0003	0.29
Nicotinate	1.302	0.0001	0.31
Phenylacetate	1.194	0.0010	0.55
Pterin	1.380	<0.0001	2.52
Quinate	1.286	0.0002	0.40
Taurine	1.124	0.0027	6.95
Trans-Cyclohexane-diol	1.366	<0.0001	0.23
Trigonelline	1.328	0.0001	0.70
Tryptophanol	1.456	<0.0001	0.16
Uracil	1.080	0.0046	0.75
Ureidopropionate	1.340	<0.0001	0.64
Urocanate	1.039	0.0073	1.55
Xanthurenate	1.464	<0.0001	0.23

IV.A.2 - Résumé des principaux résultats

Cette première étude préclinique montre qu'il est possible de discriminer les rats SHR/NCrl des rats témoins sur la base du métabolome cérébral ainsi que sur la base de leur métabolome sanguin et urinaire (Annexes 5 à 8). Le métabolome cérébral des rats SHR/NCrl montre des modifications principalement dans le métabolisme énergétique et du stress oxydant. Des différences communes sont observées entre le cerveau et la périphérie des rats SHR/NCrl. En effet, 60% des métabolites discriminants dans le cerveau le sont aussi dans les compartiments périphériques. Le métabolisme énergétique et celui du stress oxydant sont également retrouvés modifiés dans le sang et les urines des rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins. De plus, une corrélation positive est retrouvée entre le malonate cérébral et urinaire et une corrélation négative est retrouvée entre le glucuronate cérébral et urinaire. Ce résultat suggère un possible reflet des modifications cérébrales observées dans les compartiments périphériques. Cette observation est intéressante pour l'étude clinique des pathologies neurodéveloppementales à l'aide d'échantillons sanguins et urinaires.
Cette première étude donne de nouvelles pistes à étudier concernant la physiopathologie du TDAH et les possibles modifications du métabolisme énergétique et du stress oxydant observées dans le modèle. Pour mieux comprendre la physiopathologie, l'étude suivante analyse le métabolome cérébral de 10 régions cérébrales spécifiquement impliquées dans le TDAH.

IV.B - Etude 2 - Etude du métabolome de régions cérébrales impliquées dans le TDAH

Suite à l'étude du métabolome cérébral dans sa globalité, nous allons maintenant nous intéresser à l'étude du métabolome de régions spécifiquement impliquées dans le TDAH dans le but de mieux comprendre la physiopathologie. En effet, des études d'imagerie ont montré des modifications des réseaux fronto-striataux, fronto-pariétaux, fronto-cérébelleux et du DMN. Une étude d'imagerie TEP précédemment réalisée au laboratoire montre des différences d'activité de 10 régions cérébrales appartenant à ces réseaux : le cortex orbito-frontal, le cortex pré-limbique, le cortex moteur 2, le cortex pariétal, le striatum dorsal, le striatum ventral, l'amygdale, l'hippocampe, le cervelet limbique et le cervelet cognitif. Ces 10 régions cérébrales ont été utilisées dans une étude métabolomique afin de caractériser les différences métaboliques dans ces régions entre les deux souches de rats. Ces régions ont été sélectionnées pour l'analyse métabolomique suivante.

Compte tenu des résultats du métabolome des cerveaux entiers, nous faisons l'hypothèse de retrouver des altérations métaboliques au niveau du métabolisme énergétique et du stress oxydant.

IV.B.1 - Méthodologie

La méthodologie sera développée dans les parties suivantes et est résumée par ce schéma (Figure 21).

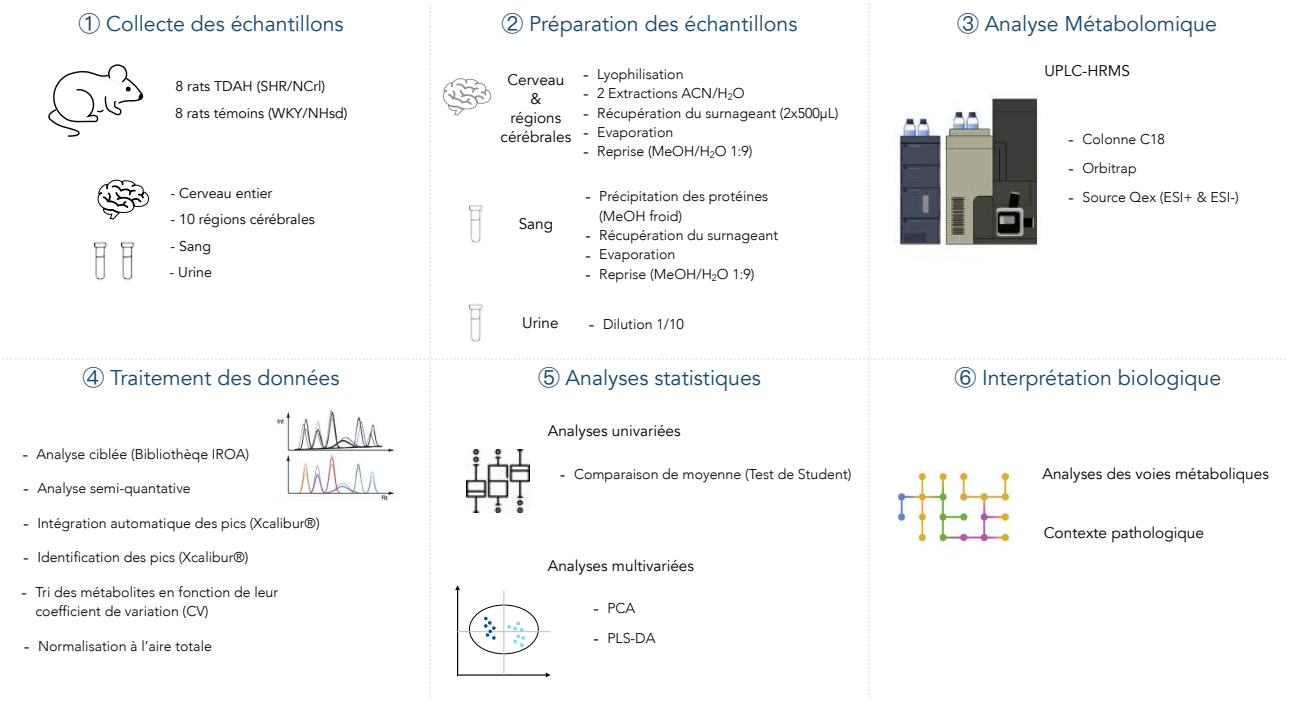


Figure 21 : Schéma représentant le workflow de l'étude.

IV.B.1.a - Collecte des échantillons

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats (Rattus novergicus) mâles. Au total 16 rats ont été utilisés, 8 rats TDAH de souche SHR/NCrl (Charles River, Allemagne) comparés aux 8 rats témoins de souche WKY/NHsd (Envigo, Royaume-Uni) ont été utilisés pour prélever 10 régions cérébrales.

Tous les rats sont reçus à 7 semaines, une semaine avant le début des expériences afin de leur laisser le temps de s'acclimater à l'environnement et pour diminuer le stress. Les rats sont donc âgés de 8 semaines pour les expériences, correspondant à l'âge où les rats SHR/NCrl présentent les symptômes de TDAH et avant le développement de l'hypertension artérielle (Sagvolden et al., 2009). Les rats sont hébergés par deux en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique où une maison en carton et une feuille de sopalin, avec l'eau et la nourriture disponible à volonté. La température de la salle est maintenue autour de 21°C, l'humidité est contrôlée et le cycle de lumière est conservée (obscurité 19h-7h, lumière 7h-19h).

Les rats sont mis à mort par décapitation, les cerveaux sont immédiatement disséqués en 10 régions cérébrales puis stockés à -80°C. Les dix régions cérébrales disséquées sont le cortex orbito-frontal (OF), le cortex pré-limbique (PrL), le cortex pariétal (Par), le cortex moteur 2 (M2), le striatum ventral (vStr), le striatum dorsal (dStr), l'hippocampe (Hip), l'amygdale (AMG), le cervelet cognitif (CCer) et le cervelet limbique (LCer) (Figure 22).

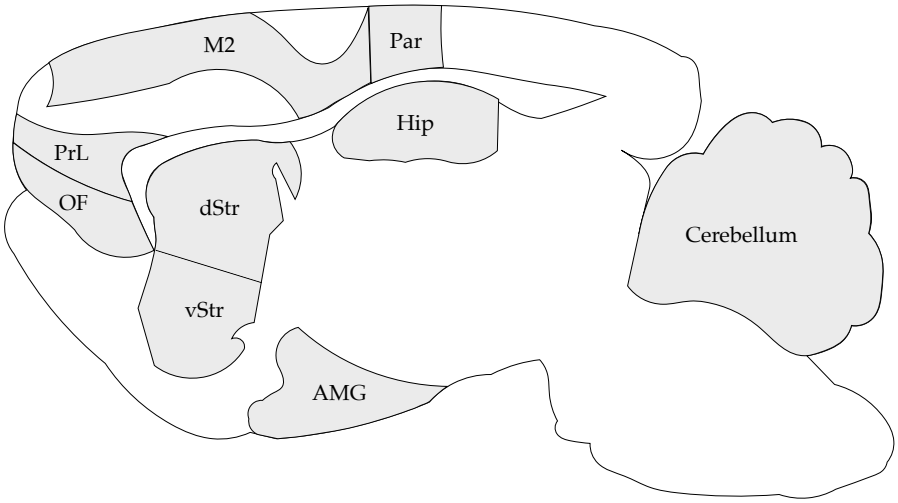


Figure 22 : Coupe sagittale de cerveau de rat représentant les différentes régions cérébrales disséquées pour l'analyse métabolomique LC-MS.
Abréviations : AMG : Amygdale, Cerebellum : Cervelet (CCer : Cervelet cognitif ; LCer : Cervelet limbique), dStr : Striatum dorsal, Hip : Hippocampe, M2 : Cortex moteur 2, OF : Cortex orbito-frontal, Par : Cortex pariétal, PrL : Cortex pré-limbique, vStr : Striatum ventral.

IV.B.1.b - Préparation des échantillons

Tous les échantillons cérébraux sont lyophilisés (FreeZone® 4,5L, Labconco, Etats-Unis) à -107°C, 0,2mbar pendant 12 heures. Une fois lyophilisés, 3mg de matière sèche sont pesées auxquelles sont ajoutées 750µL d'un mélange Acétonitrile (ACN) et eau (1:1), vorterxés pendant 15 secondes, homogénéisés à l'aide d'un agitateur plantaire à 4°C pendant 30 minutes et enfin centrifugés à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C (Thermo multitude X1R, Thermofischer, Etats-Unis). Le surnageant (500µL) est ensuite récolté et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Savant SPD 111v SpeedVac, ThermoScientifique, Etats-Unis) à 45°C pendant 4 heures. Les résidus secs sont ensuite solubilisés avec 100µL d'un mélange méthanol/eau (1:9) et transférés sur une plaque 96 puits pour l'analyse LC-HRMS.

IV.B.1.c - Analyse Métabolomique

L'analyse métabolomique couple la chromatographie liquide à haute résolution avec le système UPLC Ultimate 3000 (Dionex, Allemagne) et la spectrométrie de masse Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Allemagne) avec une ionisation Electro spray en mode positif et négatif (ESI+ & ESI-, une séquence d'analyse pour chaque mode). Le système est contrôlé par Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). La chromatographie utilise une colonne de type C18 (Phenomenex Kinetex 1,7µm XB - C18) maintenue à 55°C. Un gradient multi-étapes est réalisé à l'aide d'une phase mobile A constituée d'acide formique 0,1% dans de l'eau et une phase mobile B constituée de méthanol acidifié avec 0,1% d'acide formique.

Le gradient est réglé pour un débit de 0,4mL/min sur une durée de 30 minutes pour les modes négatif et positif. Le gradient multi-étapes a été programmée comme suit :

- 0-3 min : 0% B
- 3-8 min : 0 à 15% B
- 8-15 min : 15 à 50% B
- 15-20 min : 50 à 100%
- 20-25 min : 100% B
- 25-28 min : 100 à 0% B

IV.B.1.d - Traitement des données

Le traitement des données se fait à partir d'une bibliothèque composée de 495 standards (Mass Spectrometry Metabolite Library of standards MSML®, IROA technologies). Ces standards ont été analysés en HPLC-HRMS, dans les mêmes conditions d'analyse décris précédemment, afin de constituer une base de données comprenant le temps de rétention, le rapport masse sur charge pour chaque composé. Lors de nos analyses, l'intégration et l'annotation se font à l'aide du logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientifique, CA) et de notre base de données. Les métabolites d'intérêts sont ensuite sélectionnés en fonction de leur coefficient de variation dans les échantillons de contrôle qualité. Ensuite, chaque métabolite est normalisé à l'aire totale des métabolites d'intérêts.

Le coefficient de variation (CV) est calculé CV% = (écart-type / moyenne) x100 pour les métabolites. Les métabolites ayant un CV supérieur à 30% dans les CQs ne sont pas retenus pour les analyses statistiques suivantes. Les métabolites ont été normalisés à l'aire totale (Ejigu et al., 2013). L'objectif de la normalisation des données est de réduire les biais pour améliorer la cohérence globale des données afin que des comparaisons biologiques puissent être réalisées. De plus, les données ont subi une transformation linéaire de type « UV (Unit Variance) scaling » par centrage et réduction des données à la variance unitaire, afin que tous les métabolites présentent la même importance, pour éviter qu'un métabolite ayant une plus forte intensité prenne le dessus sur les métabolites ayant une plus faible intensité. Après ces étapes les analyses statistiques entre le groupe de rats SHR/NCrl et le groupe de rats témoins sont réalisées pour chaque matrice.

IV.B.1.e - Analyses Statistiques

Dans le but de déterminer les métabolites discriminants, deux approches statistiques, univariée et multivariée, sont utilisées.

IV.B.1.e1 - Analyses statistiques univariées

Les analyses statistiques univariées ont été réalisées à l'aide de Metaboanalyst 5.0 en utilisant un test de comparaison de moyenne (t-test) pour sélectionner les métabolites significativement différents entre les groupes (p.value < 0,05). De plus, le sens de variation de chaque métabolite est déterminé.

IV.B.1.e2 - Analyses statistiques multivariées

Les études multivariées ont été réalisées pour déterminer les métabolites biomarqueurs participant à la discrimination des deux souches. Les études multivariées ont été réalisées à l'aide du site Metaboanalyst (metaboanalyst.ca). Premièrement des analyses en composantes principales ont été réalisées afin de mettre en évidence les potentiels rats outliers ainsi que de potentielles séparations des groupes sans a priori pour chaque matrice. Ensuite des modèles PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) ont été réalisés pour chaque matrice, ces modèles ont pour but d'identifier les variables qui permettent la meilleure discrimination possible entre les groupes. Chaque modèle est caractérisé par une valeur d'exactitude (précision), une valeur cumulée de la variation R2 ainsi qu'une valeur de validation croisée (Q2) permettant de déterminer les variables importantes de la projection (VIP).
Les métabolites significativement différents entre les deux groupes et/ou VIP sont sélectionnés pour l'interprétation biologique.

IV.B.1.f - Interprétation biologique

L'interprétation biologique permet de donner un sens physiopathologique aux différences observées entre les deux groupes. Les métabolites sélectionnés à l'aide des modèles PLS-DA et des tests de comparaison de moyenne sont replacés dans les voies métaboliques grâce à metaboanalyst.ca. Les voies métaboliques sont sélectionnées si leur p.value corrigée par FDR est significative (p.value < 0,05), si l'impact de la voie est non nul et si au moins deux métabolites appartiennent à la voie métabolique.

IV.B.2 - Résultats

IV.B.2.a - Métabolites détectés

A partir des 495 métabolites de la bibliothèque, l'analyse métabolomique des 10 régions cérébrales a permis de détecter entre 120 et 162 métabolites formellement identifiés (Figure 23; Annexes 9 à 19). En moyenne 142 métabolites ont été détectés dans les 10 régions cérébrales ce qui représente 29% de la bibliothèque. Dans le cerveau entier, 125 métabolites ont été détectés, ce qui est un peu moins que dans les régions cérébrales. Le fait d'avoir des échantillons plus spécifiques a sûrement permis de diminuer le bruit de fond de l'analyse et donc de préciser le nombre de métabolites détectés dans les régions cérébrales.

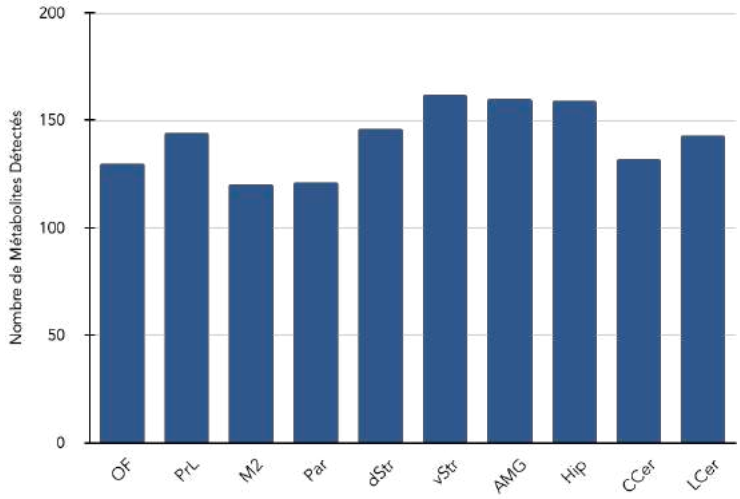


Figure 23 : Nombre de métabolites détectés dans les 10 régions cérébrales.

IV.B.2.b - Modèles discriminants les rats SHR/NCrl des rats WKY/NHsd

Les modèles PLS-DA ont permis de discriminer les rats SHR/NCrl des rats WKY/NHsd dans les 10 régions cérébrales étudiées. Les paramètres de validation des différents modèles sont présentés dans le tableau ci-après (Tableau 5).

Tableau 5 : Paramètres des modèles PLS-DA pour les 10 régions cérébrales

	Précision	**R^2**	**Q^2**	**Nombre de VIP**
AMG	0,87	0,99	0,67	67
vStr	1,0	0,99	0,87	59
PrL	0,87	0,81	0,5	55
LCer	1,0	0,99	0,96	50
Hip	1,0	0,99	0,87	49
dStr	1,0	0,99	0,97	47
CCer	1,0	0,99	0,94	44
Par	1,0	0,99	0,97	40
OF	1,0	0,99	0,95	36
M2	1,0	0,98	0,93	32

Plus précisément, 67 métabolites sont discriminants entre les rats SHR/NCrl et les rats témoins dans l'amygdale, 59 dans le striatum ventral, 55 dans le cortex pré-limbique, 50 dans le cervelet limbique, 49 dans l'hippocampe, 47 dans le striatum dorsal, 44 dans le cervelet cognitif, 40 dans le cortex pariétal, 36 dans le cortex orbito-frontal et 32 dans le cortex moteur 2.

IV.B.2.c - Voies métaboliques

Les voies métaboliques sont calculées à partir des métabolites VIP, pour chaque région cérébrale, à l'aide de metaboanalyst.ca et sont présentées dans les tableaux ci-après (Tableau 6 & 7).

Au total, 26 voies métabolites sont significativement différentes entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/Nhsd. Il est possible de classer ces 26 voies métaboliques en cinq groupes : le métabolisme des acides aminés (13 voies métaboliques), le métabolisme anti-oxydant (1 voie métabolique), le métabolisme énergétique (8 voies métaboliques), le métabolisme des nucléotides (3 voies métaboliques) et le métabolisme des vitamines (1 voie métabolique).

IV.B.2.d - Métabolites d'intérêts

Les métabolites d'intérêt ont été sélectionnés à partir de différents critères :

- Appartenir à au moins une voie métabolique significativement altérée ;
- Être significativement différents entre les deux souches de rats dans au moins 3 régions cérébrales.

Les métabolites d'intérêt sont listés dans le tableau 8.

L'aminoadipate présente un niveau significativement augmenté dans 5 régions cérébrales (M2, Par, dStr, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la dégradation de la lysine.

La carnitine présente un niveau significativement augmenté dans 8 régions cérébrales (OF, PrL, M2, Par, dStr, Hip, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la lysine.

La carnosine présente un niveau significativement diminué dans 3 régions cérébrales (Par, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de l'histidine.

La cystathionine présente un niveau significativement augmenté dans 3 régions cérébrales (M2, Par, AMG) et significativement diminué dans le CCer chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la méthionine.

La déoxycarnitine présente un niveau significativement augmenté dans 8 régions cérébrales (OF, PrL, M2, Par, dStr, Hip, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la dégradation de la lysine.

Le guanidinoacétate présente un niveau augmenté dans 4 régions cérébrales (M2, Par, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la glycine.

La guanidinobutanoate présente un niveau significativement diminué dans 6 régions cérébrales (OF, Par, dStr, AMG, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de l'arginine.

L'hippurate présente un niveau significativement augmenté dans 4 régions cérébrales (M2, Par, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la phénylalanine.

L'histamine présente un niveau significativement diminué dans 3 régions cérébrales (OF, PrL & dStr) et un niveau significativement augmenté dans 2 régions cérébrales (CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de l'histidine.

L'indole acétate présente un niveau significativement augmenté dans 3 régions cérébrales (OF, vStr, AMG) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique du tryptophane.

La lysine présente un niveau significativement diminué dans 5 régions cérébrales (M2, Par, vStr, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la dégradation de la lysine.

Le pipecolate présente un niveau significativement diminué dans 6 régions cérébrales (OF, M2, Par, dStr, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la dégradation de la lysine.

La triméthyllysine présente un niveau significativement diminué dans 8 régions cérébrales (OF, PrL, M2, Par, dStr, Hip, CCer & LCer) chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins et appartient à la voie métabolique de la dégradation de la lysine.

Tableau 6 : Liste des voies métaboliques significativement altérées dans les 4 régions corticales, avec leur probabilité p et les métabolites associés

Voies métaboliques		OF		PrL		M2		Par	
		p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites
Métabolisme des acides aminés	Dégradation de la lysine	3,18E-05	déoxycarnitine, triméthyllysine, pipecolate	2,88E-02	déoxycarnitine, trimethyllysine	7,46E-08	lysine, déoxycarnitine, trimethyllysine, aminoadipate, pipecolate	5,83E-10	lysine, déoxycarnitine, triméthyllysine, aminoadipate, pipecolate
	Métabolisme de l'histidine	2,56E-03	histamine, méthylhistidine aspartate					8,77E-05	carnosine, aspartate
	Métabolisme de l'arginine et de la proline					1,72E-02	arginine, guanidinoacétate, spermine, proline	7,54E-05	guanidinoacetate, aminobutanoate, phosphocréatine, guanidinobutanoate
	Métabolisme de la cystéine et de la méthionine					8,02E-04	sérine - cystathionine	1,06E-02	sérine, cystathionine
	Métabolisme de la glycine, sérine et de la thréonine					2,59E-04	sérine, guanidinoacetate, cystathionine	1,74E-05	sérine, choline guanidinoacétate, cystathionine - glycérate
	Métabolisme du tryptophane	1,54E-02	5-HIAA, indole-3-acétate						
	Métabolisme de la tyrosine								
	Métabolisme de l'alanine							7,54E-05	acétyl-aspartate, aspartate, aminobutanoate, glucosamine-6-phosphate
	Métabolisme de la synthèse de l'arminien	2,51E-02	citrulline - aspartate			3,79E-02	arginine, citrulline	3,62E-05	citrulline, aspartate
	Métabolisme de la ß-alanine							8,77E-05	aspartate, carnosine
	Métabolisme de la phénylalanine								
	Métabolisme de la taurine								
	Métabolisme de la valine, de la leucine et de l'isoleucine								
Métabolisme anti-oxydant	Métabolisme du glutathion								
Métabolisme énergétique	Métabolisme du butanoate							1,89E-03	3-OH-butyrate, aminobutanoate
	Métabolisme du pyruvate								
	Métabolisme du cycle de Krebs								
	Métabolisme de la glycolyse								
	Métabolisme du glycoxylaye							2,81E-02	sérine, glycérate
	Métabolisme du pantothénate et du CoA							5,03E-05	pantothénate, aspartate
	Métabolisme des pentoses phosphate							3,55E-02	ribose-5-phosphate, glycerate
	Métabolisme des glycérolipides								
Métabolisme des nucléotides	Métabolisme des purines							7,03E-04	xanthine, ribose-5-phosphate, guanosine, adénine
	Métabolisme des pyrimidines								
	Métabolisme du nicotinate								
Métabolisme des vitamines	Métabolisme de la vitamine B6								

Tableau 7 : Liste des voies métaboliques significativement altérées dans les 6 régions sous-corticales, avec leur probabilité p et les métabolites associés

Voies métaboliques		dStr		vStr		AMG		Hip		LCer		CCer	
		p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites	p.value *(FDR correction)*	Métabolites
Métabolisme des acides aminés	Dégradation de la lysine	2,02E-06	lysine, déoxycarnitine, trimethyllysine, aminoadipate, pipecolate					1,53E-03	déoxycarnitine,trimethylline, pipecolate	2,21E-07	déoxycarnitine, trimethylline, aminoadipate, pipecolate	3,65E-08	Lysine, déoxycarnitine,aminoadipate, pipecolate
	Métabolisme de l'histidine	3,37E-02	carnosine, histamine, aspartate			4,60E-02	méthyl-histidine, méthyl-histamine			1,65E-04	urocanate, carnosine, histamine, méthyl-histidine, méthyl-histamine	2,31E-04	carnosine, histamine, méthyl-histidine
	Métabolisme de l'arginine et de la proline					4,60E-02	arginine, créatine, aminobutanoate, putrescine, adénosyl méthionine, proline, guanidinobutanoate			9,81E-05	guanidinoacétate, créatine, proline, guanidinobutanoate	3,65E-05	guanidinoacétate, spermine, phosphocréatine, guanidinobutanoate
	Métabolisme de la cystéine et de la méthionine			4,11E-03	cystathionine, cystéate, sulfino-alanine	4,60E-02	méthylthioadénosine, adénosyl méthionine, cystathionine			9,08E-03	méthionine, phosphosérine,ophthalmate		
	Métabolisme de la glycine, sérine et de la thréonine					4,60E-02	choline, cystathionine, glycérate, créatine			9,83E-04	guanidinoacétate, phosphosérine, glycérate, créatine	1,78E-04	guanidinoacétate, cystathionine, thréonine
	Métabolisme du tryptophane	3,06E-02	5-HIAA, kynurénine	4,18E-03	acetyl-sérotonine, sérotonine, indole-acétate	1,86E-02	acétylsérotonine, kynurénine, indole acétate						
	Métabolisme de la tyrosine			4,11E-03	tyrosine, homogentisate,fumarate	1,80E-02	tyrosine, homogentisate,homovanillate			4,36E-04	adrénaline, tyrosine	6,32E-04	adrénaline, Fumarate
	Métabolisme de l'alanine			4,18E-03	acétyl-aspartate, fumarate							1,73E-02	glutamine, fumarate, succinate, glucosamine-6-phosphate
	Métabolisme de la synthèse de l'arminien												
	Métabolisme de la β-alanine									7,28E-03	carnosine, méthyl-histamine, uracil	4,26E-05	carnosine, spermine
	Métabolisme de la phénylalanine											7,25E-05	phénylalanine, hippurate
	Métabolisme de la taurine			4,18E-03	cystéate, sulfino-alanine								
	Métabolisme de la valine, de la leucine et de l'isoleucine									1,65E-04	thiamine diphosphate, leucine		
Métabolisme anti-oxydant	Métabolisme du glutathion			3,91E-02	spermine, oxoproline	4,95E-02	oxoproline, putrescine						
Métabolisme énergétique	Métabolisme du butanoate					4,95E-02	3-OH-butyrate, aminobutanoate						
	Métabolisme du pyruvate			4,18E-03	malate, fumarate							3,06E-03	malate, lactate - fumarate
	Métabolisme du cycle de Krebs			4,18E-03	malate, fumarate							7,82E-03	succinate, isocitrate, malate, fumarate
	Métabolisme de la glycolyse											7,75E-06	lactate, glucose-1-phosphate, glucose
	Métabolisme du glycoxylaye												
	Métabolisme du pantothénate et du CoA												
	Métabolisme des pentoses phosphate												
	Métabolisme des glycérolipides									2,66E-02	glycérol-3-phosphate, glycérate		
Métabolisme des nucléotides	Métabolisme des purines			4,18E-03	AMP, IMP, adénosine, xanthosine, inosine, guanine, déoxyguanosine, guanosine, adénine					1,62E-02	xanthine, xanthosine, inosine, adénine	2,70E-03	glutamine, AMP, GMP, guanine
	Métabolisme des pyrimidines			4,08E-02	cytidinine, thymidine	4,95E-02	uridine, CMP, cytidine, dTMP, thymidine			7,50E-03	uridine, uracil	1,41E-02	glutamine, thymidine
	Métabolisme du nicotinate					4,60E-02	nicotinate - nicotinamide						
Métabolisme des vitamines	Métabolisme de la vitamine B6									1,45E-03	pyridoxal phosphate, pyridoxamine	7,75E-06	pyridoxal phosphate, pyridoxamine

Tableau 8 : Liste des métabolites d'intérêt avec leur score VIP, leur probabilité p et leur sens de variation dans les 10 régions cérébrales

		Aminoadipate	Carnitine	Carnosine	Cystathionine	Déoxycarnitine	Guanidinoacétate	Guanidinobutanoate	Hippurate	Histamine	Indole acétate	Lysine	Pipecolate	Triméthyllysine
OF	p		0.00020221			0.0013253		0.0002739		7.3693e-05	0.00064502		0.0045346	3.786e-06
	p (*FDR correction*)		0.0052574			0.019143		0.0059345		0.002394	0.010482		0.053591	0.00049219
	score VIP		2.2167			2.0241		2.1897		2.297	2.1055		1.8571	2.469
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl		↑			↑		→		→	↑		→	→
PrL	p		0.0016768			0.0008724				0.010392				0.015308
	p (*FDR correction*)		0.060365			0.041875				0.21991				0.24493
	score VIP		2.0765			2.1572				1.7895				1.7135
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl		↑			↑				→				→
M2	p	2.8735e-05	1.3468e-09		3.3508e-05	7.103e-09	0.00052881		5.12e-05			0.025751	0.028081	4.9385e-05
	p (*FDR correction*)	0.00067017	1.6162e-07		0.00067017	4.2618e-07	0.0070509		0.00076801			0.18721	0.18721	0.00076801
	score VIP	2.2486	2.5508		2.2393	2.5261	2.0253		2.2125			1.465	1.4486	2.2149
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl	↑	↑		↑	↑	↑		↑			→	→	→
Par	p	8.6894e-06	3.1143e-08	0.013305	0.027979	6.1265e-11	0.00035126	5.9849e-06	0.0078677			1.6238e-06	0.010302	1.0369e-05
	p (*FDR correction*)	0.0001502	1.2561e-06	0.070465	0.12539	7.413e-09	0.0035419	0.0001207	0.0476			4.9119e-05	0.059361	0.00015682
	score VIP	2.0125	2.1735	1.3867	1.2591	2.2472	1.7952	2.028	1.4652			2.0757	1.426	2.0048
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl	↑	↑	→	↑	↑	↑	→	↑			→	→	→
dStr	p	0.020841	0.00063436			5.2952e-05		0.016994		0.017067		0.00077295	0.00093518	0.00044414
	p (*FDR correction*)	0.23406	0.030872			0.007731		0.20765		0.20765		0.031304	0.034134	0.030872
	score VIP	1.7616	2.3441			2.5812		1.8083		1.8073		2.0352	2.2969	2.3847
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl	↑	↑			↑		→		→		→	→	→
vStr	p										0.0037329			
	p (*FDR correction*)										0.060472			
	score VIP										1.8403			
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl										↑			
AMG	p				0.0055818			0.0076972			0.0083073			
	p (*FDR correction*)													
	score VIP				1.6969			1.6478			1.6356			
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl				↑			→			↑			
Hip	p		0.018417			0.0041268								2.2671e-05
	p (*FDR correction*)													0.0018024
	score VIP		2.0677			2.4044								3.0517
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl		↑			↑								→
CCer	p	0.00089729	4.9066e-11	0.0004281	0.0041072	4.5822e-10	0.0010396	5.7015e-07	0.0020434	0.0075485		3.3864e-06	7.6261e-06	1.1968e-07
	p (*FDR correction*)	0.0084601	6.4767e-09	0.0046474	0.021686	3.0243e-08	0.0091487	1.8815e-05	0.014985	0.031138		6.3858e-05	0.00010066	5.2661e-06
	score VIP	1.6055	2.1055	1.6659	1.4523	2.0881	1.5925	1.9731	1.5281	1.3772		1.9193	1.8894	2.0096
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl	↑	↑	→	→	↑	↑	→	↑	↑		→	→	→
LCer	p	0.0080415	8.4245e-07	0.0071106		6.7474e-07	0.00012607	4.3063e-06	3.4927e-05	0.0001031		1.4041e-07	0.000331	3.6416e-07
	p (*FDR correction*)	0.049997	3.0118e-05	0.04842		3.0118e-05	0.0013868	0.00010263	0.00062431	0.0013868		2.0078e-05	0.0031555	2.6038e-05
	score VIP	1.4134	2.0264	1.4301		2.0327	1.8071	1.973	1.881	1.8197		2.0715	1.74	2.0491
	sens de variation dans le groupe SHR/NCrl	↑	↑	→		↑	↑	→	↑	↑		→	→	→

IV.B.3 - Discussion

Les résultats de cette étude montrent que les rats SHR/NCrl diffèrent des rats WKY/NHsd par leur métabolome pour chaque région cérébrale. L'étude métabolomique sur cerveau global avait mis en évidence chez les rats SHR/NCrl des modifications liées au métabolisme énergétique et au stress oxydant, qui ont été retrouvés dans les régions cérébrales. L'analyse du métabolisme des régions cérébrales permet aussi de mettre en évidence des changements métaboliques qui seraient en lien avec des modifications de différents systèmes de neurotransmission.

IV.B.3.a - Le métabolisme de la dégradation de la lysine

Le métabolisme de la dégradation de la lysine est significativement modifié chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins. Appartenant à cette voie métabolique, 6 métabolites présentent un niveau significativement différents entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dont l'aminoadipate, la carnitine, la déoxycarnitine, la lysine, le pipecolate et la triméthyllysine. Ces 6 métabolites peuvent appartenir à deux sous catégories de voies métaboliques, avec dans un premier temps le catabolisme de la lysine via le pipecolate et la sacchaporine, et dans u n second temp une autre voie métabolique dégradant les résidus protéiques contenant de la lysine afin de synthétiser la carnitine (Figure 24).

IV.B.3.a1 - Le catabolisme de la lysine

La lysine est un acide aminé essentiel (Matthews 2020) qui a la capacité d'induire de fortes réponses inflammatoires et immunitaires (Datta et al., 2001). Le catabolisme de la lysine peut se faire via deux voies métaboliques distinctes : le métabolisme du pipecolate ou de la saccharopine. Ces deux voies convergent vers la synthèse d'aminoadipate (Hallen et al., 2013). Les taux plus faibles de pipecolate et plus élevés d'aminoadipate observés chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats WKY/NHsd suggèrent une activité de dégradation plus forte via le métabolisme de la saccharopine aux dépens du métabolisme du pipecolate.
Le métabolisme de la saccharopine va ensuite aboutir à la production d'aminoadipate, permettant au passage la production de glutamate, pour donner suite de l'acétyl-CoA qui alimentera le cycle de Krebs (Leandro and Houten 2019). Les modifications de métabolisme lié à la lysine pourraient donc être en lien avec le métabolisme énergétique.
En plus de permettre la production de glutamate via sa voie de synthèse, l'aminoadipateprésente des propriétés neuro-excitatrices (Wu et al., 1995) via la réduction

du transport du glutamate de la synapse par les transporteurs astrocytaires entrainant des niveaux plus élevés de glutamate dans la fente synaptique (da Silva et al., 2017). Ces études suggèrent donc aussi un possible effet des taux plus élevés d'aminodiapate chez les rats SHR/NCrl sur la transmission excitatrice. Une autre étude a montré que l'aminoadipate peut également inhiber la production de kynurénine (Wu et al., 1995) dont des taux plus faibles sont significativement retrouvés dans certaines régions de notre étude. Compte tenu du fait que l'acide kynurénique qui est un produit du métabolisme de la kynurénine, est un antagoniste de récepteurs glutamatergiques (Parrott et al., 2016), ces données renforcent la possibilité d'une facilitation de la transmission excitatrice chez les rats SHR/NCrl.
Une autre étude montre que l'aminoadipate favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène, la péroxydation lipidique, l'oxydation des protéines tout en réduisant les taux de glutathion, défense anti-oxydante majeure (da Silva et al., 2017). La baisse des taux d'aminoadipate retrouvée chez les rats SHR/NCrl peut donc aussi être liée à une moindre activité pro-oxydante.

Des études montrent que l'activité des voies de dégradation de la lysine varient en fonction de développement cérébral : la voie métabolique de la saccharopine est dominante par rapport à la voie du pipecolate au cours du stade foetal, puis chez l'adulte, la dégradation de la lysine se ferait majoritairement par la voie du pipecolate (Hallen et al., 2013). Dans cette étude, les rats ont 8 semaines et arrivent à l'âge adulte (McCutcheon and Marinelli 2009), ils devraient donc utiliser majoritairement la voie métabolique du pipecolate pour dégrader la lysine, or les données de notre étude suggèrent le contraire. Ces résultats suggèrent un problème de maturation de cette voie biochimique chez les rats ShR/NCrl. Ceci fait écho aux taux plus élevé du 3-hydroxybutyrate, aussi observé chez ces rats. Comme vu dans l'étude précédente, le 3-hydroxybutyrate est un corps cétonique qui peut être utilisé comme source d'énergie alternative lorsque les concentrations en glucose sont faibles (Dimatelis et al., 2015), précocement au cours du développement (Nehlig 2004). L'augmentation de ce corps cétonique dans notre étude pourrait, là aussi, suggérer un délai de développement cérébral chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins. D'autres études réalisées dans ce modèle sont en accord avec cette hypothèse montrant notamment un délai de maturation en terme de connectivité cérébrale chez les rats SHR/NCrl (Ha et al., 2020).

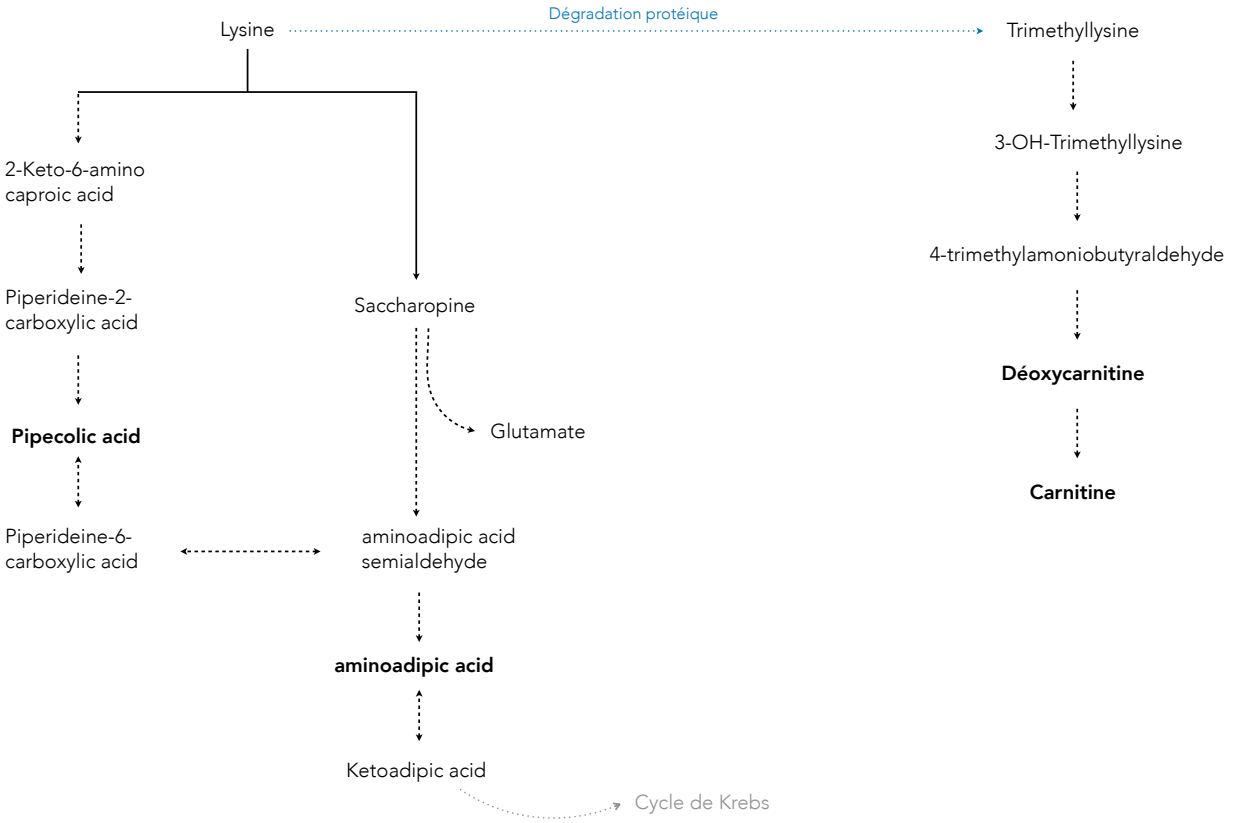


Figure 24 : Voie métabolique de la dégradation de la lysine

IV.B.3.a2 - Le métabolisme de la carnitine

Les résultats de cette étude montrent que trois métabolites, la triméthyllysine, la carnitine et la déoxycarnitine (Figure 24), sont à la fois discriminants et significativement différents et ils appartiennent à la voie métabolique de la carnitine qui est significativement modifiée chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats WKY/NHsd.

La carnitine joue un rôle primordial dans le transport des acides gras à l'intérieur des mitochondries pour produire de l'énergie via la ß-oxydation (Jones et al., 2010; Ferreira and McKenna 2017). Les acides gras peuvent être une source d'énergie alternative lorsque le glucose n'est pas en assez grande quantité et au cours du développement (Dimatelis et al., 2015).

De plus, la carnitine est également un puissant antioxydant grâce à son rôle de capteur de radicaux libres et peut ainsi protéger les tissus des dommages liés au stress oxydant (Ribas et al., 2014). Le rôle antioxydant et le niveau de carnitine augmentée dans la plupart des régions cérébrales de cette étude pourrait être une conséquence de l'augmentation du stress oxydant dans le modèle SHR/NCrl. La précédente étude sur le cerveau global montre une augmentation d'éthylmalonate, marqueur de la péroxydation lipidique suggérant une augmentation de stress oxydant. De plus, une étude montre une augmentation de stress oxydant dans ce modèle (Leffa et al., 2017)**.** L'augmentation de carnitine observée dans nos conditions expérimentales pourraient être une réponse à l'augmentation du stress pour limiter les dommages liés au stress.

Compte tenu de la capacité de la carnitine à traverser facilement la BHE, la supplémentation en carnitine pourrait être bénéfique pour prévenir les dommages neurologiques dus au stress oxydant (Ribas et al., 2014). Dans un modèle de rat, une supplémentation en carnitine permet de diminuer le stress oxydant (Ferreira and McKenna 2017). En clinique, une étude a montré qu'une supplémentation en carnitine diminuait les problèmes d'attention et le comportement agressif des garçons atteints de TDAH (Van Oudheusden and Scholte 2002).

IV.B.3.b - Le métabolisme de l'histidine

Le métabolisme de l'histidine est significativement modifié chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins avec notamment des modifications significatives de la carnosine et de l'histamine (Figure 25). La carnosine a un taux significativement diminué chez les rats SHR/NCrl par rapport aux WKY/NHsd. L'histamine a un taux significativement plus faible dans 3 régions et a un taux significativement plus élevé dans le cervelet.

L'histamine est une monoamine jouant un rôle dans la transmission synaptique (Passani et al., 2014; Carthy and Ellender 2021). L'histamine est impliquée dans le développement du système nerveux, la régulation de la neurotransmission et joue un rôle dans l'apprentissage, la cognition, la vigilance et la mémoire (Passani et al., 2014; Carthy and Ellender 2021). Il a été montré que le taux de décharge des neurones histaminergiques est plus élevé pendant les heures d'éveil et lors de périodes d'attentions accrues et de comportements motivés (Passani et al., 2014; Carthy and Ellender 2021). Compte tenu de ces rôles, l'histamine pourrait possiblement jouer un rôle dans la physiopathologie des modifications comportementales observées dans ce modèle animal.

Comme l'histamine joue un rôle dans la cognition et l'attention, l'intérêt de son utilisation comme potentiel traitement a été étudié. Les autorécepteurs H3 présynaptiques inhibent la libération d'histamine. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs H3 permet d'augmenter la libération de l'histamine et améliore les fonctions cognitives dans un modèle animal (Horner et al., 2007). Dans le TDAH, le MPH permet d'augmenter la libération corticale de dopamine et de noradrénaline, et une étude a montré qu'il permettait aussi de stimuler la libération corticale d'histamine (Horner et al., 2007). Comme le MPH n'a aucune affinité pour le récepteur de l'histamine, l'augmentation de la libération de l'histamine suite à la prise de MPH est probablement un effet secondaire à la libération de dopamine et noradrénaline (Horner et al., 2007).

La carnosine ayant un niveau plus faible a, elle aussi, un effet sur les neurotransmetteurs. En effet, La carnosine est présente dans le tissu musculaire et le cerveau et est précurseur de la synthèse de GABA (Schon et al., 2019). La carnosine est synthétisée à partir de l'histidine et de la ß-alanine (Holecek 2020). Ces trois métabolites peuvent passer la BHE, mais la majorité de la carnosine est synthétisée dans le cerveau à partir des deux précurseurs (Schon et al., 2019). Le striatum est une région contenant un grand nombre de neurones GABAergiques (Straub et al., 2016; Poppi et al., 2021). Le plus faible niveau de carnosine observé dans les régions cérébrales dont le striatum dorsal pourrait entrainer des modifications de production de GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur.

Ces deux métabolites, la carnosine et l'histamine, ont un rôle dans la neurotransmission et leurs modifications pourraient avoir un impact sur les comportements observés chez les rats SHR/NCrl. L'histamine peut réduire la production de cytokines pro inflammatoires comme l'IL-1ß (Carthy and Ellender 2021). La carnosine permet de diminuer le stress oxydant et l'inflammation à la fois grâce a sa capacité anti-oxydante directe et aussi sa capacité à inactiver les produits de la péroxidation lipidique (Boldyrev et al., 2010; Berezhnoy et al., 2019). Dans un modèle de rat, un traitement préventif à la carnosine réduit la production de radicaux libres (Berezhnoy et al., 2019). Dans un modèle de souris Alzheimer, un traitement en carnosine restaure les fonctions cognitives (Holecek 2020).

Dans le TDAH, la supplémentation en carnosine en tant que traitement chez des enfants atteints de TDAH n'ayant jamais pris de médicaments conduit à des améliorations modestes des symptômes cliniques de la maladie, principalement au niveau de l'attention (Schon et al., 2019).

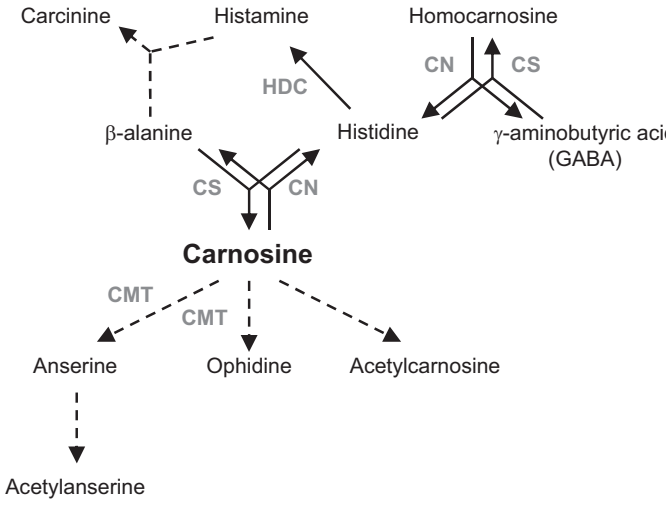


Figure 25 : Voie métabolique de la carnosine.

IV.B.3.c - Le métabolisme de la cystéine

Le métabolisme de la méthionine est significativement modifié chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins, avec des taux modifiés de cystathionine dans plusieurs régions cérébrales des rats SHR/NCrl par rapport aux rats WKY/NHsd.

La méthionine est une source importante de cystéine pour la synthèse de glutathion dans les astrocytes. La conversion de la méthionine en cystéine se fait via l'homocystéine et la cystathionine (Figure 26). Le glutathion est puissant anti-oxydant et a donc des propriétés neuroprotectives (McBean 2017). En plus de son implication dans la synthèse de glutathion, la cystathionine peut également être transformé en propionyl CoA pouvant être intégré dans le cycle de Krebs pour la production d'énergie.

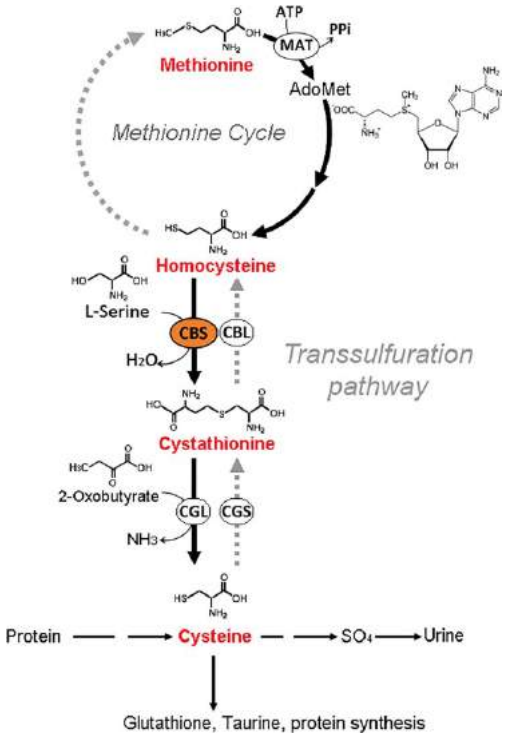


Figure 26 : Voie métabolique de la cystathionine.

IV.B.4 - Conclusion

Cette étude montre que les modifications métaboliques significatives les plus communément communément observées au niveau des régions cérébrales qui seraient impliquées dans la physiopathologie du phénotype des rats SHR/NCrl convergent vers 3 grandes catégories de métabolites (Figure 27). Les 3 grandes catégories de métabolisme correspondent au métabolisme énergétique, du stress oxydant et celui de la neurotransmission, renforçant ce qui avait déjà été observé sur cerveau entier. Des théories sur la physiopathologie du TDAH et des travaux de recherche cliniques ont déjà suggéré l'importance de ces trois métabolismes dans la maladie (Purper-Ouakil et al., 2011; Killeen et al., 2013; Faraone et al., 2015; Corona 2020). Cela renforce l'intérêt d'aller explorer en périphérie des indicateurs de ces trois grands métabolismes et plus spécifiquement des voies discutées pour la recherche de biomarqueurs spécifiques du TDAH.

Une autre étude ciblant de façon plus exhaustive ces grandes fonctions permettrait de mieux identifier les modifications présentes au sein de ces grands métabolismes. L'analyse que nous avons fait des données n'étudie par les particularités métaboliques de chaque région cérébrale qui sont malgré tout présentes. Par exemple, le métabolisme de la carnitine n'est pas modifié dans le striatum ventral ni l'amygdale suggérant une particularité métabolique de ces deux régions cérébrales par rapport aux autres. Les données devraient être ré-analysées afin d'étudier les différences existantes entre les rats SHR/NCrl et témoins en prenant en compte la spécificité des métabolites de chaque région. Ces nouvelles études apporteront des résultats essentiels pour pouvoir mieux comprendre les liens entre ces modifications biochimiques et la mise en place du phénotype dans ce modèle de rat de TDAH.

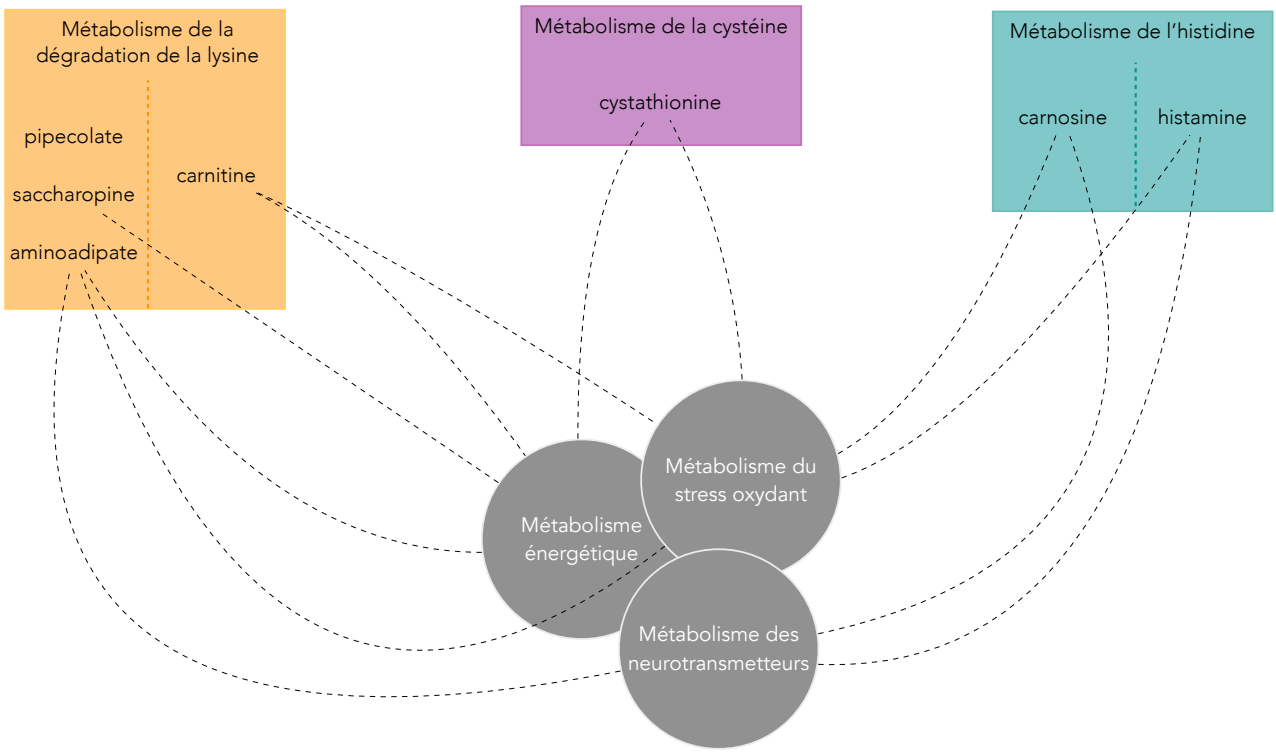


Figure 27 : Schéma général représentant les principales modifications des voies métaboliques

IV.C - Etude 3 : Dosage cérébral quantitatif des neurotransmetteurs dans un modèle de rats TDAH

IV.C.1 - Contexte

La troisième étude s'intéresse plus spécifiquement aux neurotransmetteurs. La dopamine et la noradrénaline sont les neurotransmetteurs les plus étudiés dans le TDAH mais de plus en plus d'études se concentrent sur d'autres neurotransmetteurs. Les études génétiques montrent des polymorphismes des gènes codant pour les récepteurs de la sérotonine ou de l'acétylcholine. Le réseau fronto-striatal est un réseau majeur dans les fonctions exécutives et l'apprentissage par renforcements. Ces fonctions sont altérées dans le TDAH.
L'objectif de cette étude est de quantifier de manière absolue ces 4 neurotransmetteurs dans 4 régions cérébrales (le cortex pré-frontal, le cortex pré-limbique, le striatum dorsal et le striatum ventral) afin d'apporter des éléments de réponse quant à l'implication de ces différents systèmes de neurotransmission dans le TDAH.

IV.C.2 - Méthodologie

IV.C.2.a - Echantillons

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats (Rattus novergicus) mâles, 8 rats modèles de TDAH de souche SHR/NCrl (Charles River, Allemagne) comparés aux 8 rats témoins de souche WKY/NHsd (Envigo, Royaume-Uni) ont été utilisés. Après la mise à mort par décapitation, les 10 régions cérébrales d'intérêt sont disséquées puis stockées à -80°C avant l'analyse.
Tous les rats sont reçus à 7 semaines, une semaine avant le début des expériences afin de leur laisser le temps de s'acclimater à l'environnement et pour diminuer les stress. Les rats sont donc âgés de 8 semaines pour les expériences, correspondant à l'âge où les rats SHR/NCrl présentent les symptômes de TDAH et avant le développement de l'hypertension artérielle (Sagvolden et al., 2009). Les rats sont hébergés par deux en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique où une maison en carton et une feuille de papier absorbant, avec l'eau et la nourriture disponibles à volonté. La température de la salle est maintenue autour de 21°C, l'humidité est contrôlée et le cycle de lumière est conservée (obscurité 19h-7h, lumière 7h-19h).

Les rats sont mis à mort par décapitation, les cerveaux sont immédiatement disséqués en 10 régions cérébrales. Le cortex orbito-frontal (OF), le cortex pré-limbique (PrL), le le striatum ventral (vStr) et le striatum dorsal (dStr) sont disséqués puis congelés à -80°C.

IV.C.2.b - Préparation des échantillons

Tous les échantillons cérébraux sont lyophilisés (FreeZone® 4,5L, Labconco, Etats-Unis) à -107°C, 0,2mbar pendant 12 heures. Une fois lyophilisés, 3mg de matière sèche sont pesées auxquels sont ajoutés 400µL d'une solution composée d'acétonitrile (ACN) et d'eau (80/20) afin de précipiter les protéines. On ajoute à ce mélange 100µL d'une solution d'étalon interne (Tableau 9). Ensuite, le mélange est vortexé pendant 30secondes, homogénéisé à l'aide d'un agitateur planaire à 4°C pendant 30 minutes, suivie d'une centrifugation à 5000 rpm pendant 20 minutes. 450µL de surnageant sont collectés et concentrés à l'aide d'un speedvac (Savant SPD 111v SpeedVac, Thermo Scientific, Etats-Unis) à 45°C pendant 4 heures. Les résidus secs sont finalement repris dans 100µL d'un mélange de méthanol et d'eau (1:9) et transférés sur une plaque 96 puits dans un vial avec insert avant l'analyse LC-HRMS.

Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout en quantité parfaitement connue et unique, dans toutes les solutions d'étalonnage, dans tous les échantillons et CQ, d'une molécule qui sert de référence (étalon interne). Les intensités des molécules sont divisées par l'intensité de l'étalon interne pour obtenir un ratio et cela permet de tracer une courbe d'étalonnage : Ratio = f (Concentration).

Dans cette étude, les échantillons de contrôle qualité (CQ) ont été réalisé avec des échantillons de cervelets lyophilisés. 4 types de CQ ont été utilisés contenant des solutions d'étalons internes de concentrations différentes (Tableau 10) :

- CQ 1 : 3mg de cervelet lyophilisé + SEI
- CQ 2 « bas » : 3mg de cervelet lyophilisé + SEI + Solution 1 S1
- CQ 3 « moyen : 3mg de cervelet lyophilisé + SEI + Solution 2 S2
- CQ 4 « haut » : 3mg de cervelet lyophilisé + SEI + Solution 3 S3

Dans le but d'obtenir des courbes de calibration, les étalons internes suivent le même traitement pré-analytique.

Tableau 9 : Tableau des métabolites utilisés avec leur étalon interne, leurs gammes de calibrations, leurs temps de rétention et leur concentration

Métabolites	Calibration Range (pmol/mL)	Etalon Interne	Temps de rétention	Concentration SEI (pmol/mL)
AcetylCholine	7,5 - 5000	Acetylcholine-d9	0,97	2000
Serotonine	1,5 - 1000	Serotonine-d4	2,25	200
Dopamine	15 - 10000	Dopamine-d2	2,76	200
Noradrénaline	1,5 - 1000	L-DOPA d3	3,63	200

Tableau 10 : Tableau des concentrations des étalons internes dans les 3 types d'échantillons CQ

	Concentrations cibles (pmol/mL)		
Métabolites	S1	S2	S3
Dopamine	40	400	800
Noradrénaline	40	400	800
Serotonine	40	400	800
AcetylCholine	800	8000	16000

IV.C.2.c - Analyse LC-MS

Une fois les échantillons prêts, 5µL sont injectés dans le système LC-MS, utilisant une colonne chromatographie de type HILIC (ACQUITY UPLC ® BEH Amide (1.7 µm x 100 x 2.1 mm); température 50°C) associée à un gradient de deux phases mobiles (Phase A : Eau + 50 mM Formiate NH_4 + 0.5 % Acide formique; Phase B : ACN/Eau (95:5) + 50 mM Formiate NH_4 + 0.5 % Acide formique) à un débit de 0,4mL/min. Le spectromètre de masse couplé à la chromatographie est un triple quadripôle (XEVO TQ-XS (Waters®) avec une source Unispray®, ionisé en mode positif.

IV.C.2.d- Analyses statistiques

L'objectif de cette étude est de déterminer si les concentrations des métabolites étudiés sont différentes entre les deux souches de rats dans les différentes régions cérébrales. Les concentrations sont normalisées par rapport à la masse de matière sèche pesée.
L'analyse statistique univariée permet de comparer les concentrations de chaque métabolites entre les deux groupes et a été réalisée à l'aide d'un test de Wilcoxon (metaboanalyst.ca). Les métabolites ayant une différence significative entre les rats SHR/Ncrl et les rats WKY/NHsd (p.value < 0,05) ont été sélectionnés.

IV.C.3 - Résultats

IV.C.3.a - Les régions corticales

Dans le cortex orbito-frontal, 2 métabolites ont des concentrations significativement différentes entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd. Dans le cortex orbito-frontal, la concentration moyenne de noradrénaline est de 36,57 pmol/mg chez les rats SHR/NCrl et est de 56,31 pmol/mg chez les rats WKY/NHsd. La concentration moyenne de sérotonine chez les rats SHR/NCrl est de 20,35 pmol/mg et est de 32,43 pmol/mg chez les rats WKY/NHsd.
Dans le cortex pré-limbique, la sérotonine présente une concentration significativement plus faible chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins, respectivement 20,90 pmol/mg et 34,57 pmol/mg. (Figure 28).

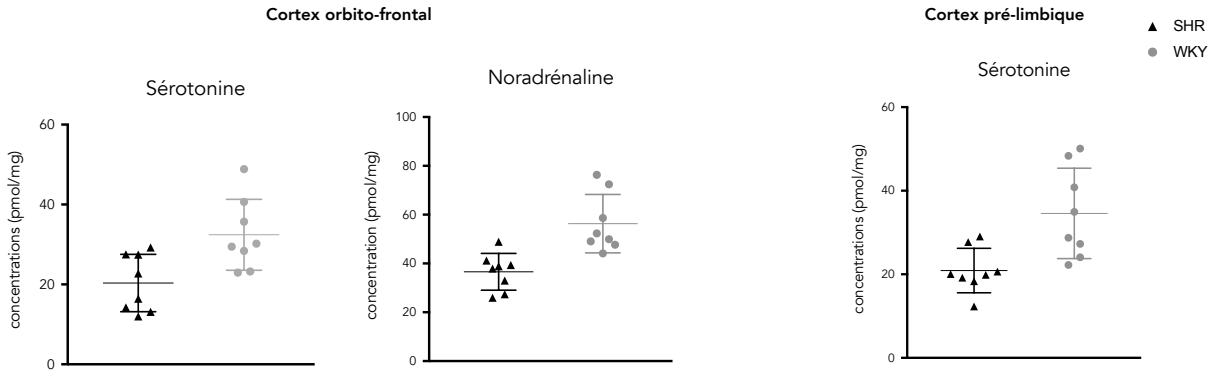


Figure 28 : Boîtes à moustache (« Box plot ») des métabolites ayant une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dans le cortex orbito-frontal et le cortex pré-limbique.
Les rats SHR/NCrl sont en gris et les rats WKY/NHsd sont en blanc.

IV.C.3.b - Le striatum

IV.C.3.b1 - Le striatum dorsal

Dans le striatum dorsal, 3 métabolites ont une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd. Plus précisément, la dopamine, l'acétylcholine et la sérotonine ont une concentration plus faible chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats WKY/NHsd (Figure 29). La dopamine a une concentration de 389,30 pmol/mg chez les rats SHR/NCrl, et une concentration de 571,23 pmol/mg chez les rats WKY/NHsd. L'acétylcholine a une concentration de 6,10 pmol/mg chez les rats SHR/NCrl et une concentration de 15,91 pmol/mg chez les rats WKY/NHsd. La sérotonine présente une concentration de 24,76 pmol/mg chez les rats SHR/NCrl et une concentration de 31,81 pmol/mg chez les rats WKY/NHsd.

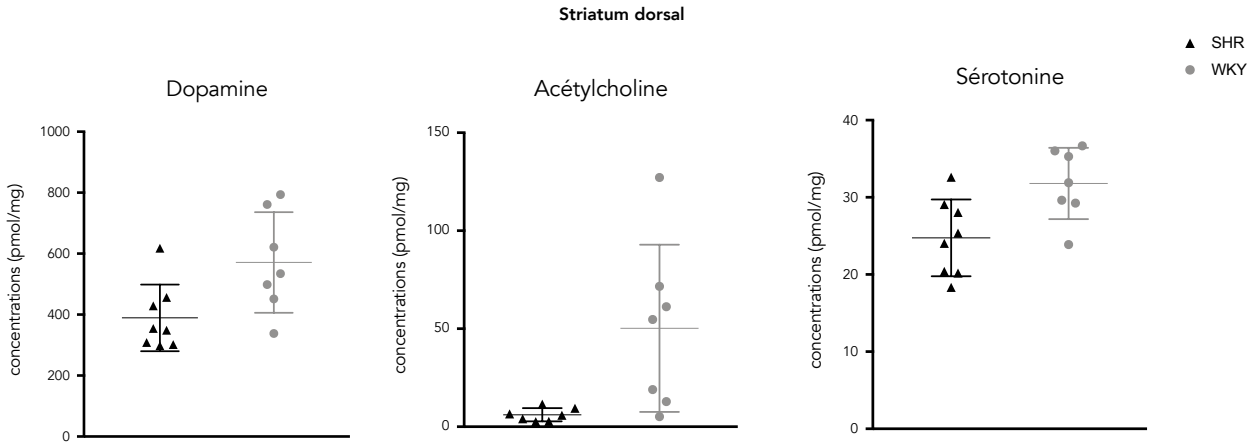


Figure 29 : Boîtes à moustache (« Box plot ») des métabolites ayant une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dans le striatum dorsal. Les rats SHR/NCrl sont en gris et les rats WKY/NHsd sont en blanc.

IV.C.3.b2 - Le striatum ventral

Dans le striatum ventral, 2 métabolites présentent une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd. Plus précisément, la dopamine et l'acétylcholine ont une concentration plus faible chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats WKY/NHsd (Figure 30). La dopamine présente une concentration de 941,69 pmol/mg chez les rats SHR/NCrl et de 1343,52 pmol.mg chez les rats WKY/NHsd. L'acétylcholine présente une concentration de 38,52 pmol/mg chez les rats SHR/NCrl et une concentration de 174,14 pmol/mg chez les rats WKY/NHsd.

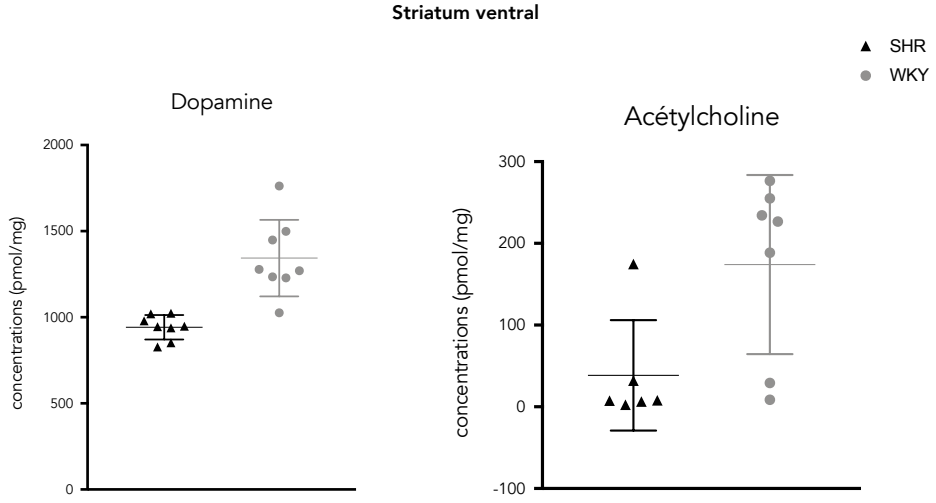


Figure 30 : Boîtes à moustache (« Box plot ») des métabolites ayant une concentration significativement différente entre les rats SHR/NCrl et les rats WKY/NHsd dans le striatum ventral. Les rats SHR/NCrl sont en gris et les rats WKY/NHsd sont en blanc.

IV.C.4 - Discussion

Les rats SHR/NCrl présentent des différences de concentrations de certains neurotransmetteurs pouvant être reliées à la physiopathologie du TDAH dans deux régions corticales et deux régions sous-corticales. Ces résultats suggèrent qu'une altération des systèmes de la neurotransmission pourrait jouer un rôle dans le TDAH, notamment avec une altération du système dopaminergique. Mais d'autres neurotransmetteurs tels que la sérotonine ou l'acétylcholine sont aussi modifiés chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins. Ces résultats suggèrent une implication des autres systèmes de neurotransmetteurs dans la physiopathologie du TDAH.
La majorité des différences se trouvent dans le striatum dorsal et ventral suggérant une forte implication du striatum dans la physiopathologie du TDAH. Les régions corticales telles que le cortex orbito-frontal et pré-limbique présentent elles aussi des modifications chez les rats SHR/NCrl comparés aux rats témoins. Dans ces régions, nous observons une diminution de dopamine, de noradrénaline et de sérotonine chez les rats SHR/NCrl par rapport aux animaux témoins. Ces résultats sont accord avec les hypothèses impliquant les réseaux fronto-striataux dans la physiopathologie du TDAH.

IV.C.4.a - Le système dopaminergique

Cette étude montre une diminution de la concentration de dopamine chez les rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins, à la fois dans le striatum dorsal et le striatum ventral. Une plus faible concentration de dopamine dans le striatum des rats SHR/NCrl va dans le sens de l'hypothèse majoritaire suggérant une hypodopaminergie dans le TDAH (Russell 2002, 2007; Oades 2008). Une étude a montré que les rats SHR/NCrl présentaient une diminution de la libération de dopamine dans le striatum par rapport aux rats témoins (Russell 2002; Del Campo et al., 2011). Des études de microdialyse intracérébrale ont montré des niveaux extracellulaires de dopamine plus faibles dans le noyaux caudé de rats SHR/NCrl âgés de 8 semaines par rapport aux témoins (de Jong et al., 1995). La dopamine et la noradrénaline jouent un rôle important dans les fonctions exécutives grâce à leurs influences neuromodulatrices sur les circuits fronto-striato-cérébelleux (Del Campo et al., 2011). Les modifications de concentration de dopamine observées dans le striatum dorsal et ventral des rats SHR/NCrl pourraient être en lien avec les symptômes observés chez ces rats.
En plus de l'hypothèse d'une altération du système dopaminergique, les neurones noradrénergiques semblent moins bien régulés et hyper fonctionnels dans le cortex pré-frontal d'enfants atteints de TDAH (Arnsten 1998; Russell 2002). Les neurones

noradrénergiques du locus coeruleus projettent vers le cortex pré-frontal, jouant un rôle dans les fonctions cognitives comme la mémoire de travail et dans les fonctions attentionnelles (Russell 2007; Del Campo et al., 2011). Dans cette étude, les rats SHR/NCrl présentent des concentrations plus faibles de noradrénaline dans le cortex orbito-frontal.

La libération des catécholamines dans le cortex pré-frontal est en lien avec l'état d'éveil. Le niveau et le moment de libération de la noradrénaline et de la dopamine peuvent coordonner l'état d'éveil et la fonction du cortex pré-frontal. En effet, des conditions de faible éveil sont associées à de très faibles niveaux de décharges noradrénergiques. En revanche, dans des conditions d'alerte, une décharge modérée de noradrénaline est retrouvée. Enfin, dans des conditions de stress, des niveaux trop élevés de libération de noradrénaline sont retrouvés (Figure 31) (Arnsten and Pliszka 2011). Les plus faibles niveaux de noradrénaline observés dans le cortex orbito-frontal des rats SHR/NCrl pourrait correspondre aux moins bonnes performances cognitives de ces derniers. De plus, l'atomoxetine est l'un des traitements du TDAH, il permet d'augmenter la disponibilité extracellulaire de la noradrénaline et de la dopamine dans le cortex pré-frontal et améliore les fonctions cognitives chez le rat. Ces études suggèrent une hyponoradrénergie corticale chez les rats SHR/NCrl comme ce que nous observons dans notre étude.

Ces études sont en faveur d'une altération du système dopaminergique et noradrénergique dans la physiopathologie du TDAH. Cependant, de plus en plus études suggèrent l'implication d'autres neurotransmetteurs dans le TDAH.

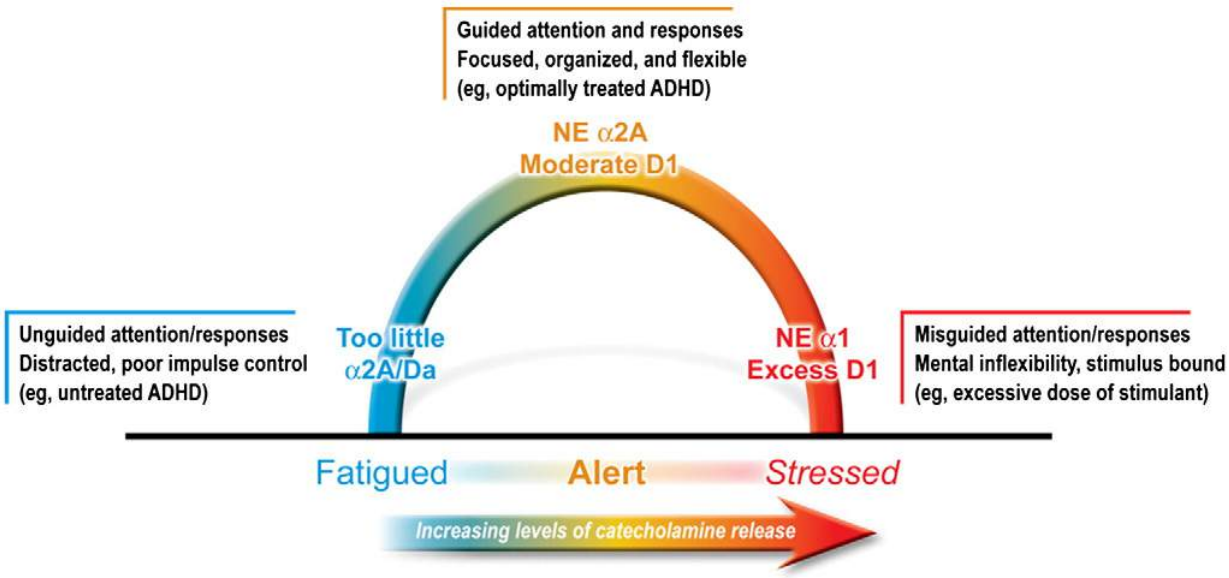


Figure 31 : Schéma représentant les niveaux d'éveil en fonction de la quantité de libération de dopamine et noradrénaline.
(D'après Arnsten & Pliszka, 2011)

IV.C.4.b - Le système sérotoninergique

Dans nos conditions expérimentales, la sérotonine est en concentration plus faible dans le cortex orbito-frontal, pré-limbique et le striatum dorsal des rats SHR/NCrl par rapport aux témoins. La sérotonine a été peu étudiée dans le TDAH car la cible principale du MPH est le transporteur de la dopamine et, dans une moindre mesure, le transporteur de la noradrénaline. Mais environ 30% des patients ne répondent pas à ce traitement et certaines études précliniques ont montré que l'utilisation d'un bloqueur des transporteurs de la sérotonine améliorait le comportement des rats en diminuant l'hyperactivité (Oades 2008; Banerjee and Nandagopal 2015). De plus, les études génétiques montrent des associations entre des polymorphismes des gènes codant pour le transporteur et pour des récepteurs de la sérotonine et le TDAH (Mick and Faraone 2008). Ces observations conduisent à la génération d'hypothèses sérotoninergiques du TDAH.

Le cortex orbito-frontal est dépendant de la sérotonine, une étude a montré qu'une déplétion en sérotonine dans le cortex orbito-frontal altère la régulation des émotions, l'inhibition et l'apprentissage (Banerjee and Nandagopal 2015). Dans le modèle SHR/NCrl, une étude montre un dysfonctionnement de la sérotonine, et une administration d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine permet de diminuer l'activité des rats (Banerjee and Nandagopal 2015). L'impulsivité comportementale et cognitive observée dans le TDAH pourrait être associée avec la sérotonine (Oades 2007). Toutes ces études sont en faveur d'une implication de la sérotonine dans la physiopathologie du TDAH et les résultats de cette étude suggèrent un manque de sérotonine dans le cortex et le striatum dorsal.

IV.C.4.c - Le système cholinergique

Dans cette étude, la concentration d'acétylcholine est plus faible dans le striatum dorsal et ventral des rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins.

Comme vu précédemment, environ 30% des patients atteints de TDAH ne répondent pas aux traitements de type psycho-stimulant (Banerjee and Nandagopal 2015) suggérant une implication d'autres neurotransmetteurs dans la physiopathologie du TDAH. Des études génétiques montrent des polymorphismes du gène codant pour le récepteur nicotinique α4 et le gène codant pour le transporteur de l'acétylcholine en lien avec le TDAH (Kent et al., 2001; Todd et al., 2003; English et al., 2009). De plus, une étude GWAS a montré des variations dans le gène codant pour la sous-unité α7 en association avec le TDAH (Stergiakouli et al., 2012). Ces études fournissent des preuves sur l'implication du système cholinergique dans le TDAH. La nicotine est un agoniste cholinergique et les premiers travaux sur la maladie d'Alzheimer ont montré des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives et notamment sur l'attention et la mémoire (Fleisher and McGough 2014). Il a été montré que les effet des agonistes cholinergiques sur l'attention sont médiés par le sous-type α4ß2. En effet, l'administration d'un agoniste partiel des récepteurs α4ß2 améliore les performances attentionnelles (Fleisher and McGough 2014).

Le striatum est une région sous corticale majeure pour la motivation et l'intégration de l'action (Lim et al., 2014). C'est une région cérébrale hautement enrichie en marqueurs cholinergiques comme l'acétylcholine, la choline acétyltransférase ou encore l'acétylcholinesterase. Cette haute densité en marqueurs cholinergiques souligne l'importance de ce système de neurotransmission dans le striatum. Cette étude souligne le fait que l'acétylcholine, ayant une concentration plus faible dans le striatum chez les rats SHR/NCrl par rapport aux témoins, pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie du TDAH.

IV.C.4.d - Conclusion

La dopamine est l'un des neurotransmetteurs qui a été le plus étudié dans le contexte du TDAH. Malgré les différentes études cliniques qui ont été menées, l'implication de ce neurotransmetteur dans la physiopathologie du TDAH n'est pas clairement élucidé. Comme d'autres études cliniques et précliniques l'ont suggéré auparavant, nos données vont dans le sens d'une hypodopaminergie qui pourrait être en lien avec la physiopathologie du TDAH.

De plus, de nombreux articles via des données génétiques ont suggéré que d'autres systèmes de neurotransmission seraient perturbés dans cette maladie. Des modifications fonctionnelles au sein des réseaux fronto-striataux ont clairement été démontrés chez les patients atteints de TDAH. L'activité de ces réseaux est modulée par des afférences dopaminergiques, mais aussi par d'autres neuromodulateurs comme la noradrénaline, la sérotonine ou l'acétylcholine. Les données obtenues au niveau du striatum mettent clairement en évidence que les rats SHR/NCrl présentent des anomalies fonctionnelles dans de multiples systèmes de neurotransmissions dont la dopamine, mais aussi la sérotonine et l'acétylcholine, dont les concentrations sont aussi modifiées dans le cortex frontal au sein duquel des anomalies noradrénergiques ont aussi été identifiées. Les concentrations de glutamate et GABA ont aussi été quantifiées dans ces échantillons et restent à analyser. Il nous reste également à analyser l'ensemble des neurotransmetteurs étudiés dans les autres régions d'intérêt, notamment au niveau de l'amygdale, de l'hippocampe mais aussi du cervelet.

IV - Conclusion de l'étude préclinique

Ces études ont permis de montrer que les rats SHR/NCrl présentent un métabolome cérébral spécifique comparé aux animaux témoins. Ces études montrent des modifications des métabolismes énergétique, du stress oxydant et des systèmes des neurotransmetteurs. Ces résultats complètent certaines hypothèses quant à l'implication de ces métabolismes dans la physiopathologie du TDAH. Même si l'implication du système dopaminergique est largement étudié dans le TDAH, d'autres études suggèrent qu'un déséquilibre du métabolisme énergétique serait à l'origine des symptômes attentionnels observés dans ce trouble. Issue du modèle cognitivo-énergétique de Sergeant, la théorie neuro-énergétique comportementale est une théorie expliquant le ralentissement et les fluctuations du fonctionnement attentionnel caractéristiques du TDAH (Sergeant 2005; Killeen et al., 2013).

Ces études montrent également que le TDAH ne serait pas uniquement lié à la dopamine mais aussi à d'autres neurotransmetteurs. Cette étude permet d'identifier de nouvelles voies métaboliques possiblement impliquées dans le TDAH et renforce l'idée d'aller les explorer pour mieux comprendre la physiopathologie de ce trouble.

L'avantage des études précliniques est qu'il est possible d'analyser à la fois le cerveau et les matrices périphériques. Les différences communes observées entre le métabolome cérébral et périphérique suggèrent qu'il est possible d'étudier le TDAH en clinique à l'aide d'échantillons sanguins ou urinaires.

Mieux comprendre ce trouble permettrait de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques mais aussi de mieux le diagnostiquer. Dans le but d'améliorer le diagnostic, l'étude métabolomique suivante propose de rechercher des potentiels marqueurs sanguins et urinaires dans une étude clinique

Chapitre V - L'étude clinique

Identification de biomarqueurs sanguins et urinaires du TDAH

V.1 - Contexte et objectifs

Le Trouble Déficit d'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) est un trouble du neurodéveloppement dont le diagnostic se base principalement sur des observations cliniques. Ce diagnostic peut être difficile en raison des différentes formes phénotypiques possibles ainsi que des multiples comorbidités existantes (Biederman et al., 2002; Biederman and Faraone 2005) (Annexe 1). Le fait que la prévalence de ce trouble ne cesse d'augmenter (Getahun et al., 2013; Giacobini et al., 2018) soulève plusieurs hypothèses : L'augmentation de la détection du trouble est-elle due aux meilleures performances de diagnostic ou au sur-diagnostic de faux-positifs (Kazda et al., 2021) ? Ces dix dernières années, l'évolution de la société et la médiatisation ont permis au TDAH d'être une pathologie mieux connue du grand public, ce qui a pu favoriser une augmentation de diagnostic et à l'instauration accrue de traitements chez ces patients. (Takahashi et al., 2021). A l'inverse, une pénurie de psychologues et une absence de filière de soins structurée pour ce type de patients en France a pu favoriser l'utilisation exclusive des auto-questionnaires du DSM. Les seules données cliniques ne permettent plus d'établir un diagnostic fiable de TDAH en tant que trouble individualisé et spécifique.

A l'inverse, il est aussi suggéré un diagnostic insuffisant chez les filles qui s'avèrent moins hyperactives ou impulsives que les garçons mais surtout inattentives (Gershon 2002; Evans et al., 2010; Bruchmuller et al., 2012). Les comportements moteurs sont plus visibles par les parents ou les enseignants, ce qui pourrait expliquer pourquoi les garçons sont plus souvent diagnostiqués que les filles (Ford-Jones 2015).

A l'heure actuelle, le diagnostic se base sur le phénotype des enfants décrit par les parents et les enseignants. Une consultation avec un médecin spécialisé ainsi que des tests neuropsychologiques sont réalisés afin de poser le diagnostic.

Ces observations montrent l'intérêt d'identifier des marqueurs de diagnostics fiables afin de pouvoir caractériser rapidement les patients atteints de ce trouble et de mieux prendre en charge.

Par le passé, des études génétiques ou de neuroimagerie ont été réalisées mais n'ont pas permis d'établir des biomarqueurs utilisables en diagnostic de routine . La métabolomique est une technique assez récente qui permet d'identifier des métabolites dans différentes matrices biologiques telles que le sang ou les urines. Les métabolites sont des produits intermédiaires voire finaux du métabolisme, leur mesure et identification peut refléter un état phénotypique d'un individu et potentiellement déterminer le statut métabolique d'une pathologie (Thome et al., 2012).

L'objectif principal de cette étude est de caractériser un métabolome spécifique des patients atteints de TDAH. En effet, l'analyse du métabolome de patients ayant un TDAH caractérisé à l'aide d'explorations neuropyschologiques permettrait d'identifier les modifications présentes dans le sang et les urines des patients atteints de TDAH par rapport aux sujets témoins ; ainsi que d'identifier une signature métabolique prédictive afin d'apporter une aide au diagnostic. Enfin, cette analyse peut avoir un intérêt dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques existant dans ce trouble.

V.2 - Matériel et méthode

V.2.a - Sujets

V.2.a1 - Critères d'inclusion et d'exclusion

Pour cette étude, des patients atteints de TDAH non traités par MPH et des patients contrôles ont été inclus. Les patients âgés de 6 à 15 ans ont été suivis pour des troubles attentionnels et/ou hyperactivité au sein du service de neuropédiatrie du CHRU de Tours.
Le groupe TDAH est constitué d'enfants dont l'histoire médicale et la symptomatologie clinique étaient compatibles avec un TDAH (DSM, Conners) et dont le diagnostic a été confirmé par un bilan neuropsychologique objectif comportant une évaluation de l'efficience intellectuelle (WISC), des fonctions d'attention soutenue, sélective et divisée et des fonctions exécutives (Batterie TEAch).
Le groupe de sujets contrôles est constitué d'enfants venus en consultation pour des troubles suggérant un TDAH (hyperactivité, impulsivité, inattention) mais chez qui le diagnostic n'a pas finalement été confirmé au terme du bilan diagnostic. Dans un soucis de clarté, le terme « témoins » sera parfois utilisé par la suite pour qualifier le groupe des sujets contrôles.
L'ensemble des données de caractérisation cliniques et cognitives des patients inclus est fourni dans un tableau en annexe (Annexe 19).

Pour ces 2 groupes les critères d'exclusion sont :

- Présence d'une déficience intellectuelle (QI<70)
- Traitement médicamenteux (MPH)
- Refus des parents ou de l'enfant de participer à l'étude
- Échec ou refus de l'évaluation pluridisciplinaire (médicale, biologique ou neuropsychologie)

V.2.a2 - Collecte des échantillons

Pour chaque patient :

- Les échantillons sanguins ont été prélevés après la consultation avec le clinicien. Chaque échantillon a été centrifugé (11000 *g*, à 4°C pendant 10 minutes) pour collecter 500µL de plasma dans un tube 2mL stocké à -80°C.
- Les premières urines du matin ont été collectées dans un tube en polypropylène, chaque échantillon a été aliquoté dans un tube Eppendorf de 1,5mL et immédiatement stocké à -80°C.

V.2b - Préparation des échantillons

Les échantillons sanguins et urinaires ont été préparés de la même manière que les échantillons précliniques.

Les échantillons urinaires ont été dilués au dixième dans de l'eau ultra-pure, vortexés pendant 15 secondes et transférés dans une plaque 96 puits. Afin d'extraire les métabolites, 800µL de MeOH/H2O (1:1) sont ajoutés aux 100µL de plasma. Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 15 secondes, homogénéisés à l'aide d'un agitateur planaire pendant 30 minutes à 4°C, et centrifugés à 11 500° x *g* pendant 10 minutes à 4°C. Après centrifugation, 500µL de surnageant sont collectés, concentrés et séchés sous azote. Les résidus secs sont repris dans 100µL de MeOH/H2O (1:9), puis transférés sur une plaque 96 puits.

Des échantillons contrôles qualités (CQ) sont réalisés à partir d'un mélange d'un même volume de tous les échantillons et ont été extraits dans les mêmes conditions que les échantillons. Dans un premier temps, 15 échantillons CQs ont été injectés pour équilibrer le système chromatographique et un échantillon CQ est analysé tous les 10 échantillons.

L'analyse LC-HRMS a été réalisée en utilisant une UHPLC (colonne C18) couplée à un spectromètre de masse Q-Exactive en mode d'ionisation positive et négative comme précédemment décrit.

V.2.c - Analyse métabolomique

L'analyse métabolomique couple la chromatographie liquide à haute résolution avec le système UPLC Ultimate 3000 (Dionex, Allemagne) et la spectrométrie de masse Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Allemagne) avec une ionisation Electro spray en mode positif et négatif (ESI+ & ESI-, une séquence d'analyse pour chaque mode). Le système est contrôlé par Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). La chromatographie utilise une colonne de type C18 (Phenomenex Kinetex 1,7µm XB - C18) maintenue à 55°C. Un gradient multi-étapes est réalisé à l'aide d'une phase mobile A constituée d'acide formique 0,1% dans de l'eau et une phase mobile B constituée de méthanol acidifié avec 0,1% d'acide formique.

Le gradient est réglé pour un débit de 0,4mL/min sur une durée de 30 minutes pour les modes négatif et positif. Le gradient multi-étapes a été programmée comme suit :

- 0-3 min : 0% B
- 3-8 min : 0 à 15% B
- 8-15 min : 15 à 50% B
- 15-20 min : 50 à 100%
- 20-25 min : 100% B
- 25-28 min : 100 à 0% B

V.3.d - Traitement des données

V.3.d1 - Traitement des données à partir de la bibliothèque IROA

Les données brutes sont analysées à l'aide d'une bibliothèque développée au laboratoire. Cette bibliothèque est composée de 495 standards (iroatech.com) qui ont été précédemment analysés dans les mêmes conditions que les échantillons cliniques de l'étude. Pour chaque standard, un spectre de masse à haute résolution, une MS2 à haute résolution ainsi que le temps de rétention sont enregistrés dans notre base de données. Le logiciel Xcalibur 2.2 permet d'intégrer l'aire du signal de chaque composé. Ainsi, des composés ont pu être détectés dans les échantillons sanguins et urinaires à partir de cette bibliothèque. Dans les échantillons sanguins, 70 métabolites ont été détectés pour le mode positif et 62 pour le mode négatif. Si un métabolite est détecté dans les deux modes, le métabolite n'est gardé que dans une seule modalité (celui ayant le CV dans le CQ le plus faible est sélectionné).
Après la fusion des deux modes et l'analyse de la redondance, 105 métabolites ont été sélectionnés pour la matrice sanguine (Annexe 20). Dans les échantillons urinaires, 72 métabolites ont été détectés pour le mode positif et 66 pour le mode négatif. 118 métabolites ont été sélectionnés pour la matrice urinaire après la combinaison des deux modes et l'analyse de la redondance (Annexe 21) (Tableau 11).

Tableau 11 : Métabolites détectés dans les différentes conditions pour les deux matrices biologiques

		Sang	**Urine**
Nombre de métabolites détectés	Ionisation positive (Mode +)	70	72
	Ionisation négative (Mode -)	62	66
Nombre de métabolites détectés (après élimination de la redondance)		105	118

V.3.d2 - Pré-traitement

Le coefficient de variation (CV) est calculé CV% = (écart-type / moyenne) x 100 pour les métabolites. Les métabolites ayant un CV supérieur à 30% dans les CQs ne sont pas retenus pour les analyses statistiques suivantes. Ils ont été normalisés à l'aire totale (Ejigu et al., 2013). L'objectif de la normalisation des données est de réduire les biais pour améliorer la cohérence globale des données afin que des comparaisons biologiques puissent être réalisées. De plus, les données ont subi une transformation linéaire de type « UV (Unit Variance) scaling » par centrage et réduction des données à la variance unitaire, afin que tous les métabolites présentent la même importance, pour éviter qu'un métabolite ayant une plus forte intensité prenne le dessus sur ceux ayant une plus faible intensité. Après ces étapes, les analyses statistiques entre les TDAH et les témoins sont réalisées pour chaque matrice.

V.4.e - Analyses statistiques

Différentes analyses statistiques ont été réalisées telles que des analyses univariées et multivariées. Ces analyses statistiques permettent de comparer les groupes TDAH et Contrôle dans les matrices sanguine et urinaire.

V.4.e1 - Analyses statistiques univariées

Les analyses statistiques univariées ont été réalisées à l'aide de Metaboanalyst 5.0 en utilisant un test de comparaison de moyenne (t-test) pour sélectionner les métabolites significativement différents entre les groupes (p.value < 0,05). De plus, le sens de variation de chaque métabolite est déterminé.

V.4.e2 - Analyses statistiques multivariées

Les études multivariées ont été réalisées dans un premier temps pour déterminer les métabolites biomarqueurs participant à la discrimination des deux groupes et dans un second temps afin de tester la capacité de ces biomarqueurs à prédire le diagnostic.
Les études multivariées ont été réalisées à l'aide du site Metaboanalyst (metaboanalyst.ca). Des analyses en composantes principales ont été réalisées afin de mettre en évidence les potentielles valeurs aberrantes également appelées « outliers » ainsi que de potentielles séparations des groupes sans à priori pour chaque matrice. Ensuite des modèles PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) ont été réalisés pour chaque matrice. Ces modèles ont pour but d'identifier les variables qui permettent la meilleure discrimination possible entre les groupes. Chaque modèle est caractérisé par une valeur d'exactitude (précision), une valeur cumulée de la variation R2, une valeur de validation-croisée (Q2), ainsi qu'un test de permutation (p) permettant de déterminer les variables importantes de la projection (VIP).
Les études multivariées ont aussi été utilisées pour tester l'habilité du modèle à prédire le diagnostic. Pour cela, deux cohortes indépendantes ont été utilisées, une cohorte expérimentale et une de validation. Les données ont été divisées de manière aléatoire en une cohorte expérimentale contenant 80% de la cohorte totale et une cohorte de validation contenant les 20% restants. Un modèle PLS-DA est réalisé sur la cohorte expérimentale, les métabolites VIP sont sélectionnés et utilisés pour prédire le diagnostic de la cohorte de validation. Ces étapes ont été répétées 5 fois de manière indépendante pour estimer la

sensibilité (Se), spécificité (Sp), la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN).

La sensibilité d'un test mesure sa capacité à donner un résultat positif lorsque l'hypothèse est vérifiée. La spécificité, quant à elle, mesure la capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée. Pour un examen n'effectuant aucune erreur, les valeurs de sensibilité et spécificité sont égales à 1 et peuvent donc être utilisées en dépistage. La valeur prédictive est la probabilité que le sujet soit atteint de la maladie lorsque le test est positif ; la valeur prédictive négative est la probabilité que le sujet soit indemne de la maladie lorsque le test est négatif.

V.4.f - Interprétation biologique

L'interprétation biologique permet de donner un sens physiopathologique aux différences observées entre les deux groupes. Les métabolites sélectionnés à l'aide des modèles PLS-DA et des tests de comparaison de moyenne sont replacés dans les voies métaboliques grâce à metaboanalyst.ca. Les voies métaboliques sont sélectionnées si leur probabilité p est significative (p.value < 0,05) et si la voie métabolique a un impact non nul.

V.3 - Résultats

V.3.a - Patients

Pour cette étude, 29 patients atteints de TDAH et 30 sujets contrôles (également appelés témoins) ont été inclus. La moyenne d'âge des patients du groupe TDAH et du groupe Contrôle n'est significativement pas différente (respectivement 9,5±1,9 ans et 10±2,5 ans). Le groupe de sujets atteints TDAH présente 79% de garçons et 21% de filles ; les témoins présentent 83% de garçons et 17% de filles (Tableau 12). Les résultats des bilans neuropsychologiques évaluant l'efficace intellectuelle (WISC) et des fonctions attentionnelles et exécutives sont présentés dans l'annexe 19.

Tableau 12 : Caractéristiques des patients

Caractéristiques	TDAH	témoins	p
Age (années) : moyenne ± écart type	9,5 ± 1,9	10 ± 2,5	ns
Nombre de garçons (%)	23 (79%)	25 (83%)	
Nombre de filles (%)	6 (21%)	5 (17%)	
Ratio fille-garçon	3,8	5	

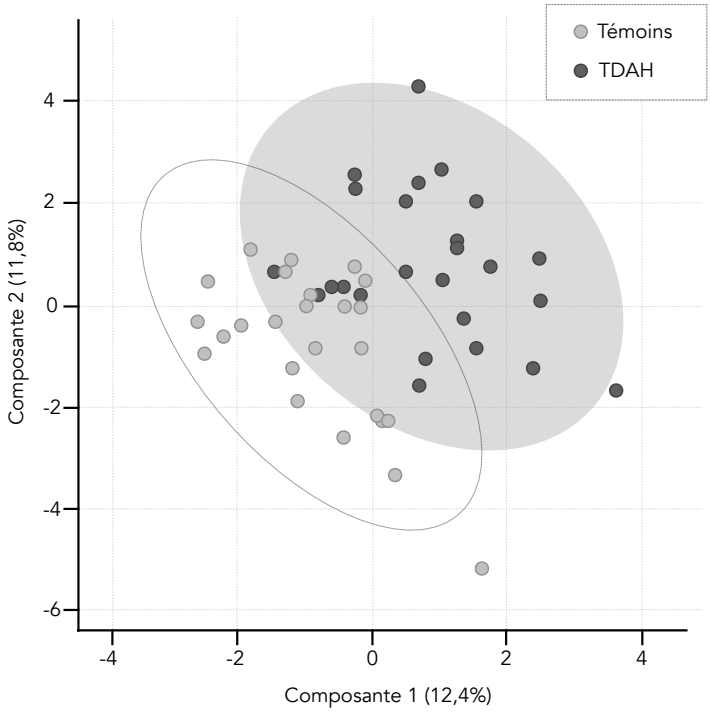
V.3.b - Les patients atteints de TDAH peuvent être discriminés du groupe Contrôle à l'aide de leur métabolome sanguin et urinaire.

V.3.b1 - Métabolome sanguin

A partir des échantillons sanguins, le modèle PLS-DA sépare les patients atteints de TDAH des patients témoins avec une bonne performance (Précision = 78% ; R2 = 68% ; Q2 = 11%, p = 0,01) (Figure 32). Ce modèle permet de déterminer 28 métabolites VIP. Parmi ces 28 métabolites VIP, 1 métabolite, le 4-hydroxy-phénylpyruvate, présente une différence significative entre les patients atteints de TDAH et les témoins. De plus, 2 autres métabolites sont significativement différents entre les deux groupes : l'hypoxanthine et le citramalate mais ne sont pas des métabolites VIP.

Au total, nous avons sélectionné 30 métabolites d'intérêt, comprenant les métabolites VIP et les métabolites significativement différents. Parmi ces 30 métabolites d'intérêt, 18 ont un niveau plus élevé chez les TDAH par rapport aux témoins et 12 ont un niveau plus faible chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins (Tableau 13). Plus précisément, le diaminopimelate, l'acétamido-déoxy-glucosylamine, l'hydroxbutyrate, l'hydroxy-phénylpyruvate, l'acide 3-uréidopropionique, l'adénosine, le benzyl alcohol, le citramalate, la créatinine, le glycocholate, l'asparagine, la sérine, le malate, le n-acétyl-alanine, le n-acétyl-méthionine, le cinnamate, la trigonelline et la xanthine présentent un niveau plus élevé chez les TDAH par rapport aux témoins contrairement à l'allantoïne, la bétaïne, la choline, la citrulline, l'homosérine, l'hypoxanthine, l'alanine, la carnitine, la kynurénine, la valine, le lumichrome et la n-acétyl-phénylalanine.

A partir de ces 30 métabolites sélectionnés, l'analyse de voies métaboliques a permis de mettre en avant 2 voies métaboliques significatives altérées : le métabolisme de la glycine et celui du pantothénate (Tableau 14).



Précision	R2	Q2	Permutation	Nombre VIP
0,72	0,68	0,11	0,01	28

Figure 32 : Carte de similarités (« Score Plot ») après une analyse discriminante par PLS-DA pour la matrice sanguine.

Les patients atteints de TDAH sont représentés par les points noirs (●), les patients témoins sont représentés par les points gris (●). La précision du modèle est de 0,72 ; la valeur de R2 est de 0,68 indiquant que 68% de la variance des données est expliquée par ce modèle ; la valeur du Q2 est de 0,11 indiquant que la capacité prédictive est de 11%; la valeur de permutation p est significative indiquant que le modèle est robuste. Le nombre de variables importantes pour la prédiction (VIP) est de 28.

Tableau 13 : Liste des métabolites VIP du modèle sanguin, leur probabilité p ainsi que le sens de variation dans le groupe TDAH

	Score VIP	p	Sens de variation dans le groupe TDAH
Créatinine	1,7436		↓
4-Hydroxyphénylpyruvate	1,3617	0,042912	↑
2-acétamido-deoxy glucosylamine	1,3571		↓
bétaïne	1,2782		↓
valine	1,2782		↓
homosérine	1,155		↑
asparagine	1,1207		↑
acide 3-uréidopropionique	1,1201		↑
glycocholate	1,0869		↑
n-alpha-acétyllysine	1,0726		↑
lumichrome	0,99683		↑
sérine	0,99201		↑
diaminopimelate	0,96816		↓
adenosine	0,96572		↓
citrulline	0,95139		↑
choline	0,93879		↑
cinnamate	0,92884		↑
kynurénine	0,90626		↑
allantoïne	0,83728		↓
trigonelline	0,79719		↓
n-acetyl-phénylalanine	0,75682		↓
xanthine	0,71632		↑
n-acétyl-méthionine	0,68423		↑
3-Hydroxybutyrate	0,67909		↑
malate	0,67039		↓
carnitine	0,64295		↑
benzyl alcohol	0,45748		↑
alanine	0,27785		↑
hypoxanthine		0,036217	↓
citramalate		0,042181	↑

Tableau 14 : Voies métaboliques significativement altérées dans le sang chez les patients atteints de TDAH

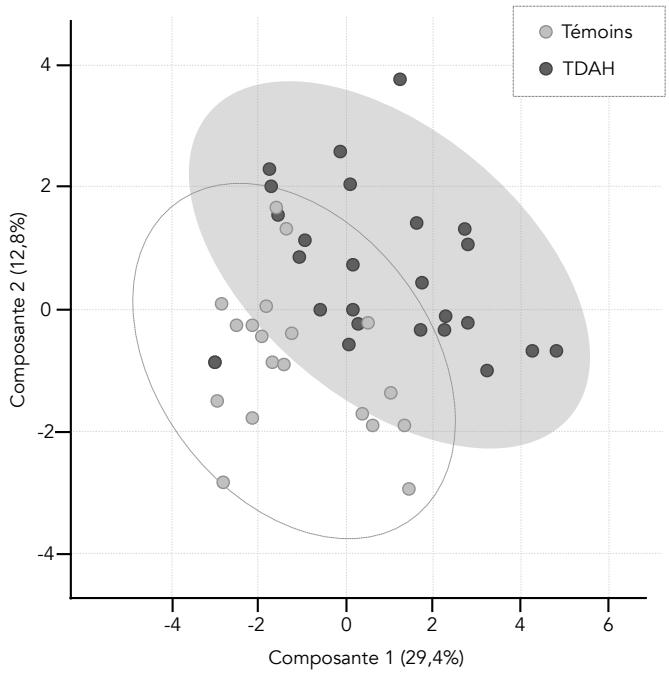
Voies métaboliques	p	Impact	Métabolites
Métabolisme de la glycine, sérine et thréonine	0,002	0,29355	sérine ; choline ; bétaïne ; guanidinoacetate
Métabolisme du pantothénate et du CoA	0,04	0,02857	acide 3-uréidopropionique ; valine

V.3.b2 - Métabolome urinaire

A partir des échantillons urinaires, le modèle PLS-DA discrimine les patients atteints de TDAH non traités des témoins avec une bonne performance (Précision = 85%, R2 = 77%, Q2 = 49%, $p < 0,01$) (Figue 33). Ce modèle permet de déterminer 21 métabolites VIP parmi lesquels 4 présentent une différence statistiquement significative entre les deux groupes (la pyridoxamine, la taurine, l'acide 3-uréidopropionique et la méthyl-cytosine). Parmi ces 21 métabolites VIP, 15 métabolites ont un niveau augmenté dans le groupe TDAH par rapport aux témoins, et 6 métabolites présentent un niveau plus faible dans le groupe TDAH par rapport aux témoins (Tableau 15).

Plus précisément, le dihydrobenzoate, la pyridoxamine, la méthionine, la sérine, l'homosérine, le déoxygalactopyranose, la taurine, le malate, l'acide 3-uréidopropionique, l'hydroxydécanoate, l'arabitol, la méthyl-cytosine, le cinnamate, l'histidine et la cystine ont un niveau plus élevé chez les patients atteints de TDAH que chez les témoins contrairement à l'asparagine, l'hydroxy-phénylacetate, le lactate, le leukotriene B4, le n-acétyl neuraminate et l'indoxyl-sulfate.

L'analyse des voies métaboliques à partir de ces 21 métabolites a permis de montrer 6 voies métaboliques significatives et ayant un impact non nul. Les métabolismes de la vitamine B6, du pantothénate, des pyrimidines, de la ß-alanine et de la taurine sont significativement différents dans les urines entre les patients atteints de TDAH et les patients témoins (Tableau 16).



Précision	R2	Q2	Permutation	Nombre VIP
0,85	0,77	0,48	< 0,01	21

Figure 33 : Carte de similarités (« Score Plot ») après une analyse discriminante par PLS-DA.
Les patients atteints de TDAH sont représentés par les points noirs (●), les patients témoins sont représentés par les points gris (●). La précision du modèle est de 0,85, la valeur de R2 est de 0,77 indiquant que 77% de la variance des données est expliquée par ce modèle ; la valeur du Q2 est de 0,48 indiquant que la capacité prédictive est de 48% ; la valeur de permutation p est significative indiquant que le modèle est robuste. Le nombre de variables importantes pour la prédiction (VIP) est de 21.

Tableau 15 : Liste des métabolites VIP du modèle urinaire, leur probabilité p ainsi que le sens de variation dans le groupe TDAH

	VIP Score	p	Sens de variation dans le groupe TDAH
pyridoxamine	1,4624	0,017321	↑
asparagine	1,3638	0,027167	↑
acide 3-uréidopropionique	1,3638	0,027168	↑
taurine	1,2353	0,046577	↑
sérine	1,1681		↑
gentisate	1,1496		↑
histidine	1,0893		↑
lactate	1,0515		↓
homosérine	1,0388		↑
déoxygalactopyranose	0,95044		↑
méthylcytosine	0,94756		↑
cystine	0,93868		↑
hydroxyphenylacétate	0,85338		↑
malate	0,85206		↓
hydroxydécanoate	0,82599		↓
cinnamate	0,76322		↓
arabitol	0,74032		↑
n-acétyl-neuraminate	0,68677		↑
leukotriène B4	0,68425		↓
méthionine	0,65938		↑
indoxyl sulfate	0,48374		↓

Tableau 16 : Voies métaboliques significativement altérées chez les patients atteints de TDAH

Voies métaboliques	p	Impact	Métabolites
Métabolisme de la vitamine B6	0,017321	0,07843	pyridoxamine
Métabolisme du pantothénate et du CoA	0,027168	0,02857	acide 3-uréidopropionique
Métabolismes des pyrimidines	0,027168	0,01318	acide 3-uréidopropionique
Métabolisme de la ß-alanine	0,031118	0,10448	acide 3-uréidopropionique ; histidine
Métabolisme de la taurine	0,046577	0,42857	taurine

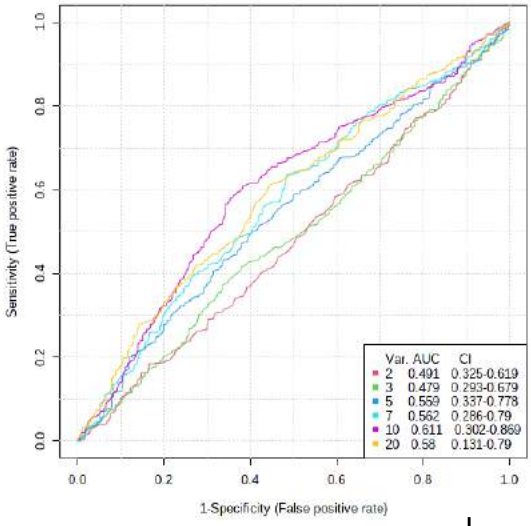
V.3.c - Prédictions

Afin de déterminer si les biomarqueurs identifiés dans le groupe atteint de TDAH avaient une valeur prédictive du diagnostic, des modèles ont été élaborés à l'aide de 80% des patients de la cohorte et une tentative de validation de ces différents modèles a été réalisée à partir des 20% restants. Cette étape est répétée 5 fois, avec des compositions aléatoires des cohortes expérimentales et des cohortes de validation. Toutes ces étapes permettent de calculer la Se, la Sp ainsi que la VPP et la VPN des biomarqueurs sélectionnés.

Dans le sang, la Se moyenne des 5 modèles est de 0,2 et la Sp moyenne est de 0,15. La VPP moyenne est de 0,146 et la VPN moyenne est de 0,266 (Figure 34).

Dans les urines, la sensibilité moyenne est de 0,55 et la spécificité de 0,35. La valeur prédictive positive moyenne est de 0,47 et la valeur prédictive négative est de 0,404 (Figure 35).

Exemple 1 : Cohorte expérimentale et cohorte de validation



Nom	Probabilité	Groupe Prédit	Groupe réel	Erreur
C1	0.50813	Contrôle	Contrôle	✓
C15	0.5423	TDAH naïfs	Contrôle	✘
C20	0.52043	TDAH naïfs	Contrôle	✘
C26	0.51894	TDAH naïfs	Contrôle	✘
T-18	0.51335	Contrôle	TDAH naïfs	✘
T-21	0.52626	Contrôle	TDAH naïfs	✘
T-26	0.5355	TDAH naïfs	TDAH naïfs	✓
T-29	0.51718	TDAH naïfs	TDAH naïfs	✓

3 faux positifs
2 faux négatifs

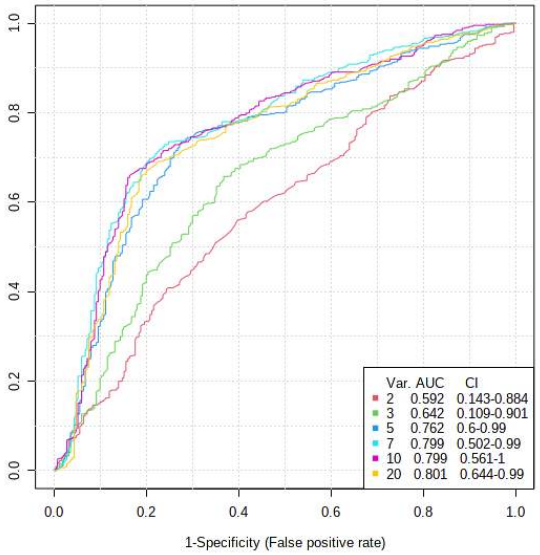
x5 essais

Calcule moyenne
Se ; Sp ; VPP ; VPN

	Se	Sp	VPP	VPN
Essai 1	0,5	0	0,33	0
Essai 2	0	0	0	0
Essai 3	0,5	0,25	0,4	0,33
Essai 4	0	0,25	0	0,5
Essai 5	0	0,25	0	0,5
Moyenne	**0,2**	**0,15**	**0,146**	**0,266**

Figure 34 : Exemple de prédiction du TDAH dans une cohorte indépendante de validation à partir du profil du métabolome sanguin des patients de la cohorte expérimentale.
A gauche, la courbe ROC est obtenue à partir d'un modèle PLS-DA basé sur les métabolites VIP de la cohorte expérimentale. A droite, le tableau liste les patients de la cohorte de validation avec leur groupe prédit et leur groupe réel. En bas, le tableau des performances de 5 essais de prédictions indépendantes déterminées par les 4 critères de performances suivants : la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), les valeurs prédictives positives (VPP) et les valeurs prédictives négatives (VPN).

Exemple 1 : Cohorte expérimentale et cohorte de validation



Nom	Probabilité	Groupe Prédit	Groupe réel	
C18	0.90456	Contrôle	Contrôle	✓
C13	0.70024	Contrôle	Contrôle	✓
C15	0.84232	Contrôle	Contrôle	✓
C23	0.84158	TDAH naïfs	Contrôle	✘
T-22	0.87356	TDAH naïfs	TDAH naïfs	✓
T-24	0.57408	Contrôle	TDAH naïfs	✘
T-17	0.67688	Contrôle	TDAH naïfs	✘
T-19	0.68448	TDAH naïfs	TDAH naïfs	✓

1 faux positif
2 faux négatifs

x5 essais

Calcule moyenne
Se ; Sp ; VPP ; VPN

	Se	Sp	VPP	VPN
Essai 1	0,5	0	0,33	0
Essai 2	0,5	0,75	0,67	0,6
Essai 3	0,75	0,5	0,6	0,67
Essai 4	0,75	0,25	0,5	0,5
Essai 5	0,25	0,25	0,25	0,25
Moyenne	**0,55**	**0,35**	**0,47**	**0,404**

Figure 35 : Exemple de prédiction du TDAH dans une cohorte indépendante de validation à partir du profil du métabolome urinaire des patients de la cohorte expérimentale.
A gauche, la courbe ROC est obtenue à partir d'un modèle PLS-DA basé sur les métabolites VIP de la cohorte expérimentale. A droite, le tableau liste les patients de la cohorte de validation avec leur groupe prédit et leur groupe réel. En bas, le tableau des performances de 5 essais de prédictions indépendantes déterminées par les 4 critères de performances suivants : la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), les valeurs prédictives positives (VPP) et les valeurs prédictives négatives (VPN).

V.4 - Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'il est possible de discriminer les patients atteints de TDAH de sujets témoins sur la base de leurs métabolomes sanguin et urinaire. La discrimination entre ces deux groupes est très importante car elle permet de répondre à un réel besoin clinique d'améliorer le diagnostic à l'aide de biomarqueurs fiables. Il est important de rappeler que les témoins sont des enfants vus pour des symptômes évocateurs de TDAH mais chez qui, à la suite de tests neuropsychologiques objectifs normés, ce diagnostic n'a pas confirmé.

Cette étude métabolomique est la première étude à caractériser simultanément le métabolome sanguin et urinaire de patients atteints de TDAH. En effet, à l'heure actuelle, une seule étude clinique a analysé spécifiquement le métabolome sanguin de patients atteints de TDAH (Wang et al., 2020), une autre s'est intéressée au métabolome sanguin de patients présentant une addiction aux jeux vidéo en les comparant à des patients atteints de TDAH et à des témoins. Enfin une dernière étude a spécifiquement analysé uniquement 3 métabolites urinaires chez des sujets atteints de TDAH (Moriarty et al., 2011).

V.4.a - Métabolome sanguin

Dans nos conditions expérimentales, le métabolome sanguin permet de discriminer les patients atteints de TDAH des témoins. Le métabolisme de la glycine est modifié chez les patients atteints de TDAH et en particulier la choline et la bétaïne qui ont tous les deux des niveaux plus faibles chez les patients atteints de TDAH comparés aux témoins. La bétaïne permet de convertir l'homocystéine en méthionine qui joue un rôle d'antioxydant (Lebrun et al., 2018). L'étude préclinique que nous avons réalisée a permis de suggérer une augmentation du stress oxydant chez les rats modèles de TDAH à la fois dans le cerveau mais aussi en périphérie. Un plus faible niveau de choline et de bétaïne pourrait refléter une défaillance des mécanismes de lutte contre le stress oxydant comme observé par différentes études cliniques dans le TDAH (Bulut et al., 2007; Guney et al., 2015; Corona 2020).
Le métabolisme du pantothénate et de la synthèse de CoA est aussi modifié dans le sang des patients atteints de TDAH avec une augmentation du niveau d'acide 3-uréidopropionique. Ce métabolisme est également modifié dans le sang et dans le cerveau des rats SHR/NCrl. L'acide 3-uréidopropionique est un intermédiaire de la dégradation de l'uracile en ß-alanine. Notre analyse ne permet pas de distinguer l'alanine de la ß-alanine. L'alanine, tout comme l'acide 3-uréidopropionique, présente un niveau plus élevé dans le sang des patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. Les taux d'acide 3-uréidopropionique sont principalement étudiés dans le contexte d'une déficience de l'enzyme ß-uréidopropionase (Moolenaar et al., 2001). Cette déficience se caractérise par un taux élevé d'acide 3-uréidopropionique dans les urines, le plasma ou encore le LCR et phénotypiquement par un retard de développement sévère ainsi que par des mouvements dystoniques (Sakamoto et al., 2001). Ces symptômes ne sont pas retrouvés dans le TDAH et, à ce jour, aucune étude ne relie le taux d'acide 3-uréidopropionique au TDAH. Cette étude suggère que ce métabolisme et principalement l'acide 3-uréidopropionique pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du TDAH et être possiblement utilisé comme biomarqueur.

D'autres métabolites sanguins discriminants chez les patients atteints de TDAH ont aussi été retrouvés dans l'étude préclinique. Ainsi, la carnitine, impliquée dans le transport des acides gras pour produire de l'énergie, présente un niveau plus faible dans le sang des patients atteints de TDAH. D'après les théories neuroénergétiques énoncées par Sergeant et Russell (Russell et al., 2006; Killeen et al., 2012; Killeen et al., 2013). Ce résultat suggère une possible altération du métabolisme énergétique chez ces patients. Dans la mesure où la carnitine peut passer la BHE à l'aide des transporteurs OCTN2 (Kou et al., 2018), un plus

faible niveau de carnitine dans le sang des patients atteints de TDAH pourrait refléter une altération du métabolisme énergétique cérébral. De plus, des études de supplémentation en carnitine ou en acyl-carnitine ont déjà été réalisées dans le TDAH et montrent des effets positifs sur les comportements impulsifs et sur l'attention (Adriani et al., 2004). Ces données renforcent l'hypothèse d'un dysfonctionnement énergétique dans le TDAH (Killeen et al., 2012; Killeen et al., 2013).

De même, le malate, un métabolite du cycle de Krebs, présente un niveau plus élevé dans le sang des patients atteints de TDAH, suggérant une possible dérégulation de ce système qui permet la synthèse d'acétyl-CoA pour alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, l'hydroxybutyrate, un corps cétonique, présente, lui aussi, un niveau plus élevé dans le sang des patients atteints de TDAH. Les corps cétoniques et plus particulièrement l'hydroxybutyrate peuvent être utilisés comme source d'énergie alternative par le cerveau. Par exemple, pendant un jeûne et une baisse des ressources en glucose, le cerveau peut ainsi utiliser l'hydroxybutyrate comme source d'énergie. Il existe des transporteurs de ce métabolite sur la BHE, et une fois dans le cerveau il peut être transformé en acétoacétate puis transformé en acétyl-CoA (Achanta and Rae 2017). Il est intéressant de noter que chez le chien, un régime cétogène, régime riche en graisses et très pauvre en glucide, entraine une amélioration des fonctions attentionnelles ainsi que des effets anxiolytiques (Packer et al., 2016). Chez le rat, une carence en acides gras polyinsaturés (PUFA) entraine des difficultés d'apprentissage et des baisses de motivations (Chalon et al., 2001). Dans le cas du TDAH, des études montrent une diminution plasmatique des PUFA suggérant leur rôle dans la physiopathologie du TDAH (Stevens et al., 1995; Stevens et al., 1996; Burgess et al., 2000).

Les résultats de cette étude concernant la carnitine, le malate ou encore l'hydroxybutyrate sont en faveur de l'hypothèse neuroénergétique du TDAH. Ces résultats convergent tous vers un dysfonctionnement du métabolisme énergétique, observé ici dans le sang, mais susceptible de refléter également un état anormal de ce métabolisme dans le cerveau et qui pourrait ensuite rendre compte des symptômes du TDAH.

L'hypoxanthine et la xanthine sont des métabolites discriminants dans le sang des patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. Le caractère discriminant de l'hypoxanthine a déjà été retrouvée dans une autre étude portant sur le plasma de patients atteints de TDAH (Wang et al., 2020). L'hypoxanthine et la xanthine appartiennent à la classe des purines, intermédiaires dans le métabolisme de l'adénosine et dans la formation des acides nucléiques. L'hypoxanthine peut être formée à partir de l'inosine monophosphate à l'aide de l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGprt) (Hladnik et al., 2008).

Les mutations du gène HGprt rendent l'enzyme inefficace et sont à l'origine du syndrome de Lesch-Nyhan (LNS) (Harris 2018). Le LNS est une pathologie liée à l'X touchant majoritairement les garçons. Le taux d'enzyme HGprt est lié à la sévérité des symptômes. Selon le niveau enzymatique, il peut y avoir des déficits cognitifs ainsi qu'une déficience intellectuelle (Harris 2018). Dans cette pathologie, un faible taux d'hypoxanthine consécutif à l'anomalie enzymatique est en lien avec des troubles cognitifs. Notre étude montre un taux plus faible d'hypoxanthine dans le sang des patients atteints de TDAH. Par analogie avec le cas du LNS, on pourrait évoquer un lien entre les taux faibles d'hypoxanthine et les troubles cognitifs observés dans le TDAH.

L'hypoxanthine sera, quant à elle, convertie en xanthine puis en acide urique sous l'action de radicaux libres environnants et donc reliée au métabolisme du stress oxydant.

Dans notre étude, les patients atteints de TDAH ont un niveau de xanthine plus élevée que les témoins suggérant une implication de cette dernière dans la physiopathologie. Ce métabolite pourrait faire partie d'un panel de biomarqueurs du TDAH et pourrait renforcer l'hypothèse d'une modification du stress oxydant chez les patients atteints de TDAH (Bulut et al., 2007; Guney et al., 2015; Corona 2020).

V.4.b - Le métabolome urinaire

Le métabolome urinaire permet lui aussi de discriminer les patients atteints de TDAH des sujets témoins. Tout comme dans la matrice sanguine, le métabolisme du pantothénate et du CoA ainsi que la voie métabolique de la ß-alanine sont significativement différents dans les urines entre les patients atteints de TDAH et les témoins. Tout comme dans les urines, l'acide 3-uréidopropionique présente un niveau augmenté dans le sang des patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. Comme dit précédemment, ce métabolite n'est pas étudié dans le TDAH. Mais le fait qu'il présente un taux augmenté à la fois dans le sang et les urines des patients atteints de TDAH renforce l'idée qu'il pourrait être utilisé comme biomarqueur de ce trouble.

Une modification du métabolisme de la vitamine B6 avec l'augmentation urinaire du niveau de pyridoxamine a été observée chez les patients atteints de TDAH par rapport aux témoins. La pyridoxamine, précurseur de la vitamine B6, et ses dérivés sont des co-facteurs enzymatiques important pour la synthèse de plusieurs neurotransmetteurs comme le GABA, le glutamate et les monoamines (Kennedy 2016). L'étude préclinique a montré un plus faible niveau de pyridoxamine dans le cerveau des rats SHR/NCrl par rapport aux rats témoins. Des études cliniques montrent une diminution du taux de pyridoxine urinaire, autre précurseur de la vitamine B6, dans le TDAH (Dolina et al., 2014; Joseph et al., 2015) suggérant une altération du métabolisme de cette vitamine. Nos résultats montrent une augmentation du niveau de pyridoxamine, ce qui n'est pas en accord avec la littérature mais ce résultat renforce l'idée d'un dysfonctionnement de ce métabolisme chez les patients atteints de TDAH et reste à approfondir avec une étude de plus large ampleur.

La taurine est produite par le foie et les reins mais elle est retrouvée dans une grande partie des tissus du corps humain comme le cerveau, le coeur, le placenta ou encore dans la rétine (Jakaria et al., 2019). Elle joue un rôle majeur dans plusieurs mécanismes biologiques comme le développement cérébral, la reproduction, la stabilisation des membranes ou encore l'inflammation (Jakaria et al., 2019). La taurine a été étudiée comme potentiel « médicament » grâce à ses effets anti-oxydant et anti-inflammatoire, notamment dans le cerveau. Elle semble jouer en effet un rôle protecteur contre la toxicité dans différentes pathologies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson, d'Alzheimer et de Huntington (Jakaria et al., 2019). Dans notre étude, les patients atteints de TDAH présentent une augmentation urinaire de taurine par rapport aux témoins. La taurine a aussi un rôle

néphroprotecteur. En effet, l'administration de taurine dans un modèle de rats hypertendus diminue l'excrétion urinaire de protéines. L'excrétion urinaire de la taurine peut aussi être modulé en fonction du régime alimentaire. Un régime végétarien entraine une diminution de l'excrétion urinaire de taurine à l'inverse d'un régime riche en viande et crustacés (Jakaria et al., 2019). Une étude préclinique a montré qu'une administration cérébrale à haute dose de taurine pourrait avoir des effets bénéfiques sur le comportement hyperactif des rats TDAH (Chen et al., 2018; Chen et al., 2019). L'implication de la taurine dans la physiopathologie du TDAH reste à déterminer, mais ce métabolite pourrait s'avérer un bon candidat comme biomarqueur de ce trouble.

V.4.c - Limites de l'étude

Cette étude est une étude préliminaire montrant qu'il est possible de discriminer les patients atteints de TDAH à l'aide de leur métabolome sanguin et urinaire.
Dans cette étude, la matrice urinaire semble être meilleure que la matrice sanguine pour discriminer les patients. La même observation a été faite dans l'étude préclinique avec une meilleure discrimination des rats SHR/NCrl des animaux témoins à partir du métabolome urinaire et un meilleur recouvrement entre le métabolome urinaire et le métabolome cérébral. Plusieurs études analysent le métabolome urinaire dans le cadre de pathologies neuropsychiatriques telles que les troubles du spectre autistique, la dépression ou encore la schizophrénie (Yang et al., 2013; Dieme et al., 2015; Xie et al., 2020). La matrice urinaire regroupe des métabolites en fin de parcours métabolique alors que la matrice sanguine comporte une multitude de métabolites intermédiaires. A ceci s'ajoute l'avantage de la matrice urinaire qui est facile à collecter de manière rapide et non invasive en clinique par rapport au sang ou au liquide céphalo-rachidien.
L'effectif de la cohorte de cette étude n'a pas permis d'identifier des biomarqueurs prédictifs du TDAH mais montre qu'il est possible de déterminer des différences métaboliques entre les patients et le groupe contrôle.

V.4.d - Conclusion

Cette étude a permis d'identifier plusieurs voies métaboliques potentiellement impliquées dans la physiopathologie du TDAH. Le métabolome sanguin des patients atteints de TDAH présente des différences du métabolisme du pantothénate, de la glycine, ainsi que des modifications du métabolisme énergétique et du stress oxydant avec la carnitine. D'après nos études précliniques, la carnitine semble être un métabolite d'intérêt dans la physiopathologie du TDAH et est retrouvée comme potentiel biomarqueur dans cette étude. Le métabolome urinaire des patients atteints de TDAH présente aussi des différences des métabolismes du pantothénate, de la vitamine B6 et de la taurine. Ces données innovantes pourraient permettre d'explorer de nouvelles pistes de recherche afin de mieux comprendre la physiopathologie de ce trouble du neurodéveloppement. Cette étude n'a pas permis d'identifier des biomarqueurs prédictifs du TDAH en raison du trop faible effectif de patients. Mais cette étude cible de potentiels biomarqueurs comme l'acide 3-uréidopropionique retrouvé à la fois dans le sang et les urines. D'autres métabolites comme la carnitine, la bétaïne ou encore l'hypoxanthine dans le sang et la taurine dans les urines semblent être des métabolites intéressants comme potentiels biomarqueurs.

L'étude clinique et les études précliniques ont été réalisées simultanément. Compte tenu des résultats obtenus à la fois en préclinique et en clinique, il serait intéressant d'aller étudier plus spécifiquement les métabolisme d'intérêt tels que le métabolisme énergétique, du stress oxydant ou encore des neurotransmetteurs. Au vu de la complexité du diagnostic et de la physiopathologie, une combinaison de tous ces marqueurs métaboliques pourraient faire parti d'une signature métabolique spécifique du TDAH.

Conclusion générale

Ce travail de thèse comporte deux approches transversales : une approche préclinique ayant pour objectif d'améliorer les connaissances de la physiopathologie du TDAH et une approche clinique ayant pour objectif de déterminer des biomarqueurs de ce trouble. La métabolomique est une technologie permettant d'analyser l'ensemble des métabolites d'un échantillon et est donc particulièrement indiquée dans ce travail.

Encore aujourd'hui, les causes de ce trouble restent mal connues et sa physiopathologie n'est pas totalement élucidée. L'approche préclinique a comme objectif principal d'apporter de nouvelles pistes quant à l'implication de différentes voies métaboliques dans le TDAH. Disposer de modèles animaux bien caractérisés permet d'avoir accès aux compartiments central et périphériques afin de mieux comprendre la physiopathologie d'un trouble.
Pour cela, une première étude a permis d'étudier le métabolome cérébral global et de régions cérébrales spécifiques de rats modèle de TDAH. Cette étude montre des modifications de plusieurs voies métaboliques, qui convergent toutes vers l'implication du métabolisme énergétique, du stress oxydant et des systèmes de neurotransmission. Dans le TDAH, plusieurs hypothèses ont été émises concernant le métabolisme énergétique. Issue du modèle cognitivo-énergétique de Sergeant, la théorie neuro-énergétique comportementale est une théorie expliquant le ralentissement et les fluctuations du fonctionnement attentionnel caractéristiques du TDAH (Sergeant 2005; Killeen et al., 2013).De même que pour le métabolisme énergétique, l'étude du métabolome du cerveau global suggérait une augmentation du stress oxydant. L'étude du métabolome des régions cérébrales impliquées dans le TDAH montre, elle aussi, une modification du métabolisme du stress oxydant. De plus, la physiopathologie du TDAH a été associé à une augmentation du stress oxydant et de la neuroinflammation (Corona 2020).
Une étude plus précise des systèmes de neurotransmission a été réalisée. L'importance de la dopamine dans ce trouble a largement été étudiée mais peu d'études s'intéressent à d'autres neurotransmetteurs comme la sérotonine ou encore l'acétylcholine. Cette étude a mis en évidence l'implication de plusieurs neurotransmetteurs dans le modèle animal de TDAH en relation avec les symptômes observés dans la pathologie. Enfin cette étude a permis de montrer que le striatum représente un point central dans la physiopathologie du TDAH.

L'étude préclinique a également permis de définir dans quelle mesure les altérations cérébrales observées sont retrouvées en périphérie. Cette étude a montré que ces rats présentent un métabolome cérébral différent de celui des animaux témoins. Mais cette étude montre surtout qu'il est possible d'observer des modifications cérébrales dans le sang ou les urines de ces animaux. Cette observation est importante dans l'étude de pathologies neuropsychiatriques afin d'identifier des biomarqueurs périphériques comme l'accès aux échantillons cérébraux n'est pas possible. Plusieurs études métabolomiques se sont déjà intéressées à l'identification de biomarqueurs dans différentes pathologies cérébrales comme le risque d'accident vasculaire cérébral (Vojinovic et al., 2020), la maladie d'Alzheimer (Costa et al., 2020), la maladie de Parkinson (Hatano et al., 2016), l'épilepsie (Wu et al., 2017) ou encore les troubles du spectre autistique ((Needham et al., 2021)). A notre connaissance, aucune étude métabolomique n'a été réalisée dans le but d'identifier des biomarqueurs du TDAH. Notre étude n'a pas permis d'identifier des biomarqueurs prédictifs du TDAH en raison d'un trop faible effectif et de l'hétérogénéité observée en clinique. Mais c'est une première étude préliminaire qui montre qu'il est possible de discriminer les patients atteints de TDAH de patients non atteints de TDAH. De plus, cette étude identifie des modifications de voies métaboliques en lien avec le métabolisme énergétique et du stress oxydant dans le sang des patients atteints de TDAH par rapport aux sujets contrôles. Cette étude a permis d'identifier de potentiels biomarqueurs comme l'acide 3-uréidopropionique dans le sang et les urines, la carnitine, l'hypoxanthine et la bétaïne dans le sang et enfin, la taurine dans les urines des patients atteints de TDAH. Des études sur une cohorte plus importante seront nécessaires pour confirmer ces résultats afin de proposer un panel de biomarqueurs prédictifs du TDAH pour le diagnostic.

Mieux connaitre la physiopathologie d'une maladie permet de développer de nouveaux outils pour diagnostiquer de manière plus rapide et plus précoce et de générer de nouvelles thérapies, plus ciblées et plus efficaces. La métabolomique est une technologie puissante qui permet d'analyser plusieurs types de matrices d'un même individu, à l'aide de plusieurs plateforme pour obtenir le maximum d'informations métaboliques, en faisant des études non ciblées et sans a priori pour émettre de nouvelles hypothèses ou réaliser des études ciblées pour répondre à une question précise. La métabolomique est un outils très intéressant dans la recherche des mécanismes physiopathologiques de maladies neuropsychiatriques, et notamment dans le TDAH, ou encore pour la recherche de biomarqueurs diagnostics ou prédictifs d'une réponse à un traitement.

Annexe

Annexe 1 : Principales comorbidités associées au TDAH

Comorbidités	Eléments cliniques à considérer
Troubles de l'humeur	
Dépression majeure	Traiter le trouble le plus contraignant en premier. Une dépression modérée à sévère doit être traitée en premier et le risque de suicide doit être évalué dans tous les cas. Des stimulants peuvent être combinés avec la majorité des antidépresseurs, à surveiller lors du suivi. Aussi considérer TCC. Chez les adultes, le bupropion et la désipramine peuvent réduire les symptômes du TDAH, mais ont une efficacité significativement plus faible que les psychostimulants.
Trouble bipolaire	Traiter le trouble bipolaire en premier. Le traitement du TDAH peut être offert une fois le trouble bipo- laire stabilisé. Référer à un spécialiste.
Troubles anxieux	
Trouble d'anxiété généralisée Trouble panique Phobie sociale TOC Syndrome de stress post-traumatique	Traiter le trouble le plus contraignant en premier. Certains patients peuvent présenter une aggravation de l'anxiété et d'autres une amélioration de leurs symptômes. Les traitements du TDAH peuvent être moins tolérés chez certains individus de ce groupe. Observer les interactions pharmacologiques possibles avec des médicaments métabolisés par le système CYT2D6. Débuter avec une faible dose, augmenter lentement, mais titrer jusqu'à la dose thérapeutique. Si non toléré, changer pour un autre médica- ment, comme l'atomoxétine. Considérer la TCC. Dans les cas de réponse partielle aux stimulants et que l'atomoxétine en monothérapie n'est pas suffisamment efficace, considérer référer en spécialité pour une co-thérapie (combinaison de stimulant avec un non-stimulant).
Troubles du spectre de l'autisme (TSA)	Le traitement du TDAH peut être moins toléré par certains individus de cette population. Commencer doucement, aller lentement, mais titrer jusqu'à la dose thérapeutique. S'il y a intolérance, changer de médicament. Référer à un spécialiste pour des interventions spécifiques pour le TSA.
Troubles psychotiques	Traiter le trouble psychotique en premier. (Référer à un spécialiste: le traitement du TDAH peut déclench- er une rechute psychotique chez un patient prédisposé). Les patients stables qui sont en rémission peu- vent bénéficier d'un traitement pour le TDAH.
Trouble d'opposition et Trouble des conduites	Traiter les deux troubles. Le trouble d'opposition nécessite des interventions psychosociales. Les cas modérés à sévères peuvent nécessiter une combinaison de psychostimulants avec un agoniste du récepteur adrénergique alpha 2 tel que la clonidine ou la guanfacine. Le trouble de conduite nécessite des interventions psychosociales et peut avoir des répercussions auplan juridique. Le traitement pharmacologique du TDAH peut aider à mieux contrôler les comportements impulsifs. La littérature scientifique cite certains cas où l'ajout d'un antipsychotique a amélioré les symp- tômes du trouble de conduite.

Trouble de personnalité limite	Le fait de réduire l'impulsivité et d'augmenter l'attention par le traitement du TDAH combiné avec un trouble de la personnalité peut aider ces patients à mieux participer à leurs traitements psychologiques.
Troubles psychiatriques	
Trouble de personnalité anti- sociale	Le traitement des patients avec TPA + TDAH nécessite des interventions plus complexes et détaillées.
Conditions médicales	
Épilepsie	Traiter l'épilepsie en premier, puis le TDAH. De nouvelles crises doivent être traitées avec des médicaments antiépileptiques. Le taux de médicaments antiépileptiques peut augmenter avec le méthylphénidate dû à l'inhibition enzymatique 245.
Tics	Les médicaments pour le TDAH ne causent pas de tics, mais certains peuvent augmenter ou réduire les tics. Cependant, la présence de tics n'est pas une contre-indication pour les médicaments pour le TDAH. L'atomoxétine, la clonidine et la guanfacine ont démontré des résultats prometteurs chez cette population. L'ajout d'antipsychotiques peut être nécessaire pour les cas sévères.
Troubles du sommeil	Traiter le trouble primaire en premier. Les psychostimulants peuvent réduire la somnolence résiduelle et améliorer le fonctionnement quotidien de l'apnée du sommeil et de la narcolepsie avec ou sans TDAH.
Troubles cardiovasculaires	Effectuer un examen physique avant de commencer le traitement (TA et auscultation cardiaque). ECG et consultations cardiaques si antécédents cardiaques significatifs ou maladie cardiaque structurelle. Mesurer TA et surveiller les signes vitaux et les effets secondaires cardiaques lors du traitement.
Obésité	Discuter les habitudes d'une saine alimentation et de sommeil; augmenter l'exercice physique. Le traitement du TDAH peut améliorer la volonté du patient à mettre en œuvre des changements dans son mode de vie.
Autres troubles	
Troubles d'apprentissage	Traiter les troubles spécifiques d'apprentissage.Le traitement du TDAH peut augmenter l'attention permettant l'amélioration de l'apprentissage des habiletés. Des accommodements scolaires devraient être envisagés et proposés selon le besoin.
Troubles du langage	Traiter les troubles spécifiques de langage. Référer à un éducateur spécialisé, psychologue et/ou orthoph- oniste pour des interventions spécifiques.
Trouble de la coordination du développement	Traiter le trouble de la coordination. Référer à un ergothérapeute et/ou physiothérapeute pour des interventions spécifiques.
Faible QI / QI élevé	Traiter le TDAH et adapter les approches non pharmacologiques selon le niveau de QI du patient. Traiter le TDAH et adapter le curriculum selon le niveau de QI de l'enfant.

source : CADDRA 2020

Annexe 2 : Echelle de Conner's - questionnaire destiné aux parents

Echelle d'évaluation CONNERS 3 pour le parent

Nom et prénom de l'enfant : _____ **Sexe :** M F (encerclez)

Date de naissance : _____/_____/_____ **Âge :** _____ **Classe :** _____

Identification du parent : père ❒ mère ❒ autre ❒ (précisez : _____)

Nom et prénom du parent : _____

Date du jour : _____/_____/_____

Consignes :

Voici des choses que des parents peuvent dire de leurs enfants. Parlez-nous de votre enfant, de comment il/elle a été au cours du **dernier mois**. Lisez attentivement chaque item et notez ensuite à quel point il décrit bien votre enfant ou ce qui s'est passé au cours du **dernier mois**.

0 = Dans le dernier mois, ceci n'est **pas du tout vrai** pour mon enfant. Ceci n'est jamais (ou rarement) arrivé.
1 = Dans le dernier mois, ceci est **un petit peu vrai** pour mon enfant. Ceci est arrivé quelque fois.
2 = Dans le dernier mois, ceci est **assez vrai** pour mon enfant. Ceci est arrivé souvent (ou assez souvent).
3 = Dans le dernier mois, ceci est **très vrai** pour mon enfant. Ceci est arrivé très souvent (très fréquemment).

Encerclez seulement une réponse pour chaque item. C'est important de répondre à tous les items.

Donnez la meilleure réponse possible pour les items que vous jugez difficiles.

Dans le dernier mois, ceci…	**0 = n'est pas du tout vrai (jamais, rarement)** **1 = est un petit peu vrai (quelque fois)**	**2 = est assez vrai (souvent, assez souvent)** **3 = est très vrai (très souvent, très fréquemment)**			
1.	Est heureux(se), joyeux(se) et a une attitude positive.	0	1	2	3
2.	Oublie durant ses activités quotidiennes.	0	1	2	3
3.	Parle trop.	0	1	2	3
4.	S'inquiète de beaucoup de choses.	0	1	2	3
5.	Son orthographe est de mauvaise qualité.	0	1	2	3
6.	Il/elle sèche des cours (absent de l'école sans autorisation).	0	1	2	3
7.	Ne comprend pas ce qu'il/elle lit.	0	1	2	3
8.	Il est agréable d'être avec lui/elle.	0	1	2	3
9.	Mémorise bien les faits.	0	1	2	3
10.	N'est pas invité/e à jouer ou à sortir avec les autres.	0	1	2	3
11.	A forcé quelqu'un à avoir des activités sexuelles.	0	1	2	3
12.	A de la difficulté à demeurer concentré/e sur une chose à la fois.	0	1	2	3
13.	N'a pas d'amis/es.	0	1	2	3
14.	Se met en colère.	0	1	2	3
15.	Oublie des choses déjà apprises.	0	1	2	3
16.	Intimide, menace ou fait peur aux autres.	0	1	2	3
17.	Se sent sans valeur.	0	1	2	3
18.	Je ne peux pas comprendre ce qui le/la rend heureux/se.	0	1	2	3
19.	A la bougeotte (gigote).	0	1	2	3

20.	A de la difficulté à contrôler ses inquiétudes.	0	1	2	3
21.	Blâme les autres pour ses erreurs ou ses mauvais comportements.	0	1	2	3
22.	Est sans cœur et cruel/le.	0	1	2	3
23.	A une brève capacité d'attention.	0	1	2	3
24.	A de la difficulté à garder ses amis/es.	0	1	2	3
25.	Pleure souvent et facilement.	0	1	2	3
26.	Ne peut pas faire les choses correctement.	0	1	2	3
27.	Se sert d'une arme (par exemple, un bâton, une brique, une bouteille brisée, un couteau ou une arme à feu).	0	1	2	3
28.	Evite ou n'aime pas les choses qui demandent beaucoup d'efforts et qui ne sont pas amusantes.	0	1	2	3
29.	Son humeur change rapidement et de manière radicale.	0	1	2	3
30.	Initie délibérément des batailles avec les autres.	0	1	2	3
31.	Fait des erreurs.	0	1	2	3
32.	Il est difficile de lui plaire ou de l'amuser.	0	1	2	3
33.	Dit la vérité, ne dit même pas de petits mensonges.	0	1	2	3
34.	Ne termine pas ce qu'il/elle commence.	0	1	2	3
35.	Ne semble pas écouter ce qui lui est dit.	0	1	2	3
36.	A de la difficulté en lecture.	0	1	2	3
37.	A de la difficulté à débuter des tâches ou des projets.	0	1	2	3
38.	Doit travailler très fort pour compléter les tâches difficiles.	0	1	2	3
39.	Blesse physiquement les gens.	0	1	2	3
40.	Il faut répondre à ses demandes immédiatement : est facilement frustré.	0	1	2	3
41.	Est cruel/le envers les animaux.	0	1	2	3
42.	Il est difficile de le/la motiver (même avec des friandises ou de l'argent).	0	1	2	3
43.	Donne la réponse avant la fin de la question.	0	1	2	3
44.	A de la difficulté à se concentrer.	0	1	2	3
45.	Bouge constamment.	0	1	2	3
46.	Ment pour blesser les gens.	0	1	2	3
47.	Ne porte pas attention aux détails, fait des fautes d'inattention.	0	1	2	3
48.	Est en colère et éprouve du ressentiment.	0	1	2	3
49.	A de la difficulté à passer d'une activité à une autre.	0	1	2	3
50.	Excitable, impulsif/ve.	0	1	2	3
51.	A besoin d'explications supplémentaires sur les consignes.	0	1	2	3
52.	Devient surstimulé/e.	0	1	2	3
53.	Apprend les informations de manière séparée ; ne saisit pas la vue d'ensemble.	0	1	2	3
54.	Agit comme s'il/si elle était animé/e par un moteur.	0	1	2	3
55.	Dit la première chose qui lui vient à l'esprit.	0	1	2	3
56.	Ment afin d'éviter de faire certaines choses ou afin d'obtenir les choses qu'il/elle veut.	0	1	2	3
57.	Essaie de se venger.	0	1	2	3
58.	Vole en cachette (par exemple, vol à l'étalage ou falsification).	0	1	2	3
59.	Embête ou ennuie délibérément les autres.	0	1	2	3
60.	Lit lentement et avec beaucoup d'efforts.	0	1	2	3
61.	A de la difficulté à attendre son tour.	0	1	2	3
62.	Est parmi les derniers à être choisi par une équipe ou pour un jeu.	0	1	2	3
63.	Complète ses projets à la dernière minute.	0	1	2	3
64.	Interagit bien avec les autres enfants.	0	1	2	3
65.	Endommage ou détruit volontairement les choses des autres.	0	1	2	3
66.	Semble fatigué/e, a peu d'énergie.	0	1	2	3
67.	Inattentif/ve, facilement distrait/e.	0	1	2	3
68.	Ne suit pas les consignes (même lorsqu'il/elle les comprend et essaie de coopérer).	0	1	2	3
69.	Court ou grimpe quand il/elle ne devrait pas le faire.	0	1	2	3
70.	Semble « sur les nerfs », nerveux/se, tendu/e.	0	1	2	3
71.	Est bruyant/e lors des jeux et des temps libres.	0	1	2	3
72.	Planifie bien les choses.	0	1	2	3
73.	Est irritable et facilement embêté/e par les autres.	0	1	2	3
74.	Se comporte comme un ange.	0	1	2	3
75.	Oublie de remettre ses travaux complétés.	0	1	2	3
76.	S'enfuit de la maison pour au moins une nuit (fugue).	0	1	2	3
77.	S'ennuie.	0	1	2	3
78.	A délibérément mis le feu afin de causer des dommages.	0	1	2	3

79. Ne complète pas ses travaux scolaires ou ses tâches (même lorsqu'il/elle les comprend et qu'il/elle essaie de coopérer).	0	1	2	3
80. Est patient/e et satisfait/e même lorsqu'il/elle attend longtemps.	0	1	2	3
81. A des crises de colère.	0	1	2	3
82. N'a plus de plaisir ou d'intérêt pour les activités.	0	1	2	3
83. Menace de blesser les autres.	0	1	2	3
84. A de la difficulté à organiser des tâches ou des activités.	0	1	2	3
85. Dérange les autres enfants.	0	1	2	3
86. Jure ou utilise un langage inapproprié.	0	1	2	3
87. N'arrive pas à saisir l'arithmétique.	0	1	2	3
88. Abandonne facilement les tâches difficiles.	0	1	2	3
89. Est déjà entré/e par effraction dans la maison, l'édifice ou la voiture de quelqu'un.	0	1	2	3
90. Est désordonné/e et désorganisé/e.	0	1	2	3
91. Sort tard le soir, même si c'est contre les règles.	0	1	2	3
92. Ne sait pas comment se faire des amis/es.	0	1	2	3
93. Quitte son siège lorsqu'il/elle devrait rester assis/e.	0	1	2	3
94. Refuse activement de faire ce que les adultes lui demandent.	0	1	2	3
95. A de la difficulté à demeurer concentré/e sur un travail ou un jeu pour une longue période de temps.	0	1	2	3
96. Vole en confrontant quelqu'un (par exemple, agression, vol de sac à main ou vol à main armée).	0	1	2	3
97. Perd des choses (par exemple, des travaux scolaires, des crayons, des livres, des outils ou des jouets).	0	1	2	3
98. Gigote ou se tortille sur son siège.	0	1	2	3
99. Agité/e ou hyperactif/ve.	0	1	2	3
100. Devient irritable lorsqu'anxieux/se.	0	1	2	3
101. Est facilement distrait/e par ce qu'il/elle voit ou entend.	0	1	2	3
102. S'obstine avec les adultes.	0	1	2	3
103. Est triste, morose ou irritable durant plusieurs journées consécutives.	0	1	2	3
104. Interrompt les autres (par exemple, leurs conversations ou leurs jeux).	0	1	2	3
105. Est parfait/e en tout point.	0	1	2	3

Pensez à vos réponses jusqu'à maintenant et ensuite répondez aux trois items suivants :

106. Les problèmes de votre enfant affectent gravement ses travaux scolaires ou ses notes.	0	1	2	3
107. Les problèmes de votre enfant affectent gravement ses amitiés ou ses relations.	0	1	2	3
108. Les problèmes de votre enfant affectent gravement votre vie familiale.	0	1	2	3

Questions additionnelles :

109. Avez-vous d'autres préoccupations au sujet de votre enfant ?

_____

_____

_____

_____

110. Quelles sont les forces ou les habiletés de votre enfant ?

_____

_____

_____

_____

Annexe 3 : ADHD-IV Rating Scale (ADHD RS)

Les 18 items de l'ADHD-RS sont cotés sur une échelle de 4 points :

- 0 : Rarement ou jamais
- 1 : Quelques fois
- 2 : Souvent
- 3 : Très souvent

Le clinicien doit prendre en compte dans son évaluation :

- la fréquence du comportement
- le niveau de gêne due au comportement
- le niveau développemental

Il peut être utile de garder les trois tableaux suivants sous les yeux pendant l'entretien clinique.

Cotation des items de l'ADHD-RS selon la fréquence du comportement			
0 = NON Rarement ou Jamais	**1 = LÉGER Quelques fois**	**2 = MODÉRÉ Souvent**	**3 = INTENSE Très souvent**
Rarement observé ou rapporté	- Certains jours - Certains moments - Demande une légère surveillance	- La plupart des jours - La plupart du temps - Les « bons » jours sont occasionnels - Nécessite plus qu'une surveillance moyenne	- Tous les jours - Presque tout le temps - Nécessite une surveillance « continue »

Cotation des items de l'ADHD-RS selon la fréquence du comportement			
0 = NON Rarement ou Jamais	1 = LÉGER Quelques fois	2 = MODÉRÉ Souvent	3 = INTENSE Très souvent
Aucune gêne fonctionnelle	- Gêne légère à modérée - Pire dans certaines situations - L'adulte en charge de l'enfant peut gérer cette charge - Effet minimal sur la qualité de vie	- Gêne modérée dans presque toutes les situations - Retentissement significatif sur l'adulte en charge de l'enfant - Retentissement sur la qualité de vie de la famille - L'intervention directe d'un membre de la famille donne quelques résultats	- Gêne importante dans toutes les situations - Retentissement significatif sur tous les membres de la famille - Diminution importante de la qualité de vie de la famille - L'intervention de la famille n'a aucun effet

Cotation des items de l'ADHD-RS selon le niveau de développement			
0 = NON Rarement ou Jamais	1 = LÉGER Quelques fois	2 = MODÉRÉ Souvent	3 = INTENSE Très souvent
Pas de différence avec les enfants du même âge	- Un peu différent des autres enfants - Des questions sont posées mais pas d'évitement actif des autres	- Nettement différent des autres enfants - Évitement de la part des pairs ou d'adultes	- Très différent des autres enfants - Les enfants et/ou les adultes (proches) préfèrent éviter

Comment interpréter les items d'inattention (items pairs) de l'ADHD-RS ?
1. Etourderies S'intéresser au travail qui est en-deçà du niveau de compétence de l'enfant. Un enfant qui ne vérifie pas ses réponses. Le travail est peu soigné ou fait de manière précipitée (par exemple, ne tourne pas la page d'énoncés, laisse tomber des exercices, met ses jouets dans la bonne pièce sans vraiment les ranger, etc.)
3. Difficultés de concentration Durée d'attention limitée lorsqu'on lui demande d'écouter. Le niveau est bon au début mais l'ennui le gagne. S'évade en pensée, rêvasse. La pensée dérive sans distracteur externe. Difficulté à se concentrer ou à maintenir sa concentration.
5. N'écoute pas L'enfant ne répond pas (verbalement ou autrement) ou ne montre aucune réaction lorsqu'on s'adresse à lui directement. Il peut n'y avoir aucun contact visuel ou acquiescement du chef. Les adultes demandent s'il a entendu ce qu'ils viennent de lui dire. IL NE S'AGIT PAS D'UNE OPPOSITION.
7. Ne suit pas les instructions Ne peut terminer les choses qu'avec une soutien rapproché sinon il abandonne en route. Laisse inachevé de nombreux projets. Du mal à revenir sur une tâche après une interruption. Du mal à aller au bout des choses mais à la demande des autres.
9. Difficultés d'oragnisation Ne peut pas faire les choses dans le temps imparti parce qu'il les fait dans le désordre (par ex. se préparer pour le coucher). Systématiquement en retard. Ne peut organiser les priorités. Malpropre ou désorganisé. Ne peut pas organiser des projets complexes.
11. Évite l'effort mental L'enfant est réticent voire refuse de commencer des tâches ou des activités difficiles ou longues. Il procrastine. Il faut beaucoup insister pour qu'il commence ; il se plaindra, argumentera ou pleurnichera. Évite activement les tâches ménagères ou les activités en flânant ou en quittant la pièce.
13. Égare des choses L'enfant ne sait où se trouvent les choses. Il cherche en permanence des choses ou demande où sont les crayons, ses jouets, ses gants, ses habits, son travail scolaire (devoirs à faire ou à rendre), etc.
15. Distractible Un stimulus externe (presque n'importe quel son ou bruit) fait dévier l'enfant de l'activité en cours. Il est distrait par des choses peu importantes qui surviennent autour de lui. Du mal à filtrer les stimuli externes.
17. Oublieux L'enfant n'est pas prêt parce qu'il n'a pas emporté, mentionné ou dit quelque chose ; par exemple, il oublie de faire des devoirs ou des tâches quotidiennes (nourrir les animaux familiers ou faire des tâches ménagères), il retourne sur ses pas pour récupérer des objets oubliés, etc.

Comment interpréter les items d'hyperactivités-impulsivité (items impairs) de l'ADHD-RS ?
2. S'agite continuellement L'enfant remue sur son siège. Il ne peut pas rester assis correctement, touche des objets à sa portée, ou fait des choses avec ses mains (tortille une mèche de cheveux, etc.), ou tapote avec les doigts ou bouge les jambes.
4. Se lève sans autorisation A table, à l'école, à l'église, à son bureau pendant les devoirs ou au cinéma, l'enfant ne peut rester longtemps assis. Il se lève sans autorisation ou exprime le besoin de se lever.
6. Court et saute Chez les enfants plus âgés, on parle de nervosité. Les plus jeunes grimpent sur les meubles (sautent par dessus le dossier pour savoir dans un canapé, par exemple) ou dans les arbres, sautillent sur les murets, marchent trop vite ou courent tout le temps.
8. Difficultés pour rester calme L'enfant fait des bruits en jouant ou est toujours bruyant. Ne peut regarder une émission silencieusement ; bruyant même dans les moments de détente.
10. « Sur la brèche » L'enfant fait les choses rapidement, il préfère des tâches « actives ». Il est toujours pressé. Il sollicite l'adulte, il est à la recherche quasi-permanente d'activités et exprime son ennui s'il ne trouve pas d'activité suffisamment prenante.
12. Parle trop Parle trop. Les autres ne peuvent pas en place un mot.
14. Répond trop vite L'enfant parle avant que les parents et/ou l'enseignant ait fini de parler. Il veut être le premier à répondre. Il dit des choses sans réfléchir. Dans une situation d'échanges verbaux, l'enfant répond toujours trop vite.
16. Impatient Impatient. L'enfant commence à agir avant que les instructions aient été toutes données. Il ne peut pas supporter d'attendre dans une file d'attente (même dans les parcs d'attraction). Facilement frustré lorsqu'on lui demande d'attendre.
18. Interrompt, dérange, gêne En dehors de tout échange verbal. Par exemple, lorsque l'adulte discute avec quelqu'un ou parle au téléphone l'enfant le tire par le bras, l'interrompt ou le dérange. L'enfant dépasse les limites ou viole l'espace des autres. Il peut faire irruption dans un jeu ou une situation sociale sans être invité.

Annexe 4 : SNAP-IV

Nom : _____ Prénom : _____ Sexe : M ❑ F ❑
Date de naissance : _____ Date de passation : _____ Age : _____
Origine ethnique : Européenne ❑ Asiatique ❑ Africaine ❑ Autre ❑
Rempli par : _____ Lien de parenté : _____
Classe : _____ Effectif de la classe : _____

Cochez la case qui correspond le mieux au comportement de l'enfant.

		Pas du tout	Juste un peu	Nettement	Énormément
1.	Souvent, il/elle lui arrive souvent de ne pas faire attention aux détails ou de faire des erreurs d'étourderie dans son travail scolaire ou ses activités	❑	❑	❑	❑
2.	Il/elle a souvent du mal à maintenir son attention dans ses activités ou ses jeux	❑	❑	❑	❑
3.	Souvent, il/elle ne semble pas écouter quand on lui parle directement	❑	❑	❑	❑
4.	Souvent, il/elle ne suit pas les directives jusqu'au bout et n'arrive pas à terminer son travail de classe, les corvées ménagères ou ses obligations	❑	❑	❑	❑
5.	Il/elle a souvent du mal à organiser ses tâches et ses activités	❑	❑	❑	❑
6.	Souvent, il/elle évite, n'aime pas ou fait à regret les tâches qui demandent un effort mental soutenu	❑	❑	❑	❑
7.	Il/elle perd souvent des choses utiles pour ses activités (par exemple, jouets, consignes scolaires, crayons ou livres)	❑	❑	❑	❑
8.	Il/elle souvent distrait par des stimuli externes	❑	❑	❑	❑
9.	Souvent il/elle oublie des choses dans les activités de la vie quotidienne	❑	❑	❑	❑
10.	Il/elle a souvent des difficultés pour maintenir sa vigilance, réagir aux demandes ou suivre les directives	❑	❑	❑	❑
11.	Il/elle remue souvent les mains ou les pieds, ou se tortille sur son siège	❑	❑	❑	❑
12.	Il/elle se lève souvent de son siège en classe ou dans d'autres situations où il/elle devrait rester assis	❑	❑	❑	❑
13.	Souvent, il/elle court ou grimpe de manière excessive dans des situations où cela n'est pas approprié	❑	❑	❑	❑
14.	Souvent, il/elle a des difficultés à jouer ou se livrer à des activités de loisir tranquillement	❑	❑	❑	❑
15.	Il/elle est souvent « sur la brèche » ou agit souvent comme s'il/elle était actionné par un moteur	❑	❑	❑	❑
16.	Il/elle parle souvent de manière excessive	❑	❑	❑	❑
17.	Il/elle laisse échapper souvent les réponses avant que les questions soient posées entièrement	❑	❑	❑	❑
18.	Il/elle a souvent du mal à attendre son tour	❑	❑	❑	❑
19.	Il/elle interrompt souvent les autres ou les dérange (par exemple, intervient dans les discussions ou les jeux)	❑	❑	❑	❑
20.	Il/elle a souvent du mal à rester assis tranquille, à rester silencieux, ou à freiner des impulsions dans la salle de classe ou à la maison	❑	❑	❑	❑
21.	Il/elle se met en colère souvent	❑	❑	❑	❑
22.	Souvent, il/elle argumente avec les adultes	❑	❑	❑	❑
23.	Souvent il/elle met volontairement les adultes au défi ou repousse les demandes des adultes ou les règles	❑	❑	❑	❑
24.	Souvent il/elle fait délibérément des choses qui contrarient les autres	❑	❑	❑	❑
25.	Souvent il/elle reproche aux autres ses propres erreurs et/ou mauvaise conduite	❑	❑	❑	❑
26.	Souvent il/elle est susceptible ou facilement contrarié/e par les autres	❑	❑	❑	❑
27.	Il/elle est souvent fâché/e et rancunier/ère	❑	❑	❑	❑
28.	Il/elle est souvent malveillant/e ou vindicatif/ve	❑	❑	❑	❑
29.	Il/elle est souvent querelleur/euse	❑	❑	❑	❑
30.	Il/elle est souvent négatif/ive, provocateur/trice, désobéissant/e, ou hostile vis-à-vis des représentants de l'autorité	❑	❑	❑	❑
31.	Il/elle fait souvent des bruits (par exemple, fredonne ou fait des bruits bizarres)	❑	❑	❑	❑
32.	Il/elle souvent excitable, impulsif	❑	❑	❑	❑
33.	Il/elle crie souvent facilement	❑	❑	❑	❑
34.	Il/elle est souvent peu coopératif	❑	❑	❑	❑
35.	Il fait souvent le malin	❑	❑	❑	❑
36.	Il/elle est souvent agité ou trop actif	❑	❑	❑	❑
37.	Il/elle dérange souvent les autres enfants	❑	❑	❑	❑
38.	Il/elle change souvent d'humeur rapidement et de façon radicale	❑	❑	❑	❑
39.	Il/elle est souvent facilement frustré/e s'il/elle n'obtient pas satisfaction immédiatement	❑	❑	❑	❑

Version française par le Dr Hervé Caci (Nice, France) – Avril 2008

		Pas du tout	Juste un peu	Nettement	Énormément
40.	Il/elle taquine souvent les autres enfants et les gêne dans leurs activités	❑	❑	❑	❑
41.	Il/elle est souvent agressif avec les autres enfants (par exemple, cherche la bagarre ou persécute les autres)	❑	❑	❑	❑
42.	Il/elle détruit souvent le bien d'autrui (par exemple, vandalisme)	❑	❑	❑	❑
43.	Il/elle est souvent fourbe (par exemple, vole, ment, invente des excuses, copie le travail des autres, ou « arnaque » les autres)	❑	❑	❑	❑
44.	Il/elle enfreint souvent et sérieusement les règles (par exemple, école buissonnière, fugue ou ignore totalement les règles de la classe)	❑	❑	❑	❑
45.	Il/elle viole de manière très régulière les droits de base des autres ou les grandes normes sociétales.	❑	❑	❑	❑
46.	Il y a des moments où il/elle n'arrive pas à résister à des impulsions agressives (agresser les autres ou détruire leurs biens)	❑	❑	❑	❑
47.	Il/elle a des tics moteurs ou verbaux : une activité motrice ou verbale soudaine, rapide, récurrente et arythmique.	❑	❑	❑	❑
48.	Il/elle a un comportement moteur répétitif (par exemple, bouges les mains, se balance ou se pince la peau)	❑	❑	❑	❑
49.	Il/elle a des obsessions : des idées, pensées ou impulsions inappropriées, persistantes et intrusives	❑	❑	❑	❑
50.	Il/elle a des compulsions : des comportements ou une activité mentale répétitifs qui visent à réduire l'anxiété ou l'angoisse	❑	❑	❑	❑
51.	Il/elle est souvent agité ou surexcité ou les nerfs à fleur de peau	❑	❑	❑	❑
52.	Il/elle est souvent facilement fatigué/e	❑	❑	❑	❑
53.	Il/elle a souvent du mal à se concentrer (l'esprit vide)	❑	❑	❑	❑
54.	Il/elle est souvent irritable	❑	❑	❑	❑
55.	Il/elle a souvent une tension musculaire	❑	❑	❑	❑
56.	Il/elle a souvent une anxiété ou une inquiétude excessives (par exemple, anticipation anxieuse)	❑	❑	❑	❑
57.	Il/elle a souvent une somnolence diurne (un endormissement involontaire dans des situations inappropriées)	❑	❑	❑	❑
58.	Il/elle est souvent excessivement émotif/émotive et recherche l'attention des autres	❑	❑	❑	❑
59.	Il/elle a souvent besoin d'une admiration indue, un comportement grandiose ou il/elle manque souvent d'empathie	❑	❑	❑	❑
60.	Il/elle a souvent des relations instables avec les autres, une humeur réactive et une impulsivité	❑	❑	❑	❑
61.	Parfois et pendant au moins une semaine, il/elle a une estime de soi exagérée ou des idées de grandeur	❑	❑	❑	❑
62.	Parfois et pendant au moins une semaine, il/elle parle plus que d'habitude ou semble incapable de s'arrêter de parler	❑	❑	❑	❑
63.	Parfois et pendant au moins une semaine, il/elle a des idées qui fusent ou dit que sa pensée sont accélérées	❑	❑	❑	❑
64.	Parfois et pendant au moins une semaine, il/elle a une humeur élevée, expansive ou euphorique	❑	❑	❑	❑
65.	Parfois et pendant au moins une semaine, il/elle s'implique excessivement dans des activités agréables mais risquées	❑	❑	❑	❑
66.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a une humeur dépressive (triste, pessimiste, découragé)	❑	❑	❑	❑
67.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a une humeur irritable ou capricieuse (pas seulement lorsqu'il/elle est frustré/e)	❑	❑	❑	❑
68.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a un intérêt ou un plaisir nettement diminué pour la plupart des activités	❑	❑	❑	❑
69.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a une agitation psychomotrice (plus actif qu'à l'habitude)	❑	❑	❑	❑
70.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a un ralentissement psychomoteur (ralenti/e dans la plupart des activités)	❑	❑	❑	❑
71.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle est fatiguée ou manque d'énergie	❑	❑	❑	❑
72.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a un sentiment de nullité ou une culpabilité excessive et inappropriée	❑	❑	❑	❑
73.	Parfois et pendant au moins deux semaines, il/elle a une capacité diminuée pour penser ou se concentrer	❑	❑	❑	❑
74.	Une faible estime de soi chronique la plupart du temps depuis au moins un an	❑	❑	❑	❑
75.	Une faible concentration ou des difficultés à prendre des décisions la plupart du temps depuis au moins un an	❑	❑	❑	❑

Version française par le Dr Hervé Caci (Nice, France) – Avril 2008

		Pas du tout	Juste un peu	Nettement	Énormément
76.	Des sentiments de désespoir chroniques la plupart du temps depuis au moins un an	❑	❑	❑	❑
77.	Il/elle est constamment hypervigilant/e (excessivement sur ses gardes ou alerte) ou sursaute de manière exagérée	❑	❑	❑	❑
78.	Il/elle est constamment irritable, a des accès de colère, ou a des difficultés de concentration	❑	❑	❑	❑
79.	Il/elle a constamment une réponse émotive au stress (par ex. nervosité, inquiétude, désespoir, larmes)	❑	❑	❑	❑
80.	Il/elle a constamment une réponse comportementale au stress (par ex. bagarres, vandalisme ou école buissonnière)	❑	❑	❑	❑
81.	Il/elle a du mal à démarrer son travail en classe	❑	❑	❑	❑
82.	Il/elle a du mal à rester sur une activité pendant tout un temps scolaire	❑	❑	❑	❑
83.	Il/elle a du mal pour terminer son travail en classe	❑	❑	❑	❑
84.	Il/elle a du mal (exactitude ou propreté) dans les travaux écrits en classe	❑	❑	❑	❑
85.	Il/elle a du mal à participer à une activité en groupe en classe ou à une discussion	❑	❑	❑	❑
86.	Il/elle a du mal à passer d'un sujet à un autre ou d'un temps scolaire à un autre	❑	❑	❑	❑
87.	Il/elle a du mal dans les interactions avec les autres enfants de la classe	❑	❑	❑	❑
88.	Il/elle a du mal dans les interactions avec les adultes (enseignant ou assistant)	❑	❑	❑	❑
89.	Il/elle a du mal à garder le silence dans la classe	❑	❑	❑	❑
90.	Il/elle a du mal à rester assis dans la classe	❑	❑	❑	❑

Version française par le Dr Hervé Caci (Nice, France) – Avril 2008

Annexe 5 : Liste des métabolites détectés dans le cerveau de l'étude préclinique

Métabolites détectés - Cerveau

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CREATINE	INOSINE 5-MONOPHOSPHATE	MANNITOL	TRANS-CINNAMATE
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	CREATININE	INOSINE	METHYL INDOLE-3-ACETATE	TRIGONELLINE
2-DEOXY-D-GLUCOSE	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	ISOCITRIC ACID	MYO-INOSITOL	URACIL-5-CARBOXYLIC ACID
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CYTIDINE	L-ANSERINE	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	URACIL
2,6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	DAMP	L-ARABITOL	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	URIDINE
3-METHYLHISTAMINE	DEOXYCARNITINE	L-ARGININE	N-ACETYL-GLUCOSAMINE	XANTHINE
3-Methylhistidine	EPINEPHRINE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	
3-SULFINO-L-ALANINE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-LYSINE	
3-UREIDOPROPIONATE	ETHYLMALONIC ACID	L-CARNITINE	N-ACETYL-METHIONINE	
4-AMINOBUTANOATE	FERULATE	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-SERINE	
4-GUANIDINOBUTANOATE	GALACTARATE	L-GLUTAMIC ACID	N,N,N-TRIMETHYL-LYSINE	
4-HYDROXY-PHENYLGLYCINE	GLUCONIC ACID	L-GLUTAMINE	N6-(DELTA2-ISOPENTENYL)-ADENINE	
4-HYDROXY-PROLINE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-HISTIDINE	NICOTINAMIDE	
5-AMINOLEVULINIC ACID	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-LYSINE	NICOTINATE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	GLUCOSE	L-METHIONINE	NORADRENALINE	
5-METHYLTHIOADENOSINE	GLUCURONIC ACID	L-ORNITHINE	O-PHOSPHO-SERINE	
5-OXO-L-PROLINE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-PHENYLALANINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	
5,6-DIHYDRO URACIL	GLYCERATE	L-PROLINE	PANTOTHENIC ACID	
ADENINE	GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE	L-SERINE	PHOSPHOCHOLINE	
ADENOSINE-5-DIPHOSPHOGLUCOSE	GLYCEROL 3-PHOSPHATE	L-THREONINE	PTERIN	
ADENOSINE	GLYCEROL MYRISTATE	L-TRYPTOPHAN	PUTRESCINE	
ALLANTOIN	GLYCINE	L-TYROSINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE	
ALPHA-AMINOADIPATE	GUANIDINOACETATE	L-VALINE	PYRIDOXAMINE	
AZELAIC ACID	GUANINE	LACTATE	SPERMIDINE	
BETA-ALANINE	GUANOSINE 5-PHOSPHATE	LAUROYLCARNITINE	SPERMINE	
BETAINE	GUANOSINE	LEUKOTRIENE B4	SUBERIC ACID	
CARNOSINE	HISTAMINE	LUMICHROME	SUCCINATE	
CHOLATE	HOMOCYSTEINE	MALATE	TAURINE	
CHOLINE	HOMOSERINE	MALEIMIDE	THIAMINE MONOPHOSPHATE	
CITRULLINE	HYPOXANTHINE	MALONATE	TRANS-ACONITATE	

Annexe 6 : Liste des métabolites détectés dans le sang de l'étude préclinique

Métabolites détectés - Sang

(2-AMINOETHYL)PHOSPHONATE	5-METHYLCYTOSINE	DEOXYURIDINE	KYNURENICACID	LUMICHROME	SEROTONIN
1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	5-OXO-L-PROLINE	EPINEPHRINE	L-ALANINE	MALATE	SPERMIDINE
10-HYDROXYDECANOATE	5.6-DIHYDROURACIL	ETHANOLAMINEPHOSPHATE	L-ANSERINE	MALONATE	SPERMINE
2-DEOXY-D-GLUCOSE	5'-METHYLTHIOADENOSINE	ETHYLMALONICACID	L-ARGININE	MANNITOL	SPHINGANINE
2-HYDROXYBUTYRICACID	ADIPICACID	FERULATE	L-ASPARAGINE	MELATONIN	SUBERICACID
2.6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	ALLANTOIN	FORMYL-L-METHIONYLPEPTIDE	L-ASPARTATE	METHYLINDOLE-3-ACETATE	SUCCINATE
3-(2-HYDROXYPHENYL)PROPANOATE	ALPHA-AMINOADIPATE	FUMARATE	L-CARNITINE	METHYLJASMONATE	TARTARICACID
3-(4-HYDROXYPHENYL)LACTATE	AZELAICACID	GALACTARATE	L-CYSTEINE	N-ACETYLSEROTONIN	TAURINE
3-AMINO-5-HYDROXYBENZOICACID	BENZYLALCOHOL	GALACTITOL	L-CYSTINE	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	TETRAHYDROXY-PREGNAN-20-ONE
3-DEHYDROSHIKIMATE	BETA-ALANINE	GLUCONICACID	L-GLUTAMICACID	N-ACETYL-GLUTAMICACID	THEOBROMINE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	BETAINE	GLUCOSE1-PHOSPHATE	L-GLUTAMINE	N-ACETYL-L-ASPARTICACID	THEOPHYLLINE
3-HYDROXYBENZOATE	BIOTIN	GLUCOSE	L-HISTIDINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	THYMIDINE
3-HYDROXYPHENYLACETATE	CARNOSINE	GLYCERALDEHYDE3-PDIETHYLACETAL	L-KYNURENINE	N-ACETYL-L-LYSINE	THYMINE
3-METHOXY-4-HYDROXYMANDELATE	CHOLATE	GLYCERATE	L-LYSINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	THYROXINE
3-METHYGLUTARICACID	CHOLINE	GLYCINE	L-METHIONINE	N-ACETYL-METHIONINE	THYROXINE
3-METHYL-2-OXINDOLE	CITRAMALATE	GLYCOCHOLATE	L-NORVALINE	N-ACETYL-SERINE	TRIGONELLINE
3-METHYLHISTAMINE	CITRULLINE	GUANIDINOACETATE	L-ORNITHINE	N-ACETYLGLYCINE	URACIL
3-Methylhistidine	CORTICOSTERONE	GUANINE	L-PHENYLALANINE	N-ACETYLNEURAMINATE	URATE
3-UREIDOPROPIONATE	CORTISOL21-ACETATE	GUANOSINE5'-MONOPHOSPHATE	L-PIPECOLICACID	N-METHYLTRYPTAMINE	URIDINE
4-AMINOBUTANOATE	CREATINE	HIPPURATE	L-PROLINE	N.N.N-TRIMETHYLLYSINE	UROCANATE
4-GUANIDINOBUTANOATE	CREATININE	HISTAMINE	L-SERINE	N6-(DELTA2-ISOPENTENYL)-ADENINE	XANTHINE
4-HYDROXY-D-PROLINE	CYTIDINE	HOMOGENTISATE	L-THREONINE	NICOTINATE	XANTHOSINE
4-HYDROXY-L-PROLINE	CYTOSINE	HOMOSERINE	L-TRYPTOPHAN	OMEGA-HYDROXYDODECANOICACID	
4-METHYL-2-OXO-PENTANOICACID	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	HYPOXANTHINE	L-TYROSINE	PANTOTHENICACID	
4-METHYL-2-OXOVALERICACID	D-GLUCURONICACID	INDOLE-3-ACETALDEHYDE	L-VALINE	PARAXANTHINE	
5-AMINOLEVULINICACID	D-LYXOSE	INDOLE-3-ACETICACID	LACTATE	PHOSPHOCHOLINE	
5-AMINOPENTANOATE	D-SACCHARICACID	INDOLE-3-ETHANOL	LAUROYLCARNITINE	PHOSPHOCREATINE	
5-HYDROXY-L-TRYPTOPHAN	DEOXYCARNITINE	INDOXYLSULFATE	LEUCINEISOLEUCINENORLEUCINE	PYRIDOXAL5'-PHOSPHATE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	DEOXYCHOLATE	INOSINE	LEUCINE	PYRIDOXAMINE	
5-HYDROXYLYSINE	DEOXYCYTIDINE	ISOCITRICACID	LEUKOTRIENEB4	ROSMARINICACID	

Annexe 7 : Liste des métabolites détectés dans les urines de l'étude préclinique

Métabolites détectés - Urine

1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLAT	4-HYDROXYPHENYLACETATE	CITRULLINE	HOMOCYSTEINE	LEUKOTRIENE B4	O-PHOSPHO-L-SERINE
1-HYDROXY-2-NAPHTHOATE	4-IMIDAZOLEACETIC ACID	CREATINE	HOMOGENTISATE	MALATE	O-SUCCINYL-L-HOMOSERINE
1-METHYLADENOSINE	4-METHYL-2-OXO-PENTANOIC ACID	CREATININE	HYPOXANTHINE	MALEIC ACID	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID
1-NAPHTHYLAMINE	4-METHYL-2-OXOVALERIC ACID	CYTIDINE	INDOLE-3-ACETALDEHYDE	MALONATE	OROTATE
1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	4-METHYLCATECHOL	CYTOSINE	INDOLE-3-ACETAMIDE	METHYL JASMONATE	OROTIC ACID
10-HYDROXYDECANOATE	5-AMINOLEVULINIC ACID	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	INDOLE-3-ACETIC ACID	METHYLGUANIDINE	PANTOTHENIC ACID
2-AMINOPHENOL	5-AMINOPENTANOATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	INDOLE-3-ETHANOL	MEVALOLACTONE	PARAXANTHINE
2-DEOXY-D-GLUCOSE	5-HYDROXY-L-TRYPTOPHAN	D-GLUCURONIC ACID	INOSINE	N-ACETYL SEROTONIN	PHENYLACETIC ACID
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	5-HYDROXY-METHYL URACIL	D-LYXOSE	ISOCITRIC ACID	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	PHOSPHOCHOLINE
2-HYDROXYPHENYLACETIC ACID	5-HYDROXYINDOLEACETATE	DEOXYCARNITINE	ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	PHOSPHOCREATINE
2-DEOXYGUANOSINE	5-METHYLCYTOSINE	DEOXYCYTIDINE	KYNURENIC ACID	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	PTERIN
2-DEOXYURIDINE 5-MONO-PHOSPHATE	5-OXO-L-PROLINE	DIETHANOLAMINE	L-ARGININE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	PUTRESCINE
3-(2-HYDROXYPHENYL)PROPANOATE	5-6-DIHYDRO URACIL	DIHYDROOROTATE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	QUINATE
3-(4-HYDROXYPHENYL)LACTATE	5-METHYLTHIOADENOSINE	DIMETHYLBENZIMIDAZOLE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	RIBOFLAVIN
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	ADENINE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	RIBOSE 5-PHOSPHATE
3-HYDROXYBENZOATE	ADENOSINE 2-3-CYCLICPHOSPHATE	ETHYL 3-INDOLEACETATE	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-L-CYSTEINE	STACHYOSE
3-HYDROXYPHENYLACETATE	ADIPIC ACID	ETHYLMALONIC ACID	L-CYSTINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	SUBERIC ACID
3-METHYGLUTARIC ACID	AGMATINE SULFATE	FERULATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYL-L-LYSINE	SUCCINATE
3-METHYL-2-OXINDOLE	ALLANTOIN	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-HISTIDINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	TARTARIC ACID
3-METHYLADENINE	ALPHA-AMINOADIPATE	GALACTARATE	L-HISTIDINOL	N-ACETYL-METHIONINE	TAURINE
3-Methylhistidine	AZELAIC ACID	GLUCONIC ACID	L-LYSINE	N-ACETYL-SERINE	THEOBROMINE
3-SULFINO-L-ALANINE	BENZYL ALCOHOL	GLUCOSAMINATE	L-METHIONINE	N-ACETYLGLYCINE	THEOPHYLLINE
3-UREIDOPROPIONATE	BETA-ALANINE	GLUCOSE	L-NORVALINE	N-ACETYLNEURAMINATE	THYMIDINE 5-MONOPHOSPHATE
3-4-DIHYDROXY-L-PHENYLALANINE	BETAINE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-PHENYLALANINE	N-ACETYLPUTRESCINE	THYMIDINE
4-Acetamidobutanoic acid	BIOTIN	GLYCERATE	L-PIPECOLIC ACID	N-AMIDINO-L-ASPARTATE	TRANS-CYCLOHEXANE-1-2-DIOL
4-AMINOBUTANOATE	CADAVERINE	GUANIDINOACETATE	L-PROLINE	N-FORMYLGLYCINE	TRIGONELLINE
4-COUMARATE	CAFFEATE	GUANINE	L-SERINE	N.N.N-TRIMETHYLLYSINE	TRYPTAMINE
4-GUANIDINOBUTANOATE	CATECHOL	GUANOSINE	L-THREONINE	N6-(DELTA2-ISOPENTENYL)-ADENINE	URACIL
4-HYDROXY-D-PROLINE	CHOLATE	HIPPURATE	L-TYROSINE	NICOTINATE	URATE
4-HYDROXY-L-PROLINE	CITRAMALATE	HISTAMINE	L-VALINE	O-PHOSPHO-DL-SERINE	URIDINE 5-DIPHOSPHOGLUCOSE
					URIDINE
					UROCANATE
					XANTHINE
					XANTHURENIC ACID

Annexe 8 : Liste des métabolites détectés dans les fèces de l'étude préclinique

Métabolites détectés - Feces

1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLAT	4-IMIDAZOLEACETIC ACID	CREATINE	GUANOSINE 5-MONOPHOSPHATE	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	O-SUCCINYL-L-HOMOSERINE
1-METHYLADENOSINE	4-METHYL-2-OXO-PENTANOIC ACID	CREATININE	HIPPURATE	LEUKOTRIENE B4	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID
1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	4-METHYL-2-OXOVALERIC ACID	CYTIDINE	HISTAMINE	LIPOAMIDE	OROTATE
10-HYDROXYDECANOATE	4-METHYLCATECHOL	CYTOSINE	HOMOCYSTINE	LUMICHROME	PANTOTHENIC ACID
2-ACETAMIDO-DEOXY-GLUCOSYLAMINE	5-AMINOLEVULINIC ACID	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	HOMOGENTISATE	MALATE	PARAXANTHINE
2-AMINOPHENOL	5-AMINOPENTANOATE	D-GLUCOSAMINE 6-SULFATE	HOMOSERINE	MALONATE	PTERIN
2-DEOXY-D-GLUCOSE	5-METHYLCYTOSINE	D-GLUCURONIC ACID	HYPOXANTHINE	MALTOSE	PUTRESCINE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	5-OXO-L-PROLINE	D-LYXOSE	INDOLE-3-ETHANOL	MANNITOL	PYRIDOXAMINE
2,6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	5-DEOXYADENOSINE	DEOXYCARNITINE	ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE	METHYL JASMONATE	PYRIDOXINE
2-DEOXYADENOSINE	5-METHYLTHIOADENOSINE	DEOXYCYTIDINE	KYNURENIC ACID	METHYLGUANIDINE	QUINATE
3-(2-HYDROXYPHENYL)PROPANOATE	ADENINE	DEOXYURIDINE	L-ANSERINE	N-ACETYL SEROTONIN	RAFFINOSE
3-(4-HYDROXYPHENYL)LACTATE	ADENOSINE 5-DIPHOSPHORIBOSE	DIETHANOLAMINE	L-ARABITOL	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	RIBOFLAVIN
3-(4-HYDROXYPHENYL)PYRUVATE	ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	DIHYDROXYMANDELIC ACID	L-ARGININE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	S-Adenosylmethionine
3-AMINO-5-HYDROXYBENZOIC ACID	ADENOSINE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	SEROTONIN
3-DEHYDROSHIKIMATE	ADIPIC ACID	ETHYL 3-INDOLEACETATE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	SHIKIMATE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	ALLANTOIN	ETHYLMALONIC ACID	L-CARNITINE	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE
3-HYDROXYBENZOATE	ALPHA-AMINOADIPATE	FERULATE	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE
3-METHYGLUTARIC ACID	Amiloride	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-CYSTEIC ACID	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	STACHYOSE
3-METHYL-2-OXINDOLE	AZELAIC ACID	FUMARATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYL-L-LEUCINE	SUBERIC ACID
3-METHYLADENINE	BETA-ALANINE	GALACTITOL	L-GLUTAMINE	N-ACETYL-L-LYSINE	SUCCINATE
3-METHYLHISTAMINE	BETAINE	GALACTOSAMINE	L-HISTIDINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	TARTARIC ACID
3-Methylhistidine	BIOTIN	GLUCONIC ACID	L-LYSINE	N-ACETYL-METHIONINE	TAURINE
3-NITRO-L-TYROSINE	CADAVERINE	GLUCOSAMINATE	L-METHIONINE SULFOXIMINE	N-ACETYL-SERINE	THEOBROMINE
3-SULFINO-L-ALANINE	CARNOSINE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-METHIONINE	N-ACETYLGLYCINE	THIAMINE PYROPHOSPHATE
3-UREIDOPROPIONATE	CHOLINE	GLUCOSAMINE	L-NORVALINE	N-ACETYLNEURAMINATE	THYMIDINE
3-4-DIHYDROXY-L-PHENYLALANINE	CITRAMALATE	GLUCOSE	L-ORNITHINE	N-ACETYLPUTRESCINE	THYMINE
3-CMP	CITRULLINE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-PHENYLALANINE	N-METHYLTRYPTAMINE	THYROTROPIN RELEASING HORMONE
4-GUANIDINOBUTANOATE	CMP	GLYCERATE	L-PIPECOLIC ACID	NNN-TRIMETHYLLYSINE	TRANS-CYCLOHEXANE-1,2-DIOL
4-HYDROXY-D-PROLINE	CORTICOSTERONE	GLYCINE	L-PROLINE	NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE	TRYPTAMINE
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	CORTISOL 21-ACETATE	GLYCOCHOLATE	L-SERINE	NICOTINAMIDE	URACIL
4-HYDROXY-L-PROLINE	CORTISOL	GUANIDINOACETATE	L-THREONINE	NICOTINATE	URIDINE
4-HYDROXYBENZOATE	CORTISONE	GUANINE	L-TYROSINE	NORADRENALINE	UROCANATE
4-HYDROXYPHENYLACETATE	CREATINE PHOSPHATE	GUANOSINE 3-5-CYCLIC MONOPHOSPHA	L-VALINE	NORADRENALINE	XANTHINE
					XANTHOSINE

Annexe 9 : Liste des métabolites détectés dans le cortex orbito-frontal

Métabolites détectés - Cortex orbito-frontal

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CREATINE	L-ANSERINE	N-ACETYL-L-LYSINE	URACIL
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	CREATINE PHOSPHATE	L-ARGININE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	URATE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	CREATININE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-METHIONINE	URIDINE
2-AMINOPHENOL	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	L-ASPARTATE	N-ACETYLNEURAMINATE	URIDINE-5-MONOPHOSPHATE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CYTIDINE	L-CARNITINE	N-METHYL-L-HISTIDINE	UROCANATE
2-HYDROXYPHENYLACETIC ACID	CYTOSINE	L-GLUTAMIC ACID	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	XANTHINE
3-2-HYDROXYPHENYLPROPANOATE	DEOXYCARNITINE	L-GLUTAMINE	NICOTINAMIDE	
3-4-DIHYDROXYBENZOATE	DIHYDROOROTATE	L-HISTIDINE	O-PHOSPHO-L-SERINE	
3-4-HYDROXYPHENYLLACTATE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-KYNURENINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	
3-METHYGLUTARIC ACID	ETHYLMALONIC ACID	L-LYSINE	OPHTHALMIC ACID	
3-METHYLHISTAMINE	FERULATE	L-METHIONINE	PALMITATE	
3ALPHA-HYDROXY-5BETA-CHOLANATE	GALACTARATE	L-ORNITHINE	PANTOTHENIC ACID	
4-AMINOBUTANOATE	GLUCONIC ACID	L-PHENYLALANINE	PHOSPHOCHOLINE	
4-GUANIDINOBUTANOATE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-PIPECOLIC ACID	PURINE	
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-PROLINE	PYRIDOXAMINE	
4-METHYLCATECHOL	GLUCOSE	L-SERINE	RAC-GLYCEROL 1-MYRISTATE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-THREONINE	RETINOATE	
5-METHYLCYTOSINE	GLYCERATE	L-TRYPTOPHAN	RIBOFLAVIN	
5-METHYLTHIOADENOSINE	GLYCINE	L-TYROSINE	S-5-ADENOSYL-L-METHIONINE	
5-OXO-L-PROLINE	GUANIDINOACETATE	LACTATE	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE	
ADENOSINE 2-3-CYCLICPHOSPHATE	GUANINE	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE	
ADENOSINE 3-5-CYCLIC MONOPHOSPHA	GUANOSINE	LEUKOTRIENE B4	SPERMINE	
ADIPIC ACID	HIPPURATE	MALATE	SPHINGANINE	
ALPHA-AMINOADIPATE	HISTAMINE	MALEIMIDE	SUBERIC ACID	
AZELAIC ACID	HOMOSERINE	MALONATE	SUCCINATE	
CARNOSINE	HOMOVANILLATE	N-ACETYL-ALANINE	TAURINE	
CHOLATE	HYPOXANTHINE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	THEOPHYLLINE	
CHOLINE	INDOLE-3-ACETAMIDE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	THIAMINE MONOPHOSPHATE	
CITRAMALATE	INDOLE-3-ACETIC ACID	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	THIAMINE PYROPHOSPHATE	
CITRULLINE	INDOXYL SULFATE	N-ACETYL-L-CYSTEINE	TRIGONELLINE	
CMP	INOSINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	TRYPTAMINE	

Annexe 10 : Liste des métabolites détectés dans le cortex pré-limbique

Métabolites détectés - Cortex pré-limbique

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CHOLATE	GUANOSINE 3-5-CYCLIC MONOPHOSPHA	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	CHOLINE	GUANOSINE	LEUKOTRIENE B4	PYRIDOXAMINE
10-HYDROXYDECANOATE	CITRULLINE	HIPPURATE	LUMICHROME	RAC-GLYCEROL 1-MYRISTATE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	CMP	HISTAMINE	MALATE	RETINOATE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CREATINE	HOMOSERINE	MALEIMIDE	RIBOFLAVIN
2-HYDROXYPHENYLACETIC ACID	CREATININE	HOMOVANILLATE	MALONATE	S-5-ADENOSYL-L-METHIONINE
3-4-DIHYDROXYBENZOATE	CYTIDINE 2-3-CYCLIC MONO-PHOS-PHAT	HYPOXANTHINE	MANNITOL	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE
3-4-HYDROXYPHENYLLACTATE	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	INDOLE-3-ACETAMIDE	N-ACETYL-ALANINE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	CYTIDINE	INOSINE 5-MONOPHOSPHATE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	SPERMIDINE
3-METHYGLUTARIC ACID	CYTOSINE	INOSINE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	SPHINGANINE
3-METHYLHISTAMINE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	SUBERIC ACID
3ALPHA-HYDROXY-5BETA-CHOLANATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	L-ANSERINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	SUCCINATE
4-AMINOBUTANOATE	DEOXYCARNITINE	L-ARGININE	N-ACETYL-L-CYSTEINE	TAURINE
4-GUANIDINOBUTANOATE	DEOXYCHOLATE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	THIAMINE MONOPHOSPHATE
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	DESMOSTEROL	L-ASPARTATE	N-ACETYL-L-LYSINE	THYMINE
4-METHYL-2-OXOVALERIC ACID	DIHYDROOROTATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	TRANS-ACONITATE
4-METHYLCATECHOL	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYLNEURAMINATE	TRIGONELLINE
5-HYDROXYINDOLEACETATE	ETHYLMALONIC ACID	L-GLUTAMIC ACID	N-METHYL-L-HISTIDINE	TRYPTAMINE
5-METHYLTHIOADENOSINE	FERULATE	L-GLUTAMINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	URACIL
5-OXO-L-PROLINE	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-HISTIDINE	N6-DELTA2-ISOPENTENYL-ADENINE	URIDINE 5-DIPHOSPHOGLUCOSE
ADENINE	GALACTARATE	L-LYSINE	NICOTINAMIDE	URIDINE 5-P2-N-ACETYLGLUCOSAMINE
ADENOSINE 2-3-CYCLICPHOSPHATE	GLUCONIC ACID	L-METHIONINE	NICOTINATE	URIDINE
ADENOSINE 3-5-CYCLIC MONOPHOSPHA	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-ORNITHINE	O-PHOSPHO-L-SERINE	URIDINE-5-MONOPHOSPHATE
ADIPIC ACID	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-PHENYLALANINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	XANTHINE
ALLANTOIN	GLUCOSE	L-PIPECOLIC ACID	OPHTHALMIC ACID	
ALPHA-AMINOADIPATE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-PROLINE	PALMITATE	
AZELAIC ACID	GLYCERATE	L-SERINE	PANTOTHENIC ACID	
BILIVERDIN	GLYCINE	L-THREONINE	PHENETHYLAMINE	
BIOTIN	GUANIDINOACETATE	L-TRYPTOPHAN	PHOSPHOCHOLINE	
CARNOSINE	GUANINE	L-TYROSINE	PURINE	

Annexe 11 : Liste des métabolites détectés dans le cortex moteur 2

Métabolites détectés - Cortex moteur 2

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	D-LYXOSE	L-CARNITINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	D-SACCHARIC ACID	L-CYSTATHIONINE	NICOTINAMIDE
3-METHYLADENINE	DEOXYCARNITINE	L-GLUTAMIC ACID	NICOTINATE
3-METHYLHISTAMINE	DIHYDROOROTATE	L-GLUTAMINE	NORADRENALINE
3-Methylhistidine	DIMETHYLBENZIMIDAZOLE	L-HISTIDINE	O-PHOSPHO-DL-SERINE
3-UREIDOPROPIONATE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-LYSINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID
4-AMINOBUTANOATE	ETHYL 3-INDOLEACETATE	L-METHIONINE	OROTATE
4-GUANIDINOBUTANOATE	FERULATE	L-ORNITHINE	PALMITATE
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	GALACTARATE	L-PHENYLALANINE	PANTOTHENIC ACID
5-6-DIHYDRO URACIL	GLUCONIC ACID	L-PIPECOLIC ACID	PHOSPHOCHOLINE
5-HYDROXYINDOLEACETATE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-PROLINE	PHOSPHOCREATINE
5-METHYLCYTOSINE	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-SERINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE
5-METHYLTHIOADENOSINE	GLUCOSE	L-THREONINE	PYRIDOXAMINE
5-OXO-L-PROLINE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-TRYPTOPHAN	PYRIDOXINE
ADENINE	GLYCINE	LACTATE	S-Adenosylmethionine
ALPHA-AMINOADIPATE	GUANIDINOACETATE	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE
BIOTIN	GUANINE	LEUKOTRIENE B4	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE
CARNOSINE	GUANOSINE 5-MONOPHOSPHATE	LIPOAMIDE	SPERMIDINE
CHOLINE	GUANOSINE	MALEIMIDE	SPERMINE
CITRAMALATE	HIPPURATE	MYO-INOSITOL	SUCCINATE
CITRULLINE	HISTAMINE	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	TETRAHYDROXY-PREGNAN-20-ONE
CMP	HOMOCYSTEINE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	THEOPHYLLINE
CREATINE	HYPOXANTHINE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	THIAMINE MONOPHOSPHATE
CREATINE PHOSPHATE	INOSINE 5-MONOPHOSPHATE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	THYMIDINE 5-MONOPHOSPHATE
CREATININE	INOSINE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	TRANS-ACONITATE
CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-L-LYSINE	TRIGONELLINE
CYTIDINE	L-ANSERINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	URACIL
CYTOSINE	L-ARGININE	N-ACETYL-METHIONINE	URIDINE 5-DIPHOSPHOGLUCOSE
D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-SERINE	UROCANATE
D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	L-ASPARTATE	N-ACETYLNEURAMINATE	XANTHINE

Annexe 12 : Liste des métabolites détectés dans le cortex pariétal

Métabolites détectés - Cortex pariétal

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CYTOSINE	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-SERINE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYLNEURAMINATE
2-DEOXYCYTIDINE 5-MONOPHOSPHATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	L-GLUTAMINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	D-LYXOSE	L-HISTIDINE	N6-DELTA2-ISOPENTENYL-ADENINE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	DEOXYCARNITINE	L-LYSINE	NICOTINAMIDE
3-METHYGLUTARIC ACID	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-METHIONINE	NICOTINATE
3-METHYLHISTAMINE	ETHYL 3-INDOLEACETATE	L-ORNITHINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID
3-UREIDOPROPIONATE	FUMARATE	L-PHENYLALANINE	PANTOTHENIC ACID
4-AMINOBUTANOATE	GALACTITOL	L-PIPECOLIC ACID	PHOSPHOCHOLINE
4-GUANIDINOBUTANOATE	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-PROLINE	PHOSPHOCREATINE
5-6-DIHYDRO URACIL	GLUCOSE	L-SERINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE
5-HYDROXYINDOLEACETATE	GLYCERATE	L-THREONINE	RIBOFLAVIN
5-METHYLTHIOADENOSINE	GLYCINE	L-TRYPTOPHAN	RIBOSE 5-PHOSPHATE
5-OXO-L-PROLINE	GUANIDINOACETATE	L-TYROSINE	S-Adenosylmethionine
ADENINE	GUANINE	LACTATE	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE
ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	GUANOSINE 5-MONOPHOSPHATE	LAUROYLCARNITINE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE
ADIPIC ACID	GUANOSINE	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	SPERMINE
ALLANTOIN	HIPPURATE	MALATE	SUBERIC ACID
ALPHA-AMINOADIPATE	HOMOGENTISATE	MALEIMIDE	SUCCINATE
AZELAIC ACID	HOMOSERINE	MALONATE	TAURINE
CARNOSINE	HYPOXANTHINE	MANNITOL	TETRAHYDROXY-PREGNAN-20-ONE
CHOLINE	INDOXYL SULFATE	METHYL JASMONATE	THIAMINE MONOPHOSPHATE
CITRAMALATE	INOSINE	MYO-INOSITOL	THYMIDINE
CITRULLINE	ISOCITRIC ACID	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	TRIGONELLINE
CMP	L-ANSERINE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	URACIL
CREATINE	L-ARABITOL	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	URIDINE 5-MONOPHOSPHATE
CREATINE PHOSPHATE	L-ARGININE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	URIDINE
CREATININE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-L-LYSINE	URIDINE-5-MONOPHOSPHATE
CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	UROCANATE
CYTIDINE	L-CARNITINE	N-ACETYL-METHIONINE	XANTHINE
			XANTHOSINE

Annexe 13 : Liste des métabolites détectés dans le striatum dorsal

Métabolites détectés - Striatum dorsal

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CHOLINE	GUANOSINE	LACTATE	PHENETHYLAMINE
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	CITRAMALATE	HISTAMINE	LEUCINE	PHOSPHOCHOLINE
10-HYDROXYDECANOATE	CITRULLINE	HOMOGENTISATE	LEUKOTRIENE B4	PURINE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	CMP	HOMOSERINE	LUMICHROME	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CREATINE	HOMOVANILLATE	MALATE	PYRIDOXAMINE
3-4-DIHYDROXYBENZOATE	CREATINE PHOSPHATE	HYPOXANTHINE	MALEIMIDE	RAC-GLYCEROL 1-MYRISTATE
3-4-HYDROXYPHENYLLACTATE	CREATININE	INDOLE-3-ACETAMIDE	MALONATE	RETINOATE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	CYTIDINE 2-3-CYCLIC MONO-PHOS-PHAT	INOSINE	MANNITOL	RIBOFLAVIN
3-METHYGLUTARIC ACID	CYTIDINE	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-ALANINE	S-5-ADENOSYL-L-METHIONINE
3-METHYLHISTAMINE	CYTOSINE	L-ANSERINE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE
3-SULFINO-L-ALANINE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-ARGININE	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE
3ALPHA-HYDROXY-5BETA-CHOLANATE	D-SACCHARIC ACID	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	SPERMIDINE
4-AMINOBUTANOATE	DEOXYCARNITINE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	SPERMINE
4-GUANIDINOBUTANOATE	DEOXYCHOLATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	SPHINGANINE
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	DESMOSTEROL	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-L-CYSTEINE	SUBERIC ACID
4-METHYL-2-OXO-PENTANOIC ACID	DOPAMINE	L-CYSTEIC ACID	N-ACETYL-L-LEUCINE	SUCCINATE
4-METHYLCATECHOL	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYL-L-LYSINE	TAURINE
5-HYDROXYINDOLEACETATE	ETHYLMALONIC ACID	L-GLUTAMINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	THIAMINE MONOPHOSPHATE
5-METHYLCYTOSINE	FERULATE	L-HISTIDINE	N-ACETYL-METHIONINE	THYMIDINE
5-METHYLTHIOADENOSINE	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-KYNURENINE	N-ACETYLNEURAMINATE	THYMINE
5-OXO-L-PROLINE	GALACTARATE	L-LYSINE	N-METHYL-L-HISTIDINE	TRANS-ACONITATE
ADENINE	GLUCONIC ACID	L-METHIONINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	TRIGONELLINE
ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-ORNITHINE	N6-DELTA2-ISOPENTENYL-ADENINE	URACIL
ADIPIC ACID	GLUCOSE	L-PHENYLALANINE	NICOTINAMIDE	URIDINE
ALLANTOIN	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-PIPECOLIC ACID	NICOTINATE	UROCANATE
ALPHA-AMINOADIPATE	GLYCERATE	L-PROLINE	O-PHOSPHO-L-SERINE	XANTHINE
AZELAIC ACID	GLYCINE	L-SERINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	
BIOTIN	GUANIDINOACETATE	L-THREONINE	OROTATE	
CARNOSINE	GUANINE	L-TRYPTOPHAN	PALMITATE	
CHOLATE	GUANOSINE 3-5-CYCLIC MONOPHOSPHA	L-TYROSINE	PANTOTHENIC ACID	

Annexe 14 : Liste des métabolites détectés dans le striatum ventral

Métabolites détectés - Striatum ventral

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	ADENINE	FUMARATE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-L-LYSINE	SUCCINATE
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	GALACTARATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	TAURINE
10-HYDROXYDECANOATE	ADENOSINE	GLUCONIC ACID	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-METHIONINE	THIAMINE PYROPHOSPHATE
2-ACETAMIDO-DEOXY-GLUCOSYLAMINE	ADIPIC ACID	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-CYSTEIC ACID	N-ACETYLGLYCINE	THIOUREA
2-AMINOETHYLPHOSPHONATE	ALLANTOIN	GLUCOSE	L-GLUTAMINE	N-ACETYLNEURAMINATE	THYMIDINE
2-AMINOPHENOL	ALPHA-AMINOADIPATE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-HISTIDINE	N-ACETYLPUTRESCINE	THYMINE
2-DEOXYGUANOSINE	AZELAIC ACID	GLYCERATE	L-LYSINE	N-METHYL-L-HISTIDINE	TRANS-ACONITATE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CAFFEATE	GLYCINE	L-ORNITHINE	N6-DELTA2-ISOPENTENYL-ADENINE	URACIL
3-2-HYDROXYPHENYLPROPANOATE	CARNOSINE	GUANIDINOACETATE	L-PHENYLALANINE	NICOTINAMIDE	URATE
3-4-HYDROXYPHENYLLACTATE	CITRAMALATE	GUANINE	L-PIPECOLIC ACID	O-PHOSPHO-DL-SERINE	URIDINE
3-5-DIIODO-L-TYROSINE	CITRULLINE	GUANOSINE 3-5-CYCLIC PHOSPHATE	L-PROLINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	XANTHINE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	CREATINE	GUANOSINE	L-SERINE	OPHTHALMIC ACID	XANTHOSINE
3-HYDROXYBENZYL ALCOHOL	CREATINE PHOSPHATE	HIPPURATE	L-THREONINE	OROTATE	
3-METHYGLUTARIC ACID	CREATININE	HISTAMINE	L-TRYPTOPHAN	OROTIC ACID	
3-METHYLADENINE	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	HOMOCYSTINE	L-TYROSINE	PALMITATE	
3-METHYLHISTAMINE	CYTIDINE	HOMOGENTISATE	LACTATE	PANTOTHENIC ACID	
3-NITRO-L-TYROSINE	CYTOSINE	HOMOSERINE	LEUCINE	PHENETHYLAMINE	
3-SULFINO-L-ALANINE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	HYPOXANTHINE	LEUKOTRIENE B4	PHENYLACETIC ACID	
3ALPHA-HYDROXY-5BETA-CHOLANATE	D-GLUCOSAMINE 6-SULFATE	INDOLE-3-ACETAMIDE	LUMICHROME	PHOSPHOCHOLINE	
4-AMINOBUTANOATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	INDOLE-3-ACETIC ACID	MALATE	PTERIN	
4-COUMARATE	D-SACCHARIC ACID	INDOLE-3-ETHANOL	MALEIMIDE	PURINE	
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	DEOXYCARNITINE	INDOXYL SULFATE	MALONATE	PYRIDOXAMINE	
4-IMIDAZOLEACETIC ACID	DEOXYURIDINE	INOSINE 5-PHOSPHATE	N-ACETYL SEROTONIN	RAC-GLYCEROL 1-MYRISTATE	
4-METHYL-2-OXO-PENTANOIC ACID	DESMOSTEROL	INOSINE	N-ACETYL-ALANINE	RETINOATE	
4-METHYLCATECHOL	DIHYDROOROTATE	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	S-5-ADENOSYL-L-METHIONINE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	DOPAMINE	ISOPENTENYL PYROPHOSPHATE	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	SEROTONIN	
5-HYDROXYLYSINE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-ANSERINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	SPERMIDINE	
5-METHYLCYTOSINE	ETHYLMALONIC ACID	L-ARABITOL	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	SPERMINE	
5-METHYLTHIOADENOSINE	FERULATE	L-ARGININE	N-ACETYL-L-CYSTEINE	SPHINGANINE	
5-OXO-L-PROLINE	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	SUBERIC ACID	

Annexe 15 : Liste des métabolites détectés dans l'hippocampe

Métabolites détectés - Hippocampe

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	ALLANTOIN	GLUCONIC ACID	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-METHIONINE	TRIGONELLINE
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	ALPHA-AMINOADIPATE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYLNEURAMINATE	URACIL
10-HYDROXYDECANOATE	AZELAIC ACID	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-GLUTAMINE	N-METHYL-L-HISTIDINE	URIDINE 5-P2-N-ACETYLGLUCOSAMINE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	BIOTIN	GLUCOSE	L-HISTIDINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	URIDINE
2-DEOXYGUANOSINE	CARNOSINE	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-KYNURENINE	NICOTINAMIDE	URIDINE-5-MONOPHOSPHATE
2-DEOXYGUANOSINE	CHOLINE	GLYCERATE	L-LYSINE	NICOTINATE	UROCANATE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CITRAMALATE	GLYCINE	L-METHIONINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	XANTHINE
2-HYDROXYPHENYLACETIC ACID	CITRULLINE	GUANIDINOACETATE	L-ORNITHINE	OPHTHALMIC ACID	XANTHOSINE
3-2-HYDROXYPHENYLPROPANOATE	CMP	GUANOSINE 3-5-CYCLIC PHOSPHATE	L-PHENYLALANINE	PALMITATE	XANTHURENIC ACID
3-4-DIHYDROXYBENZOATE	CREATINE	GUANOSINE 5-MONOPHOSPHATE	L-PIPECOLIC ACID	PANTOTHENIC ACID	
3-4-HYDROXYPHENYLLACTATE	CREATINE PHOSPHATE	GUANOSINE	L-PROLINE	PHOSPHOCHOLINE	
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	CREATININE	HIPPURATE	L-SERINE	PURINE	
3-HYDROXYBENZOATE	CYTIDINE 2-3-CYCLIC MONO-PHOS-PHAT	HISTAMINE	L-THREONINE	PUTRESCINE	
3-METHYGLUTARIC ACID	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	HOMOGENTISATE	L-TRYPTOPHAN	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE	
3-METHYLHISTAMINE	CYTIDINE	HOMOSERINE	L-TYROSINE	PYRIDOXAMINE	
3ALPHA-HYDROXY-5BETA-CHOLANATE	CYTOSINE	HOMOVANILLATE	LACTATE	RETINOATE	
4-AMINOBUTANOATE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	HYPOXANTHINE	LEUCINE	RIBOFLAVIN	
4-GUANIDINOBUTANOATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	INDOLE-3-ACETAMIDE	LEUKOTRIENE B4	S-5-ADENOSYL-L-METHIONINE	
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	D-GLUCURONIC ACID	INDOLE-3-ACETIC ACID	LUMICHROME	SEROTONIN	
4-METHYLCATECHOL	D-SACCHARIC ACID	INDOLE-3-ETHANOL	MALONATE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE	
4-PYRIDOXATE	DEOXYCARNITINE	INDOXYL SULFATE	N-ACETYL SEROTONIN	SPERMIDINE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	DEOXYCHOLATE	INOSINE 5-MONOPHOSPHATE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	SUBERIC ACID	
5-HYDROXYLYSINE	DEOXYURIDINE	INOSINE 5-PHOSPHATE	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	SUCCINATE	
5-METHYLCYTOSINE	DESMOSTEROL	INOSINE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	TAURINE	
5-METHYLTHIOADENOSINE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	THIAMINE MONOPHOSPHATE	
5-OXO-L-PROLINE	ETHYLMALONIC ACID	L-ANSERINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	THIAMINE PYROPHOSPHATE	
ADENINE	FERULATE	L-ARGININE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	THYMIDINE 5-MONOPHOSPHATE	
ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	THYMIDINE	
ADENOSINE	FUMARATE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-L-LYSINE	THYMINE	
ADIPIC ACID	GALACTARATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	TRANS-ACONITATE	

Annexe 16 : Liste des métabolites détectés dans l'amygdale

Métabolites détectés - Amygdale

1-METHYLADENOSINE	ADIPIC ACID	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYL-L-LYSINE	TRANS-ACONITATE
1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	ALLANTOIN	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-GLUTAMINE	N-ACETYL-L-PHENYLALANINE	TRIGONELLINE
1-OLEOYL-RAC-GLYCEROL	ALPHA-AMINOADIPATE	GLUCOSE	L-HISTIDINE	N-ACETYL-METHIONINE	URACIL
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	AZELAIC ACID	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-KYNURENINE	N-ACETYLNEURAMINATE	URIDINE 5-P2-N-ACETYLGLUCOSAMINE
2-DEOXYGUANOSINE	BIOTIN	GLYCERATE	L-LYSINE	N-METHYL-L-HISTIDINE	URIDINE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	CARNOSINE	GLYCINE	L-METHIONINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	URIDINE-5-MONOPHOSPHATE
2-HYDROXYPHENYLACETIC ACID	CHOLINE	GUANIDINOACETATE	L-ORNITHINE	NICOTINAMIDE	UROCANATE
3-2-HYDROXYPHENYLPROPANOATE	CITRULLINE	GUANINE	L-PHENYLALANINE	NICOTINATE	XANTHINE
3-4-DIHYDROXYBENZOATE	CMP	GUANOSINE 3-5-CYCLIC PHOSPHATE	L-PIPECOLIC ACID	O-PHOSPHO-DL-SERINE	XANTHOSINE
3-4-HYDROXYPHENYLLACTATE	CREATINE	GUANOSINE	L-PROLINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	XANTHURENIC ACID
3-CMP	CREATINE PHOSPHATE	HIPPURATE	L-SERINE	PALMITATE	
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	CREATININE	HISTAMINE	L-THREONINE	PANTOTHENIC ACID	
3-HYDROXYBENZOATE	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	HOMOGENTISATE	L-TRYPTOPHAN	PHOSPHOCHOLINE	
3-METHYGLUTARIC ACID	CYTIDINE	HOMOSERINE	L-TYROSINE	PURINE	
3-METHYLHISTAMINE	CYTIDINE	HOMOVANILLATE	LACTATE	PUTRESCINE	
3ALPHA-HYDROXY-5BETA-CHOLANATE	CYTOSINE	HYPOXANTHINE	LEUCINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE	
4-AMINOBUTANOATE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	INDOLE-3-ACETAMIDE	LEUKOTRIENE B4	PYRIDOXAMINE	
4-GUANIDINOBUTANOATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	INDOLE-3-ACETIC ACID	LUMICHROME	RAC-GLYCEROL 1-MYRISTATE	
4-HYDROXY-L-PHENYLGLYCINE	D-GLUCURONIC ACID	INDOLE-3-ETHANOL	MALATE	RETINOATE	
4-METHYLCATECHOL	DEOXYCARNITINE	INDOXYL SULFATE	MALONATE	RIBOFLAVIN	
4-PYRIDOXATE	DEOXYCHOLATE	INOSINE 5-MONOPHOSPHATE	MANNITOL	S-5-ADENOSYL-L-METHIONINE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	DEOXYURIDINE	INOSINE	N-ACETYL SEROTONIN	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE	
5-HYDROXYLYSINE	DESMOSTEROL	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-ALANINE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE	
5-METHYLCYTOSINE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	KYNURENIC ACID	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	SUBERIC ACID	
5-METHYLTHIOADENOSINE	ETHYLMALONIC ACID	L-ANSERINE	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	SUCCINATE	
5-OXO-L-PROLINE	FERULATE	L-ARGININE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	TAURINE	
ADENINE	FORMYL-L-METHIONYL PEPTIDE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-D-TRYPTOPHAN	THIAMINE MONOPHOSPHATE	
ADENOSINE 3-5-CYCLIC MONOPHOSPHA	FUMARATE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	THYMIDINE 5-MONOPHOSPHATE	
ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	GALACTARATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	THYMIDINE	
ADENOSINE	GLUCONIC ACID	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-L-LEUCINE	THYMINE	

Annexe 17 : Liste des métabolites détectés dans le cervelet cognitif

Métabolites détectés - Cervelet cognitif

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CREATININE	INDOXYL SULFATE	MANNITOL	TAURINE
10-HYDROXYDECANOATE	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	INOSINE	METHYL JASMONATE	TETRAHYDROXY-PREGNAN-20-ONE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	CYTIDINE	ISOCITRIC ACID	MYO-INOSITOL	THIAMINE MONOPHOSPHATE
2-DEOXYCYTIDINE 5-MONOPHOSPHATE	CYTOSINE	L-ANSERINE	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	THYMIDINE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-ARABITOL	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	TRANS-ACONITATE
3-2-HYDROXYPHENYLPROPANOATE	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	L-ARGININE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	TRIGONELLINE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	D-GLUCURONIC ACID	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	URACIL
3-METHYGLUTARIC ACID	D-LYXOSE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	URIDINE 5-DIPHOSPHOGLUCOSE
3-METHYLADENINE	D-SACCHARIC ACID	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-LYSINE	URIDINE 5-P2-N-ACETYLGLUCOSAMINE
3-Methylhistidine	DAMP	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-SERINE	URIDINE
3-SULFINO-L-ALANINE	DEOXYCARNITINE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYLNEURAMINATE	XANTHINE
4-AMINOBUTANOATE	DIMETHYLBENZIMIDAZOLE	L-GLUTAMINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	XANTHOSINE
4-GUANIDINOBUTANOATE	EPINEPHRINE	L-HISTIDINE	NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE	
5-6-DIHYDRO URACIL	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-LYSINE	NICOTINATE	
5-HYDROXYINDOLEACETATE	FUMARATE	L-METHIONINE	O-PHOSPHO-DL-SERINE	
5-METHYLCYTOSINE	GALACTARATE	L-PHENYLALANINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	
5-METHYLTHIOADENOSINE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-PIPECOLIC ACID	PANTOTHENIC ACID	
ADENINE	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-PROLINE	PHOSPHOCHOLINE	
ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	GLUCOSE	L-SERINE	PHOSPHOCREATINE	
ADIPIC ACID	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-SERINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE	
ALLANTOIN	GLYCERATE	L-THREONINE	PYRIDOXAMINE	
ALPHA-AMINOADIPATE	GLYCINE	L-TRYPTOPHAN	RAC-GLYCEROL 1-MYRISTATE	
AZELAIC ACID	GUANIDINOACETATE	L-TYROSINE	RIBOFLAVIN	
CARNOSINE	GUANINE	LACTATE	S-Adenosylmethionine	
CHOLINE	GUANOSINE 5-MONOPHOSPHATE	LAUROYLCARNITINE	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE	
CITRAMALATE	HIPPURATE	LEUKOTRIENE B4	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE	
CITRULLINE	HISTAMINE	LIPOAMIDE	SPERMIDINE	
CMP	HOMOGENTISATE	MALATE	SPERMINE	
CREATINE	HOMOSERINE	MALEIMIDE	SUBERIC ACID	
CREATINE PHOSPHATE	HYPOXANTHINE	MALONATE	SUCCINATE	

Annexe 18 : Liste des métabolites détectés dans le cervelet limbique

Métabolites détectés - Cervelet limbique

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CYTIDINE 5-DIPHOSPHOCHOLINE	HYPOXANTHINE	MALATE	S-Adenosylmethionine
10-HYDROXYDECANOATE	CYTIDINE	INOSINE 5-PHOSPHATE	MALEIMIDE	SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	CYTOSINE	INOSINE	MALONATE	SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE
2-DEOXYCYTIDINE 5-MONOPHOSPHATE	D-GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	ISOCITRIC ACID	MANNITOL	SPERMINE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID	D-GLUCOSE-6-PHOSPHATE	L-ANSERINE	MYO-INOSITOL	SPHINGANINE
3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARATE	D-LYXOSE	L-ARABITOL	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	SUBERIC ACID
3-METHYGLUTARIC ACID	D-SACCHARIC ACID	L-ARGININE	N-ACETYL-ASPARTIC ACID	SUCCINATE
3-Methylhistidine	DAMP	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-D-MANNOSAMINE	TAURINE
3-SULFINO-L-ALANINE	DEOXYCARNITINE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-GLUTAMIC ACID	TETRAHYDROXY-PREGNAN-20-ONE
3-UREIDOPROPIONATE	DIMETHYLBENZIMIDAZOLE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID	THIAMINE MONOPHOSPHATE
4-AMINOBUTANOATE	EPINEPHRINE	L-CARNITINE	N-ACETYL-L-LYSINE	THIAMINE PYROPHOSPHATE
4-GUANIDINOBUTANOATE	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-CYSTATHIONINE	N-ACETYL-METHIONINE	THYMIDINE 5-MONOPHOSPHATE
5-6-DIHYDRO URACIL	ETHYL 3-INDOLEACETATE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYL-SERINE	THYMIDINE
5-HYDROXYINDOLEACETATE	FUMARATE	L-GLUTAMINE	N-ACETYLGLYCINE	TRIGONELLINE
5-METHYLTHIOADENOSINE	GALACTARATE	L-HISTIDINE	N-ACETYLNEURAMINATE	URACIL
5-OXO-L-PROLINE	GLUCONIC ACID	L-LYSINE	N-N-N-TRIMETHYLLYSINE	URIDINE 5-DIPHOSPHOGLUCOSE
ADENINE	GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE	L-METHIONINE	N6-DELTA2-ISOPENTENYL-ADENINE	URIDINE 5-MONOPHOSPHATE
ADENOSINE 5-MONOPHOSPHATE	GLUCOSE 1-PHOSPHATE	L-ORNITHINE	NAD	URIDINE 5-P2-N-ACETYLGLUCOSAMINE
ADIPIC ACID	GLUCOSE	L-PHENYLALANINE	NICOTINAMIDE	URIDINE
ALLANTOIN	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-PIPECOLIC ACID	NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE	URIDINE-5-MONOPHOSPHATE
ALPHA-AMINOADIPATE	GLYCERATE	L-PROLINE	NICOTINATE	UROCANATE
AZELAIC ACID	GLYCINE	L-SERINE	O-PHOSPHO-DL-SERINE	XANTHINE
CARNOSINE	GUANIDINOACETATE	L-THREONINE	OMEGA-HYDROXYDODECANOIC ACID	XANTHOSINE
CHOLINE	GUANINE	L-TRYPTOPHAN	OPHTHALMIC ACID	
CITRAMALATE	GUANOSINE 5-MONOPHOSPHATE	L-TYROSINE	PANTOTHENIC ACID	
CITRULLINE	GUANOSINE	LACTATE	PHOSPHOCHOLINE	
CMP	HIPPURATE	LAUROYLCARNITINE	PHOSPHOCREATINE	
CREATINE	HISTAMINE	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	PYRIDOXAL 5-PHOSPHATE	
CREATINE PHOSPHATE	HOMOCYSTEINE	LEUKOTRIENE B4	PYRIDOXAMINE	
CREATININE	HOMOSERINE	LUMICHROME	RIBOFLAVIN	

Tableau des scores cliniques du groupe TDAH

Patient	DDN	Sexe	Age au prelvt (années)	Pathologie	Neuropsy validé										
					WISC IV			WISC V	DSM IV ou V	Conners	TEAch			Fonctions executives	
											Attention sélective	Attention soutenue	Attention divisée	Flexibilité	Inhibition
		M 0 - F 1			ICV - IRP - IMT - IVT - QIT- iag	Similitudes	Matrices	ICV IVS IRF IMT IVT QIT IAG			G - B - C - U	H	T - X	I - L	Z - AA
AM	11/07/10	1	8	TDAH	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC - 7-9-6	2	1-nc	8 7	6 3
BN	01/02/2008	0	10	TDAH	homogene pour ICV IRP IMT	NC	NC	NC	NC	NC	NC-4-10-11	4	1-4	5-14	15-15
BA	06/11/2009	0	9	TDAH	NC	NC	NC	108-115-103-103-105-101-107	NC	fait, non analysé	pourcentage ??				
CT	01/08/2011	0	8	TDAH	non fait	NC	NC	Non fait , KABC fait, moyenne pr l'age	NC	NC	13-4-11-12	4	1 5	4 - NC	11 2
CL	25/11/10	0	8	TDAH	non fait	11	9	103-119-106-107-77-105-nc	dsm 4	ait, non analysé	nc -4-11-7	5	1-nc	8 4	5 4
CDE	15/09/2011	0	7	TDAH	non fait	NC	NC	111- 117- 121- 97- 103-nc -nc	9 6	fait, non analys"	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait
CRE	28/11/2007	0	11	TDAH + dysphasie et dyslexie	78-92-85-86-79	NC	NC	NC	NC	NC	6-11-6-3	9	4 4	13-nc	9-7
DM	15/09/2011	0	8	TDAH	NC	13	9	GERALDINE	9 2	E1,4 P2,4	8-11-8-8	7	1 6	5 1	11 11
FJ	08/07/2010	0	8	TDAH	nc	NC	NC	fait mais moyenne faible ??	5 4	nc	non fait	non fait	non fait	non fait	non fait
GH	11/10/2010	1	8	TDAH	nc	15	14	127-119-123-91-100-119-nr	NC	E: 1,6 - P: 1,8	percentile?				
GE	05/05/2010	0	8	TDAH	nc	14	14	124-123-110-103-122	7 . 7	E :1,9 - P : 2,1	8 - 6 - 8 - 9	6	3 - 6	NC - NC	10 - 8
HA	08/11/2010	0	8	TDAH	86- 94 -NC - NC- NC	NC	8	NC	NC	E : 1 - P : 2,3	10 - 8 - 10 - 9	5	1 - 4	6- 4	5 - 8
JZ	01/12/2007	0	11	TDAH + dyslexie	nc	NC	NC	fait. GERALDINE	NC	NC	6 - 14- 6 -9	6	6 1	8 6	8 3
LD	07/07/2010	0	7	TDAH	98-94-85-80-92	10	9	nc	7 . 6	E: 1,5 - P: 1,3	4-7-15-7	10	5 - 4		
LCG	22/07/2006	0	11	TDAH	146-130-106-96-129	17	14	NC	NC	NC	6 - 8 - 6 - 8	6	6 - 6	10 - 7	8 - 4
LM	15/09/2010	0	9	TDAH				89- 92- 100- 79-86			PERCENTILE??				
ME	31/10/2006	1	12	TDAH	NC	NC	NC		NC	E :1 - P : 1,7	6 - 11 - 7 - 11	5	4 - 6	10 - 9	11 - 13
MHA	17/01/2009	0	9	TDAH et trouble langage	103-90-85-90-91	11	12	NC	4. 6	E: 1.6 P: 1.9	7 - 5 - 6 - 5	7	4 - 6	4 - 7	10 - 12
MJ	17/10/2004	0	14	TDAH	106-102-76-76-87	NC	NC	NC	NC	E 1,9 P 2,2	pourcentage ??				
PGA	27/10/2011	0	7	TDAH	94-99-86-100-100	13	11	NC	5 . 7	E : 1,8 - P : 1,3	10 - 4 - 12 - 8	12	1 - NC	6 - NC	13 - 15
PA	11/11/09	1	9	TDAH	NC	9	9	92-97-88-91-63	9 5	NC	percentile				
PG	02/10/09	0	9	TDAH	113-103-97-80-101	12	11	NC	6 . 5	P: 2,1- E: 0,8					
PM	21/02/10	1	8	TDAH	NON FAIT	nc	nc	non fait	3 4	fait non analysé	8-13-8-2	3	9-5	11-9	10-8
RM	03/04/2008	0	10	TDAH	65-88-74-69-NC	5	8	nc	NC	NC	8 - 8 - 9 - NC	3	NC - NC	NC - NC	NC - NC
RR	12/10/2006	0	12	TDAH	124 - 107 - 106 - 88 - NC	15	9	nc	NC	E : 1,2 - P: 1,1	10 -11 - 8 - 7	4	5 - 6	3 - 2	1 - 11
RC	12/03/2005	0	13	TDAH	103-97-103-86-NC			nc	9 . 8	P: 2 E 2,4	7-7-8-6	3	5-5	14-6	9-7
TB	20/03/2006	0	12	TDAH	118-114-73-106-107	13	12	nc	NC	NC	10 - 6 - 10 - 7	4	4 - 7	9 - 5	12 - 13
TJ	30/06/2006	1	12	TDAH	100-84-84-66- NC	10	5	nc	6 - 2	E:0,4 - P: 1,1	8 - 14 - 6 - 8	6	4 - 2	7 - 1	4 - 3
VN	13/01/2010	0	8	TDAH	nc	6	9	84-92-91- 74-69-NC	NC	NC	percentile	4	5 . 4	NC	NC

Tableau des scores cliniques du groupe contrôles

NOM, PRENOM	DDN	Sexe	Age au prelvt	Pathologie	Neuropsy validé								
					WISC IV			DSM IV ou V	Conners	TEAch			Fonctions executives	
										Attention sélective	Attention soutenue	Attention divisée	Flexibilité	Inhibition
		M 0 - F 1			ICV - IRP - IMT - IVT - QIT- iag	Similitudes	Matrices			G - B - C - U	H	T - X	I - L	Z - AA
BJJ	11/06/2013	0	6	troubles psy	105-88-92-106-94-nc		7	nc	fait non analysé	6-10-7-6	4	1 5	6 6	5 2
CC	23/09/2010	0	7	*Anxiété perfo et peu de capacités métacognitives.*	78 - 100 - 79 - 91 - NC- 79	6	7	NC	E : 0,9 - P : 1,7	9 - 10 - 9 - 8	8	non fait	non fait	non fait
CA	08/12/2008	0	10	TLE	nc	nc	nc	nc	fait, non alysé	non fait	nc	ncc	nc	nc
CPM	27/07/10	0	8	TLE - troubles anxieux	NON FAIT	nc	nnc	nc	E 0,8 P 1,4	non fait	nnc	nc	nc	nc
CPC	11/03/2007	1	12	dyslexie dysorthographie	109-83-95-94-nc	nc	nc		fait non analysé	8-13-8-nc	8	nc	nc	nc
CL	11/05/2006	1	12	Difficultés globales	69-75-70-78-66	nc	8	nc	nc	pourentage				
CL	06/03/2010	1	9	TLE	86-121-103-90-100	8	13	nc	fait non analys"	4-10-3-3	10	9 9	14 6	7 6
DR	26/04/2006	0	13	fragilité graphomotrice	111-nc-112-103-95		nc	nc	E 0,8 P 2	8-8-7-8	8	6 1	11 11	8 9
DCM	21/11/08	0	10	HP verbal + dyspraxie visuospatiale	122-116-121-93-119	14	11	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
GE	01/01/2006	0	12	*Dyslexique*	NC	12	12	NC	P: 1,2 E: 0,9	non fait	nc	nc	nc	nc
GA	26/11/2008	0	9	désajustement - psy	98-116-88-71-92	10	12	NC	NC	NC -NC - NC - 9	13	19 - 12	13 - 9	17 - 13
GV	13/03/2007	0	12	difficultés comportementales	103-94-109-109-105	nc	nc	NC	E 0,8 P 2,2	10- 14-8-4	7	7 12	13 11	12 11
GY	24/10/2008	0	10	Dysphasie	100-97-97-98-nc	nc	nc	nc	nc	non fait	nc	nc	nc	nc
GM	04/03/04	0	14	anxiété envahissante	140-111-103-103-122	14	12	nc	nc	non fait	nc	nc	nc	nc
GA	19/03/2011	0	7	haut potentiel + instabilité comportementale	114-115-100-99-114	14	14	NC	E: 1,4 - P: 2,7	12-14-11-8	8	NC-NC	10-NC	9-9
GM	06/11/2008	0	10	troubles anxieux	109-116-103-100-113	9	13	nc	E 1,5 P 1,5	12-9-12-9	10	10 9	10 7	11 10
JM	25/10/2011	0	6	anxiété	86 - 117 - 109 - 94 - NC	7	12	NC	E : 1,7 -P : 1,5	NC	NC	NC - NC	NC - NC	NC - NC
JG	07/04/2010	0	8	Trouble du comptmt	NC	NC	NC	NC	E: 2,2 - P: 2,2	11 - 14 - 11 - 7	12	10 - NC	8 - 15	NC - NC
LC	12/12/2005	1	13	epilepsie absence non traitée	108-112-97-108-110	11	11	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
LM	11/03/2007	0	12	Haut potentiel	152-130-124-83-nc	nc	nc	nc	fait, non analy	13-8-8-4	10	9-16	13-13	12-13
LA	18/05/2005	0	14	troubles developpementaux	nc	nc	nc	nc	nc	non fait	nc	nc	nc	nc
LT	18/04/2005	0	13	Psy comportement	92 - 73 - 62 - 81 - NC	9	4	NC	E : 2,7 - P : 2,3	non fait	nc	nc	nc	nc
MN	20/07/2006	0	12	Troubles attentionnels	127-85-79-103-103	15	7	NC	E: 0,6 - P: 1,1	11-6-10-10	6	7 - 11	10-10	13-11
PK	12/10/2005	0	12	psy	148-111-85-76-113	19	11	NC	E: NC ; P : 2,2	9 - 6 - 9 - 9	9	8 - 11	13 - 7	12 - 11
RM	09/10/2011	0	6	Tb du langage et du cpt	100 - 85 - 82 - 89 - NC	11	10	NC	E: 1,4 - P : 2,2	NC	NC	NC - NC	NC - NC	NC - NC
RMC	14/09/2011	1	7	Difficultés globales	98-79-80-80-71-nc		7	NC	E NC P 0,7	perc	perc	nc nc	NC - NC	perc
SJ	08/10/2010	0	7	*trouble anxieux*	NC-NC-NC-118-NC	11	11	NC	NC	12 - 6 - 13 - 8	6	6 - 6	10 - 9	10 - 9
SG	27/10/2009	0	8	*difficultés cognitives avec trouble de compréhension net*	86-71-NC-NC-NC	11	6	NC	NC	5 - 10-4 - 6	8	1 - NC	4 - NC	9 - 7
TK	15/02/2007	0	12	Difficultés logico maths	98-78-85-82-83-80		nc	nc	fait, non analy	non fait	nc	,c	nc	nc
VA	25/05/2008	0	10	*Autisme léger*	86-92-85-76-80	9	12	NC	E : 1,1 - P : 1,1	9 - 11 - 10 - 7	4	10 - 10	13 - 7	11 - 10

Annexe 20 : Liste des métabolites détectés dans le sang de l'étude clinique

Métabolites détectés - Sang

1-NH2-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE	CREATINE	L-LYSINE	PANTOTHENIC ACID
10-HYDROXYDECANOATE	CREATININE	L-METHIONINE	PYRIDOXAMINE
2-ACETAMIDO-DEOXY-GLUCOSYLAMINE	DEOXYCARNITINE	L-NORVALINE	QUINATE
2-DEOXY-D-GLUCOSE	DOPAMINE	L-ORNITHINE	SUCCINATE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID-	EPINEPHRINE	L-PHENYLALANINE	TAURINE
2-6-DIAMINOHEPTANEDIOATE	FERULATE	L-PIPECOLIC ACID	THEOPHYLLINE
3-(2-HYDROXYPHENYL)PROPANOATE	FORMYL-METHIONYL PEPTIDE	L-PROLINE	THYROXINE
3-(4-HYDROXYPHENYL)PYRUVATE	GALACTOSAMINE	L-SERINE	TRANS-CINNAMATE
3-UREIDOPROPIONATE	GLUCONIC ACID	L-THREONINE	TRIGONELLINE
4-AMINOBUTANOATE	GLUCURONIC ACID	L-TRYPTOPHAN	URACIL
4-HYDROXY-PROLINE	GLYCERATE-	L-TYROSINE	URATE
4-IMIDAZOLEACETIC ACID	GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE	L-VALINE	URIDINE
4-METHYL-2-OXO-PENTANOIC ACID	GLYCOCHOLATE	LACTATE	XANTHINE
4-METHYL-2-OXO-VALERIC ACID	GUANINE	LAUROYLCARNITINE	
5-AMINOLEVULINIC ACID	GUANINE	LEUCINE ISOLEUCINE NORLEUCINE	
5-AMINOPENTANOATE	HIPPURATE	LEUKOTRIENE B4	
5-OXO-L-PROLINE	HOMOSERINE	LUMICHROME	
5-6-DIHYDRO URACIL	HYPOXANTHINE	LYXOSE	
ADENOSINE	INDOXYL SULFATE	MALATE	
ADIPIC ACID	ISOCITRIC ACID	METHYL-JASMONATE	
ALLANTOIN	L-ALANINE	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid	
ALPHA-AMINOADIPATE	L-ARGININE	N-ACETYL-ALANINE	
AZELAIC ACID	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-LYSINE	
BENZYL ALCOHOL	L-ASPARTATE	N-ACETYL-METHIONINE	
BETAINE	L-CARNITINE	N-ACETYL-PHENYLALANINE	
CATECHOL	L-CYSTINE	N-ACETYL-SERINE	
CHOLINE	L-GLUTAMIC ACID	N-ACETYL-TRYPTOPHAN	
CITRAMALATE	L-GLUTAMINE	N-ACETYLGLYCINE	
CITRULLINE	L-HISTIDINE	N-N-N-TRIMETHYL-LYSINE	
CORTISOL	L-KYNURENINE	N6-(DELTA2-ISOPENTENYL)-ADENINE	

Annexe 21 : Liste des métabolites détectés dans les urines de l'étude clinique

Métabolites détectés - Urine

1-METHYLADENOSINE	CARNOSINE	INDOXYL SULFATE	MANNITOL
10-HYDROXYDECANOATE	CATECHOL	INOSINE	N-Acetyl-4-O-acetylneuraminic acid
2-5-DIHYDROXYBENZOATE	CHOLATE	ISOCITRIC ACID	N-ACETYL-LEUCINE
2-DEOXY-D-GLUCOSE	CITRAMALATE	KYNURENIC ACID	N-ACETYL-LYSINE
2-HYDROXYBUTYRIC ACID-	CITRULLINE	L-ARABITOL	N-ACETYL-METHIONINE
3-(2-HYDROXYPHENYL)PROPANOATE-	CREATININE	L-ARGININE	N-ACETYL-PHENYLALANINE
3-(4-HYDROXYPHENYL)PYRUVATE	DIETHANOLAMINE	L-ASPARAGINE	N-ACETYL-PUTRESCINE
3-HYDROXYPHENYLACETATE	EPINEPHRINE	L-ASPARTATE	N-ACETYL-SERINE
3-METHYGLUTARIC ACID	ETHANOLAMINE PHOSPHATE	L-CARNITINE	N-ACETYL-TRYPTOPHAN
3-METHYLHISTAMINE	ETHYLMALONIC ACID	L-CYSTATHIONINE	N-AMIDINO-L-ASPARTATE
3-SULFINO-L-ALANINE	FERULATE	L-CYSTEINE	N-METHYL-TRYPTAMINE
3-UREIDOPROPIONATE	FORMYL-METHIONYL PEPTIDE	L-CYSTINE	N6-(DELTA2-ISOPENTENYL)-ADENINE
4-AMINOBUTANOATE	FUMARATE	L-GLUTAMIC ACID	OLEATE
4-GUANIDINOBUTANOATE	GLUCONIC ACID	L-GLUTAMINE	PANTOTHENIC ACID
4-HYDROXY-PROLINE	GLUCOSE	L-HISTIDINE	PARAXANTHINE
4-IMIDAZOLEACETIC ACID	GLUCOSE-6-PHOSPHATE	L-KYNURENINE	PYRIDOXAMINE
4-METHYL-2-OXO-VALERIC ACID	GLUCURONIC ACID	L-LYSINE	QUINATE
5-6-DIHYDRO URACIL	GLYCERALDEHYDE 3-P DIETHYL ACETAL	L-METHIONINE	RIBOFLAVIN
5-AMINOLEVULINIC ACID	GLYCERATE	L-NORVALINE	SUBERIC ACID
5-AMINOPENTANOATE	GLYCEROL 3-PHOSPHATE	L-ORNITHINE	SUCCINATE
5-HYDROXYINDOLEACETATE	GLYCEROL MYRISTATE	L-PHENYLALANINE	TAURINE
5-HYDROXYLYSINE	GLYCINE	L-PIPECOLIC ACID	TETRAHYDROXY-PREGNAN-20-ONE
5-METHYLCYTOSINE	GLYCOCHOLATE	L-SERINE	THYMINE
5-METHYLTHIOADENOSINE	GUANIDINOACETATE	L-THREONINE	TRANS-ACONITATE
5-OXO-L-PROLINE	GUANINE	L-TRYPTOPHAN	TRANS-CINNAMATE
ALLANTOIN	HIPPURATE	L-TYROSINE	TRIGONELLINE
ALPHA-AMINOADIPATE	HISTAMINE	LACTATE	UROCANATE
AZELAIC ACID	HOMOSERINE	LEUKOTRIENE B4	XANTHINE
BETA-ALANINE	HYPOXANTHINE	LUMICHROME	
BIOTIN	INDOLE-3-ACETIC ACID	MALATE	

Bibliographie

Bibliographie

- Achanta L. B., and Rae C. D. 2017. 'beta-Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms', *Neurochem Res*, **42**: 35-49.

- Adriani W., Rea M., Baviera M., Invernizzi W., Carli M., Ghirardi O., Caprioli A., and Laviola G. 2004. 'Acetyl-L-carnitine reduces impulsive behaviour in adolescent rats', *Psychopharmacology (Berl)*, **176**: 296-304.

- Amiri A., Torabi Parizi G., Kousha M., Saadat F., Modabbernia M. J., Najafi K., and Atrkar Roushan Z. 2013. 'Changes in plasma Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels induced by methylphenidate in children with Attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD)', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **47**: 20-24.

- Angeli E., Korpa T., Johnson E. O., Apostolakou F., Papassotiriou I., Chrousos G. P., and Pervanidou P. 2018. 'Salivary cortisol and alpha-amylase diurnal profiles and stress reactivity in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder', *Psychoneuroendocrinology*, **90**: 174-181.

- Anjum I., Jaffery S. S., Fayyaz M., Samoo Z., and Anjum S. 2018. 'The Role of Vitamin D in Brain Health: A Mini Literature Review', *Cureus*, **10**: e2960.

- Anstey K., and Christensen H. 2000. 'Education, activity, health, blood pressure and apolipoprotein E as predictors of cognitive change in old age: a review', *Gerontology*, **46**: 163-177.

- Antshel K. M. 2015. 'Psychosocial interventions in attention-deficit/hyperactivity disorder: update', *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, **24**: 79-97.

- Antshel K. M., Faraone S. V., and Gordon M. 2014. 'Cognitive behavioral treatment outcomes in adolescent ADHD', *J Atten Disord*, **18**: 483-495.

- Arnold L. E., Hodgkins P., Caci H., Kahle J., and Young S. 2016. 'Effect of Treatment Modality on Long-Term Outcomes in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review', *Focus (Am Psychiatr Publ)*, **14**: 90-102.

- Arnsten A. F. 1998. 'Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function', *Trends Cogn Sci*, **2**: 436-447.

- Arnsten A. F., and Pliszka S. R. 2011. 'Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders', *Pharmacol Biochem Behav*, **99**: 211-216.

- Baker G. B., Bornstein R. A., Rouget A. C., Ashton S. E., van Muyden J. C., and Coutts R. T. 1991. 'Phenylethylaminergic mechanisms in attention-deficit disorder', *Biol Psychiatry*, **29**: 15-22.

- Banaschewski T., Roessner V., Dittmann R. W., Santosh P. J., and Rothenberger A. 2004. 'Non-stimulant medications in the treatment of ADHD', *Eur Child Adolesc Psychiatry*, **13 Suppl 1**: I102-116.

- Banerjee E., and Nandagopal K. 2015. 'Does serotonin deficit mediate susceptibility to ADHD?', *Neurochem Int*, **82**: 52-68.

- Barbosa I. G., Rocha N. P., de Miranda A. S., Magalhaes P. V., Huguet R. B., de Souza L. P., Kapczinski F., and Teixeira A. L. 2012. 'Increased levels of adipokines in bipolar disorder', *J Psychiatr Res*, **46**: 389-393.

- Bari A., Dalley J. W., and Robbins T. W. 2008. 'The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats', *Nat Protoc*, **3**: 759-767.

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

- Barkley R. A., and Peters H. 2012. 'The earliest reference to ADHD in the medical literature? Melchior Adam Weikard's description in 1775 of "attention deficit" (Mangel der Aufmerksamkeit, Attentio Volubilis)', *J Atten Disord*, **16**: 623-630.

- Belzung C., and Lemoine M. 2011. 'Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression', *Biol Mood Anxiety Disord*, **1**: 9.

- Bendel P., and Eilam R. 1992. 'Quantitation of ventricular size in normal and spontaneously hypertensive rats by magnetic resonance imaging', *Brain Res*, **574**: 224-228.

- Bennett D. A., and Waters M. D. 2000. 'Applying biomarker research', *Environ Health Perspect*, **108**: 907-910.

- Berezhnoy D. S., Stvolinsky S. L., Lopachev A. V., Devyatov A. A., Lopacheva O. M., Kulikova O. I., Abaimov D. A., and Fedorova T. N. 2019. 'Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions', *Amino Acids*, **51**: 139-150.

- Berger D. F., and Sagvolden T. 1998. 'Sex differences in operant discrimination behaviour in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder', *Behav Brain Res*, **94**: 73-82.

- Bergwerff C. E., Luman M., Blom H. J., and Oosterlaan J. 2016. 'No Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine Abnormalities in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder', *PLoS One*, **11**: e0151100.

- Bhagavan H. N., Coleman M., and Coursin D. B. 1975. 'The effect of pyridoxine hydrochloride on blood serotonin and pyridoxal phosphate contents in hyperactive children', *Pediatrics*, **55**: 437-441.

- Biederman J., and Faraone S. V. 2005. 'Attention-deficit hyperactivity disorder', *Lancet*, **366**: 237-248.

- Biederman J., Mick E., Faraone S. V., Braaten E., Doyle A., Spencer T., Wilens T. E., Frazier E., and Johnson M. A. 2002. 'Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic', *Am J Psychiatry*, **159**: 36-42.

- Bilgic A., Toker A., Isik U., and Kilinc I. 2017. 'Serum brain-derived neurotrophic factor, glial-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder', *Eur Child Adolesc Psychiatry*, **26**: 355-363.

- Birkenhager W. H., Forette F., Seux M. L., Wang J. G., and Staessen J. A. 2001. 'Blood pressure, cognitive functions, and prevention of dementias in older patients with hypertension', *Arch Intern Med*, **161**: 152-156.

- Bledsoe J., Semrud-Clikeman M., and Pliszka S. R. 2009. 'A magnetic resonance imaging study of the cerebellar vermis in chronically treated and treatment-naive children with attention-deficit/hyperactivity disorder combined type', *Biol Psychiatry*, **65**: 620-624.

- Boccard J., Veuthey J. L., and Rudaz S. 2010. 'Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling', *J Sep Sci*, **33**: 290-304.

- Boldyrev A. A., Stvolinsky S. L., Fedorova T. N., and Suslina Z. A. 2010. 'Carnosine as a natural antioxidant and geroprotector: from molecular mechanisms to clinical trials', *Rejuvenation Res*, **13**: 156-158.

- Broadhurst D. I., and Kell D. B. 2006. 'Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments', *Metabolomics*, **2**: 171-196.

- Broyd S. J., Demanuele C., Debener S., Helps S. K., James C. J., and Sonuga-Barke E. J. 2009. 'Default-mode brain dysfunction in mental disorders: a systematic review', *Neurosci Biobehav Rev*, **33**: 279-296.

- Bruchmuller K., Margraf J., and Schneider S. 2012. 'Is ADHD diagnosed in accord with diagnostic criteria? Overdiagnosis and influence of client gender on diagnosis', *J Consult Clin Psychol*, **80**: 128-138.

- Buber A., Cakaloz B., Isildar Y., Unlu G., Bostanci H. E., Aybek H., and Herken H. 2016. 'Increased urinary 6-hydroxymelatoninsulfate levels in attention deficit hyperactivity disorder diagnosed children and adolescent', *Neurosci Lett*, **617**: 195-200.

- Bujak R., Struck-Lewicka W., Markuszewski M. J., and Kaliszan R. 2015. 'Metabolomics for laboratory diagnostics', *J Pharm Biomed Anal*, **113**: 108-120.

- Bulut M., Selek S., Gergerlioglu H. S., Savas H. A., Yilmaz H. R., Yuce M., and Ekici G. 2007. 'Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hyperactivity disorder', *J Psychiatry Neurosci*, **32**: 435-438.

- Burgess J. R., Stevens L., Zhang W., and Peck L. 2000. 'Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder', *Am J Clin Nutr*, **71**: 327S-330S.

- Bush G. 2010. 'Attention-deficit/hyperactivity disorder and attention networks', *Neuropsychopharmacology*, **35**: 278-300.

- Cao A. H., Yu L., Wang Y. W., Wang J. M., Yang L. J., and Lei G. F. 2012. 'Effects of methylphenidate on attentional set-shifting in a genetic model of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Behav Brain Funct*, **8**: 10.

- Carey M. P., Diewald L. M., Esposito F. J., Pellicano M. P., Gironi Carnevale U. A., Sergeant J. A., Papa M., and Sadile A. G. 1998. 'Differential distribution, affinity and plasticity of dopamine D-1 and D-2 receptors in the target sites of the mesolimbic system in an animal model of ADHD', *Behav Brain Res*, **94**: 173-185.

- Carthy E., and Ellender T. 2021. 'Histamine, Neuroinflammation and Neurodevelopment: A Review', *Front Neurosci*, **15**: 680214.

- Cascade E., Kalali A. H., and Weisler R. H. 2008. 'Short-acting versus Long-acting Medications for the Treatment of ADHD', *Psychiatry (Edgmont)*, **5**: 24-27.

- Castellanos F. X. 2002. 'Anatomic magnetic resonance imaging studies of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Dialogues Clin Neurosci*, **4**: 444-448.

- Castellanos F. X., Giedd J. N., Marsh W. L., Hamburger S. D., Vaituzis A. C., Dickstein D. P., Sarfatti S. E., Vauss Y. C., Snell J. W., Lange N., *et al.* 1996. 'Quantitative brain magnetic

resonance imaging in attention-deficit hyperactivity disorder', *Arch Gen Psychiatry*, **53**: 607-616.

- Caylak E. 2012. 'Biochemical and genetic analyses of childhood attention deficit/ hyperactivity disorder', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **159B**: 613-627.

- Cervenka I., Agudelo L. Z., and Ruas J. L. 2017. 'Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health', *Science*, **357**.

- Chalon S., Vancassel S., Zimmer L., Guilloteau D., and Durand G. 2001. 'Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission', *Lipids*, **36**: 937-944.

- Chan R. C., Shum D., Toulopoulou T., and Chen E. Y. 2008. 'Assessment of executive functions: review of instruments and identification of critical issues', *Arch Clin Neuropsychol*, **23**: 201-216.

- Chen V. C., Chiu C. C., Chen L. J., Hsu T. C., and Tzang B. S. 2018. 'Effects of taurine on striatal dopamine transporter expression and dopamine uptake in SHR rats', *Behav Brain Res*, **348**: 219-226.

- Chen V. C. H., Chiu C. C., Weng J. C., Chen L. J., Siow J. Y., Hsu T. C., and Tzang B. S. 2019. 'Taurine reduces hyperactive behavior in SHR rats through upregulating the proportion of CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cells', *Journal of Functional Foods*, **56**: 312-320.

- Cherkasova M. V., French L. R., Syer C. A., Cousins L., Galina H., Ahmadi-Kashani Y., and Hechtman L. 2020. 'Efficacy of Cognitive Behavioral Therapy With and Without Medication for Adults With ADHD: A Randomized Clinical Trial', *J Atten Disord*, **24**: 889-903.

- Chetwynd A. J., Dunn W. B., and Rodriguez-Blanco G. 2017. 'Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics', *Adv Exp Med Biol*, **965**: 19-44.

- Cohn T. A., Remington G., Zipursky R. B., Azad A., Connolly P., and Wolever T. M. 2006. 'Insulin resistance and adiponectin levels in drug-free patients with schizophrenia: A preliminary report', *Can J Psychiatry*, **51**: 382-386.

- Coleman M. 1971. 'Serotonin concentrations in whole blood of hyperactive children', *J Pediatr*, **78**: 985-990.

- Comai S., Bertazzo A., Vachon J., Daigle M., Toupin J., Cote G., Turecki G., and Gobbi G. 2016. 'Tryptophan via serotonin/kynurenine pathways abnormalities in a large cohort of aggressive inmates: markers for aggression', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **70**: 8-16.

- Corominas M., Ramos-Quiroga J. A., Ferrer M., Saez-Francas N., Palomar G., Bosch R., and Casas M. 2012. 'Cortisol responses in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a possible marker of inhibition deficits', *Atten Defic Hyperact Disord*, **4**: 63-75.

- Corominas-Roso M., Ramos-Quiroga J. A., Ribases M., Sanchez-Mora C., Palomar G., Valero S., Bosch R., and Casas M. 2013. 'Decreased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adults with attention-deficit hyperactivity disorder', *Int J Neuropsychopharmacol*, **16**: 1267-1275.

- Corona J. C. 2020. 'Role of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder', *Antioxidants (Basel)*, **9**.

- Cortese S., Faraone S. V., Konofal E., and Lecendreux M. 2009. 'Sleep in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: meta-analysis of subjective and objective studies', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **48**: 894-908.

- Costa A. C., Joaquim H. P. G., Forlenza O. V., Gattaz W. F., and Talib L. L. 2020. 'Three plasma metabolites in elderly patients differentiate mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a pilot study', *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **270**: 483-488.

- D'Auria J. C., and Gershenzon J. 2005. 'The secondary metabolism of Arabidopsis thaliana: growing like a weed', *Curr Opin Plant Biol*, **8**: 308-316.

- da Silva J. C., Amaral A. U., Cecatto C., Wajner A., Dos Santos Godoy K., Ribeiro R. T., de Mello Goncalves A., Zanatta A., da Rosa M. S., Loureiro S. O.*, et al*. 2017. 'alpha-Ketoadipic

Acid and alpha-Aminoadipic Acid Cause Disturbance of Glutamatergic Neurotransmission and Induction of Oxidative Stress In Vitro in Brain of Adolescent Rats', *Neurotox Res*, **32**: 276-290.

- Dalley J. W., Cardinal R. N., and Robbins T. W. 2004. 'Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates', *Neurosci Biobehav Rev*, **28**: 771-784.

- DasBanerjee T., Middleton F. A., Berger D. F., Lombardo J. P., Sagvolden T., and Faraone S. V. 2008. 'A comparison of molecular alterations in environmental and genetic rat models of ADHD: a pilot study', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **147B**: 1554-1563.

- Datta D., Bhinge A., and Chandran V. 2001. 'Lysine: Is it worth more?', *Cytotechnology*, **36**: 3-32.

- Davids E., Zhang K., Tarazi F. I., and Baldessarini R. J. 2003. 'Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder', *Brain Res Brain Res Rev*, **42**: 1-21.

- de Jong W., Linthorst A. C., and Versteeg H. G. 1995. 'The nigrostriatal dopamine system and the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat', *Arch Mal Coeur Vaiss*, **88**: 1193-1196.

- Del Campo N., Chamberlain S. R., Sahakian B. J., and Robbins T. W. 2011. 'The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Biol Psychiatry*, **69**: e145-157.

- Deutch A. Y., and Roth R. H. 1990. 'The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system', *Prog Brain Res*, **85**: 367-402; discussion 402-363.

- Diana G. 2002. 'Does hypertension alone lead to cognitive decline in spontaneously hypertensive rats?', *Behav Brain Res*, **134**: 113-121.

- Dickstein D. P., Garvey M., Pradella A. G., Greenstein D. K., Sharp W. S., Castellanos F. X., Pine D. S., and Leibenluft E. 2005. 'Neurologic examination abnormalities in children with bipolar disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder', *Biol Psychiatry*, **58**: 517-524.

- Dieme B., Mavel S., Blasco H., Tripi G., Bonnet-Brilhault F., Malvy J., Bocca C., Andres C. R., Nadal-Desbarats L., and Emond P. 2015. 'Metabolomics Study of Urine in Autism Spectrum Disorders Using a Multiplatform Analytical Methodology', *J Proteome Res*, **14**: 5273-5282.

- Dimatelis J. J., Hsieh J. H., Sterley T. L., Marais L., Womersley J. S., Vlok M., and Russell V. A. 2015. 'Impaired Energy Metabolism and Disturbed Dopamine and Glutamate Signalling in the Striatum and Prefrontal Cortex of the Spontaneously Hypertensive Rat Model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder', *J Mol Neurosci*, **56**: 696-707.

- Diniz B. S., Teixeira A. L., Machado-Vieira R., Talib L. L., Gattaz W. F., and Forlenza O. V. 2013. 'Reduced serum nerve growth factor in patients with late-life depression', *Am J Geriatr Psychiatry*, **21**: 493-496.

- Dolina S., Margalit D., Malitsky S., and Rabinkov A. 2014. 'Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) as a pyridoxine-dependent condition: urinary diagnostic biomarkers', *Med Hypotheses*, **82**: 111-116.

- Dommett E. J. 2014. 'Using the five-choice serial reaction time task to examine the effects of atomoxetine and methylphenidate in the male spontaneously hypertensive rat', *Pharmacol Biochem Behav*, **124**: 196-203.

- Dougherty D. D., Bonab A. A., Spencer T. J., Rauch S. L., Madras B. K., and Fischman A. J. 1999. 'Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder', *Lancet*, **354**: 2132-2133.

- DSM-V American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Washington, DC).

- Dunn W. B., Wilson I. D., Nicholls A. W., and Broadhurst D. 2012. 'The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans', *Bioanalysis*, **4**: 2249-2264.

- Durston S., Davidson M. C., Mulder M. J., Spicer J. A., Galvan A., Tottenham N., Scheres A., Castellanos F. X., van Engeland H., and Casey B. J. 2007. 'Neural and behavioral correlates of expectancy violations in attention-deficit hyperactivity disorder', *J Child Psychol Psychiatry*, **48**: 881-889.

- Dvorakova M., Jezova D., Blazicek P., Trebaticka J., Skodacek I., Suba J., Iveta W., Rohdewald P., and Durackova Z. 2007. 'Urinary catecholamines in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): modulation by a polyphenolic extract from pine bark (pycnogenol)', *Nutr Neurosci*, **10**: 151-157.

- Ejigu B. A., Valkenborg D., Baggerman G., Vanaerschot M., Witters E., Dujardin J. C., Burzykowski T., and Berg M. 2013. 'Evaluation of normalization methods to pave the way towards large-scale LC-MS-based metabolomics profiling experiments', *OMICS*, **17**: 473-485.

- Ellison-Wright I., Ellison-Wright Z., and Bullmore E. 2008. 'Structural brain change in Attention Deficit Hyperactivity Disorder identified by meta-analysis', *BMC Psychiatry*, **8**: 51.

- English B. A., Hahn M. K., Gizer I. R., Mazei-Robison M., Steele A., Kurnik D. M., Stein M. A., Waldman I. D., and Blakely R. D. 2009. 'Choline transporter gene variation is associated with attention-deficit hyperactivity disorder', *J Neurodev Disord*, **1**: 252-263.

- Evangelisti M., De Rossi P., Rabasco J., Donfrancesco R., Lionetto L., Capi M., Sani G., Simmaco M., Nicoletti F., and Villa M. P. 2017. 'Changes in serum levels of kynurenine metabolites in paediatric patients affected by ADHD', *Eur Child Adolesc Psychiatry*, **26**: 1433-1441.

- Evans W. N., Morrill M. S., and Parente S. T. 2010. 'Measuring inappropriate medical diagnosis and treatment in survey data: The case of ADHD among school-age children', *J Health Econ*, **29**: 657-673.

- Faraone S. V., Asherson P., Banaschewski T., Biederman J., Buitelaar J. K., Ramos-Quiroga J. A., Rohde L. A., Sonuga-Barke E. J., Tannock R., and Franke B. 2015. 'Attention-deficit/hyperactivity disorder', *Nat Rev Dis Primers*, **1**: 15020.

- Faraone S. V., Biederman J., Spencer T. J., and Aleardi M. 2006. 'Comparing the efficacy of medications for ADHD using meta-analysis', *MedGenMed*, **8**: 4.

- Faraone S. V., Doyle A. E., Mick E., and Biederman J. 2001. 'Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder', *Am J Psychiatry*, **158**: 1052-1057.

- Faraone S. V., and Larsson H. 2019. 'Genetics of attention deficit hyperactivity disorder', *Mol Psychiatry*, **24**: 562-575.

- Faraone S. V., Perlis R. H., Doyle A. E., Smoller J. W., Goralnick J. J., Holmgren M. A., and Sklar P. 2005. 'Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Biol Psychiatry*, **57**: 1313-1323.

- Fayyad J., Sampson N. A., Hwang I., Adamowski T., Aguilar-Gaxiola S., Al-Hamzawi A., Andrade L. H., Borges G., de Girolamo G., Florescu S*., et al.* 2017. 'The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys', *Atten Defic Hyperact Disord*, **9**: 47-65.

- Ferguson J. N., Young L. J., Hearn E. F., Matzuk M. M., Insel T. R., and Winslow J. T. 2000. 'Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene', *Nat Genet*, **25**: 284-288.

- Fernie A. R. 2007. 'The future of metabolic phytochemistry: larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding', *Phytochemistry*, **68**: 2861-2880.

- Ferreira G. C., and McKenna M. C. 2017. 'L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain', *Neurochem Res*, **42**: 1661-1675.

- Fiehn O. 2002. 'Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes', *Plant Mol Biol*, **48**: 155-171.

- Fleisher C., and McGough J. 2014. 'Sofinicline: a novel nicotinic acetylcholine receptor agonist in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Expert Opin Investig Drugs*, **23**: 1157-1163.

- Fone K. C., and Nutt D. J. 2005. 'Stimulants: use and abuse in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder', *Curr Opin Pharmacol*, **5**: 87-93.

- Fontenelle L. F., Barbosa I. G., Luna J. V., Rocha N. P., Silva Miranda A., and Teixeira A. L. 2012. 'Neurotrophic factors in obsessive-compulsive disorder', *Psychiatry Res*, **199**: 195-200.

- Ford-Jones P. C. 2015. 'Misdiagnosis of attention deficit hyperactivity disorder: 'Normal behaviour' and relative maturity', *Paediatr Child Health*, **20**: 200-202.

- Fukui S., Schwarcz R., Rapoport S. I., Takada Y., and Smith Q. R. 1991. 'Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism', *J Neurochem*, **56**: 2007-2017.

- Gaub M., and Carlson C. L. 1997. 'Gender differences in ADHD: a meta-analysis and critical review', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **36**: 1036-1045.

- Gerlai R., McNamara A., Choi-Lundberg D. L., Armanini M., Ross J., Powell-Braxton L., and Phillips H. S. 2001. 'Impaired water maze learning performance without altered dopaminergic function in mice heterozygous for the GDNF mutation', *Eur J Neurosci*, **14**: 1153-1163.

- German J. B., Hammock B. D., and Watkins S. M. 2005. 'Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health', *Metabolomics*, **1**: 3-9.

- Gershon J. 2002. 'A meta-analytic review of gender differences in ADHD', *J Atten Disord*, **5**: 143-154.

- Getahun D., Jacobsen S. J., Fassett M. J., Chen W., Demissie K., and Rhoads G. G. 2013. 'Recent trends in childhood attention-deficit/hyperactivity disorder', *JAMA Pediatr*, **167**: 282-288.

- Giacobini M., Medin E., Ahnemark E., Russo L. J., and Carlqvist P. 2018. 'Prevalence, Patient Characteristics, and Pharmacological Treatment of Children, Adolescents, and Adults Diagnosed With ADHD in Sweden', *J Atten Disord*, **22**: 3-13.

- Gizer I. R., Ficks C., and Waldman I. D. 2009. 'Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review', *Hum Genet*, **126**: 51-90.

- Godzien J., Alonso-Herranz V., Barbas C., and Armitage E. G. 2015. 'Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample', *Metabolomics*, **11**: 518-528.

- Goksugur S. B., Tufan A. E., Semiz M., Gunes C., Bekdas M., Tosun M., and Demircioglu F. 2014. 'Vitamin D status in children with attention-deficit-hyperactivity disorder', *Pediatr Int*, **56**: 515-519.

- Gonzalez-Riano C., Garcia A., and Barbas C. 2016. 'Metabolomics studies in brain tissue: A review', *J Pharm Biomed Anal*, **130**: 141-168.

- Gonzalez-Ruiz V., Pezzatti J., Roux A., Stoppini L., Boccard J., and Rudaz S. 2017. 'Unravelling the effects of multiple experimental factors in metabolomics, analysis of human neural cells with hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry', *J Chromatogr A*, **1527**: 53-60.

- Granholm A. C., Reyland M., Albeck D., Sanders L., Gerhardt G., Hoernig G., Shen L., Westphal H., and Hoffer B. 2000. 'Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons', *J Neurosci*, **20**: 3182-3190.

- Guney E., Cetin F. H., Alisik M., Tunca H., Tas Torun Y., Iseri E., Isik Taner Y., Cayci B., and Erel O. 2015. 'Attention Deficit Hyperactivity Disorder and oxidative stress: A short term follow up study', *Psychiatry Res*, **229**: 310-317.

- Guney E., Ceylan M. F., Kara M., Tekin N., Goker Z., Senses Dinc G., Ozturk O., Eker S., and Kizilgun M. 2014. 'Serum nerve growth factor (NGF) levels in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD)', *Neurosci Lett*, **560**: 107-111.

- Ha S., Lee H., Choi Y., Kang H., Jeon S. J., Ryu J. H., Kim H. J., Cheong J. H., Lim S., Kim B. N.*, et al*. 2020. 'Maturational delay and asymmetric information flow of brain connectivity in SHR model of ADHD revealed by topological analysis of metabolic networks', *Sci Rep*, **10**: 3197.

- Haggarty J., and Burgess K. E. 2017. 'Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome', *Curr Opin Biotechnol*, **43**: 77-85.

- Haleem D. J. 2012. 'Serotonin neurotransmission in anorexia nervosa', *Behav Pharmacol*, **23**: 478-495.

- Hallen A., Jamie J. F., and Cooper A. J. 2013. 'Lysine metabolism in mammalian brain: an update on the importance of recent discoveries', *Amino Acids*, **45**: 1249-1272.

- Hanna G. L., Ornitz E. M., and Hariharan M. 1996. 'Urinary catecholamine excretion and behavioral differences in ADHD and normal boys', *J Child Adolesc Psychopharmacol*, **6**: 63-73.

- Harris J. C. 2018. 'Lesch-Nyhan syndrome and its variants: examining the behavioral and neurocognitive phenotype', *Curr Opin Psychiatry*, **31**: 96-102.

- Harvey R. C., Jordan C. J., Tassin D. H., Moody K. R., Dwoskin L. P., and Kantak K. M. 2013. 'Performance on a strategy set shifting task during adolescence in a genetic model of attention deficit/hyperactivity disorder: methylphenidate vs. atomoxetine treatments', *Behav Brain Res*, **244**: 38-47.

- HAS. 2014. 'Conduite à tenir en médecine de premier recours devant un enfant ou un adolescent susceptible d'avoir un trouble déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité'.

- Hatano T., Saiki S., Okuzumi A., Mohney R. P., and Hattori N. 2016. 'Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **87**: 295-301.

- Hauser P., Soler R., Brucker-Davis F., and Weintraub B. D. 1997. 'Thyroid hormones correlate with symptoms of hyperactivity but not inattention in attention deficit hyperactivity disorder', *Psychoneuroendocrinology*, **22**: 107-114.

- Hawi Z., Cummins T. D., Tong J., Johnson B., Lau R., Samarrai W., and Bellgrove M. A. 2015. 'The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder', *Mol Psychiatry*, **20**: 289-297.

- Hercigonja Novkovic V., Rudan V., Pivac N., Nedic G., and Muck-Seler D. 2009. 'Platelet serotonin concentration in children with attention-deficit/hyperactivity disorder', *Neuropsychobiology*, **59**: 17-22.

- Higgins G. A., and Silenieks L. B. 2017. 'Rodent Test of Attention and Impulsivity: The 5-Choice Serial Reaction Time Task', *Curr Protoc Pharmacol*, **78**: 5 49 41-45 49 34.

- Hladnik U., Nyhan W. L., and Bertelli M. 2008. 'Variable expression of HPRT deficiency in 5 members of a family with the same mutation', *Arch Neurol*, **65**: 1240-1243.

- Holecek M. 2020. 'Histidine in Health and Disease: Metabolism, Physiological Importance, and Use as a Supplement', *Nutrients*, **12**.

- Holick M. F. 2015. 'Vitamin D and brain health: the need for vitamin D supplementation and sensible sun exposure', *J Intern Med*, **277**: 90-93.

- Hoogman M., Bralten J., Hibar D. P., Mennes M., Zwiers M. P., Schweren L. S. J., van Hulzen K. J. E., Medland S. E., Shumskaya E., Jahanshad N.*, et al*. 2017. 'Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis', *Lancet Psychiatry*, **4**: 310-319.

- Horner W. E., Johnson D. E., Schmidt A. W., and Rollema H. 2007. 'Methylphenidate and atomoxetine increase histamine release in rat prefrontal cortex', *Eur J Pharmacol*, **558**: 96-97.

- Hoshino Y., Ohno Y., Yamamoto T., Kaneko M., and Kumashiro H. 1985. 'Plasma free tryptophan concentration in children with attention deficit disorder', *Folia Psychiatr Neurol Jpn*, **39**: 531-535.

- Insel T. R., O'Brien D. J., and Leckman J. F. 1999. 'Oxytocin, vasopressin, and autism: is there a connection?', *Biol Psychiatry*, **45**: 145-157.

- Ionescu G., Kiehl R., Ona L., and Wichmann-Kunz F. 1990. 'Abnormal plasma catecholamines in hyperkinetic children', *Biol Psychiatry*, **28**: 547-550.

- Ivanisevic J., Epstein A. A., Kurczy M. E., Benton P. H., Uritboonthai W., Fox H. S., Boska M. D., Gendelman H. E., and Siuzdak G. 2014. 'Brain region mapping using global metabolomics', *Chem Biol*, **21**: 1575-1584.

- Jakaria M., Azam S., Haque M. E., Jo S. H., Uddin M. S., Kim I. S., and Choi D. K. 2019. 'Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms', *Redox Biol*, **24**: 101223.

- Johnson C. H., Ivanisevic J., and Siuzdak G. 2016. 'Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms', *Nat Rev Mol Cell Biol*, **17**: 451-459.

- Jones L. L., McDonald D. A., and Borum P. R. 2010. 'Acylcarnitines: role in brain', *Prog Lipid Res*, **49**: 61-75.

- Joseph N., Zhang-James Y., Perl A., and Faraone S. V. 2015. 'Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis', *J Atten Disord*, **19**: 915-924.

- Kaczor M., and Skalski M. 2016. 'Treatment of behavioral sleep problems in children and adolescents - literature review', *Psychiatr Pol*, **50**: 571-584.

- Kaddurah-Daouk R. 2006. 'Metabolic profiling of patients with schizophrenia', *PLoS Med*, **3**: e363.

- Kamal M., Bener A., and Ehlayel M. S. 2014. 'Is high prevalence of vitamin D deficiency a correlate for attention deficit hyperactivity disorder?', *Atten Defic Hyperact Disord*, **6**: 73-78.

- Kawamura N., Shinoda K., Sato H., Sasaki K., Suzuki M., Yamaki K., Fujimori T., Yamamoto H., Osei-Hyiaman D., and Ohashi Y. 2018. 'Plasma metabolome analysis of patients with major depressive disorder', *Psychiatry Clin Neurosci*, **72**: 349-361.

- Kazda L., Bell K., Thomas R., McGeechan K., Sims R., and Barratt A. 2021. 'Overdiagnosis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents: A Systematic Scoping Review', *JAMA Netw Open*, **4**: e215335.

- Kennedy D. O. 2016. 'B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy--A Review', *Nutrients*, **8**: 68.

- Kent L., Middle F., Hawi Z., Fitzgerald M., Gill M., Feehan C., and Craddock N. 2001. 'Nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder', *Psychiatr Genet*, **11**: 37-40.

- Khadka M., Todor A., Maner-Smith K. M., Colucci J. K., Tran V., Gaul D. A., Anderson E. J., Natrajan M. S., Rouphael N., Mulligan M. J.*, et al.* 2019. 'The Effect of Anticoagulants, Temperature, and Time on the Human Plasma Metabolome and Lipidome from Healthy Donors as Determined by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry', *Biomolecules*, **9**.

- Khan J. A., Forouhar F., Tao X., and Tong L. 2007. 'Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism as an attractive target for drug discovery', *Expert Opin Ther Targets*, **11**: 695-705.

- Killeen P. R., Russell V. A., and Sergeant J. A. 2013. 'A behavioral neuroenergetics theory of ADHD', *Neurosci Biobehav Rev*, **37**: 625-657.

- Killeen P. R., Tannock R., and Sagvolden T. 2012. 'The four causes of ADHD: a framework', *Curr Top Behav Neurosci*, **9**: 391-425.

- Konrad K., Gauggel S., and Schurek J. 2003. 'Catecholamine functioning in children with traumatic brain injuries and children with attention-deficit/hyperactivity disorder', *Brain Res Cogn Brain Res*, **16**: 425-433.

- Kou L., Hou Y., Yao Q., Guo W., Wang G., Wang M., Fu Q., He Z., Ganapathy V., and Sun J. 2018. 'L-Carnitine-conjugated nanoparticles to promote permeation across blood-brain barrier and to target glioma cells for drug delivery via the novel organic cation/carnitine transporter OCTN2', *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **46**: 1605-1616.

- Kuntsi J., Neale B. M., Chen W., Faraone S. V., and Asherson P. 2006. 'The IMAGE project: methodological issues for the molecular genetic analysis of ADHD', *Behav Brain Funct*, **2**: 27.

- Kuppili P. P., Pattanayak R. D., Sagar R., Mehta M., and Vivekanandhan S. 2017. 'Thyroid and Cortisol hormones in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A case-control study', *Asian J Psychiatr*, **28**: 73-77.

- Kusaga A., Yamashita Y., Koeda T., Hiratani M., Kaneko M., Yamada S., and Matsuishi T. 2002. 'Increased urine phenylethylamine after methylphenidate treatment in children with ADHD', *Ann Neurol*, **52**: 372-374.

- Landaas E. T., Aarsland T. I., Ulvik A., Halmoy A., Ueland P. M., and Haavik J. 2016. 'Vitamin levels in adults with ADHD', *BJPsych Open*, **2**: 377-384.

- Lanznaster D., de Assis D. R., Corcia P., Pradat P. F., and Blasco H. 2018. 'Metabolomics Biomarkers: A Strategy Toward Therapeutics Improvement in ALS', *Front Neurol*, **9**: 1126.

- Larsson H., Dilshad R., Lichtenstein P., and Barker E. D. 2011. 'Developmental trajectories of DSM-IV symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic effects, family risk and associated psychopathology', *J Child Psychol Psychiatry*, **52**: 954-963.

- Lau H., Mat Ludin A. F., Rajab N. F., and Shahar S. 2017. 'Identification of Neuroprotective Factors Associated with Successful Ageing and Risk of Cognitive Impairment among Malaysia Older Adults', *Curr Gerontol Geriatr Res*, **2017**: 4218756.

- Leandro J., and Houten S. M. 2019. 'Saccharopine, a lysine degradation intermediate, is a mitochondrial toxin', *J Cell Biol*, **218**: 391-392.

- Lebrun C., Cohen M., Rosenthal-Allieri M. A., Bresch S., Benzaken S., Marignier R., Seitz-Polski B., and Ticchioni M. 2018. 'Only Follow-Up of Memory B Cells Helps Monitor Rituximab Administration to Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders', *Neurol Ther*, **7**: 373-383.

- Lee D. K., Yoon M. H., Kang Y. P., Yu J., Park J. H., Lee J., and Kwon S. W. 2013. 'Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of Schisandra chinensis by GC/MS and LC/MS', *Food Chem*, **141**: 3931-3937.

- Leenders J., Frederich M., and de Tullio P. 2015. 'Nuclear magnetic resonance: a key metabolomics platform in the drug discovery process', *Drug Discov Today Technol*, **13**: 39-46.

- Leffa D. T., Bellaver B., de Oliveira C., de Macedo I. C., de Freitas J. S., Grevet E. H., Caumo W., Rohde L. A., Quincozes-Santos A., and Torres I. L. S. 2017. 'Increased Oxidative Parameters and Decreased Cytokine Levels in an Animal Model of Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder', *Neurochem Res*, **42**: 3084-3092.

- Leo D., Sorrentino E., Volpicelli F., Eyman M., Greco D., Viggiano D., di Porzio U., and Perrone-Capano C. 2003. 'Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD', *Neurosci Biobehav Rev*, **27**: 661-669.

- Leo R., Di Lorenzo G., Tesauro M., Cola C., Fortuna E., Zanasi M., Troisi A., Siracusano A., Lauro R., and Romeo F. 2006. 'Decreased plasma adiponectin concentration in major depression', *Neurosci Lett*, **407**: 211-213.

- Letertre M. P. M., Dervilly G., and Giraudeau P. 2021. 'Combined Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry Approaches for Metabolomics', *Anal Chem*, **93**: 500-518.

- Li D., Sham P. C., Owen M. J., and He L. 2006. 'Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)', *Hum Mol Genet*, **15**: 2276-2284.

- Li Q., Lu G., Antonio G. E., Mak Y. T., Rudd J. A., Fan M., and Yew D. T. 2007. 'The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain', *Neurochem Int*, **50**: 848-857.

- Liddle E. B., Hollis C., Batty M. J., Groom M. J., Totman J. J., Liotti M., Scerif G., and Liddle P. F. 2011. 'Task-related default mode network modulation and inhibitory control in ADHD: effects of motivation and methylphenidate', *J Child Psychol Psychiatry*, **52**: 761-771.

- Lim S. A., Kang U. J., and McGehee D. S. 2014. 'Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects', *Front Synaptic Neurosci*, **6**: 22.

- Linnet K. M., Dalsgaard S., Obel C., Wisborg K., Henriksen T. B., Rodriguez A., Kotimaa A., Moilanen I., Thomsen P. H., Olsen J.*, et al.* 2003. 'Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence', *Am J Psychiatry*, **160**: 1028-1040.

- Maddock J., Zhou A., Cavadino A., Kuzma E., Bao Y., Smart M. C., Saum K. U., Schottker B., Engmann J., Kjaergaard M.*, et al.* 2017. 'Vitamin D and cognitive function: A Mendelian randomisation study', *Sci Rep*, **7**: 13230.

- Maher B. S., Marazita M. L., Ferrell R. E., and Vanyukov M. M. 2002. 'Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis', *Psychiatr Genet*, **12**: 207-215.

- Mamas M., Dunn W. B., Neyses L., and Goodacre R. 2011. 'The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease', *Arch Toxicol*, **85**: 5-17.

- Maness L. M., Kastin A. J., Weber J. T., Banks W. A., Beckman B. S., and Zadina J. E. 1994. 'The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology', *Neurosci Biobehav Rev*, **18**: 143-159.

- Marazziti D. 2017. 'Understanding the role of serotonin in psychiatric diseases', *F1000Res*, **6**: 180.

- Marc D. T., Ailts J. W., Campeau D. C., Bull M. J., and Olson K. L. 2011. 'Neurotransmitters excreted in the urine as biomarkers of nervous system activity: validity and clinical applicability', *Neurosci Biobehav Rev*, **35**: 635-644.

- Matthews D. E. 2020. 'Review of Lysine Metabolism with a Focus on Humans', *J Nutr*, **150**: 2548S-2555S.

- Mavroconstanti T., Halmoy A., and Haavik J. 2014. 'Decreased serum levels of adiponectin in adult attention deficit hyperactivity disorder', *Psychiatry Res*, **216**: 123-130.

- McBean G. J. 2017. 'Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes', *Antioxidants (Basel)*, **6**.

- McCutcheon J. E., and Marinelli M. 2009. 'Age matters', *Eur J Neurosci*, **29**: 997-1014.

- Mette C., Zimmermann M., Grabemann M., Abdel-Hamid M., Uekermann J., Biskup C. S., Wiltfang J., Zepf F. D., and Kis B. 2013. 'The impact of acute tryptophan depletion on attentional performance in adult patients with ADHD', *Acta Psychiatr Scand*, **128**: 124-132.

- Mick E., and Faraone S. V. 2008. 'Genetics of attention deficit hyperactivity disorder', *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, **17**: 261-284, vii-viii.

- Miller E. M., Pomerleau F., Huettl P., Russell V. A., Gerhardt G. A., and Glaser P. E. 2012. 'The spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rat models of ADHD exhibit sub-regional differences in dopamine release and uptake in the striatum and nucleus accumbens', *Neuropharmacology*, **63**: 1327-1334.

- Miller T. W., Nigg J. T., and Faraone S. V. 2007. 'Axis I and II comorbidity in adults with ADHD', *J Abnorm Psychol*, **116**: 519-528.

- Millichap J. G. 1997. 'Encephalitis virus and attention deficit hyperactivity disorder', *J R Soc Med*, **90**: 709-710.

- Millichap J. G. 2008. 'Etiologic classification of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Pediatrics*, **121**: e358-365.

- Moeller F. G., Barratt E. S., Dougherty D. M., Schmitz J. M., and Swann A. C. 2001. 'Psychiatric aspects of impulsivity', *Am J Psychiatry*, **158**: 1783-1793.

- Monteiro M. S., Carvalho M., Bastos M. L., and Guedes de Pinho P. 2013. 'Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges', *Curr Med Chem*, **20**: 257-271.

- Moolenaar S. H., Gohlich-Ratmann G., Engelke U. F., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Voit T., Hoffmann G. F., Brautigam C., van Kuilenburg A. B.*, et al.* 2001. 'beta-Ureidopropionase deficiency: a novel inborn error of metabolism discovered using NMR spectroscopy on urine', *Magn Reson Med*, **46**: 1014-1017.

- Murphy G. H., Hulse J. A., Smith I., and Grant D. B. 1990. 'CONGENITAL HYPOTHYROIDISM - PHYSIOLOGICAL AND PSYCHOLOGICAL-FACTORS IN EARLY DEVELOPMENT', *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, **31**: 711-725.

- Nakao T., Radua J., Rubia K., and Mataix-Cols D. 2011. 'Gray matter volume abnormalities in ADHD: voxel-based meta-analysis exploring the effects of age and stimulant medication', *Am J Psychiatry*, **168**: 1154-1163.

- Naz S., Vallejo M., Garcia A., and Barbas C. 2014. 'Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics', *J Chromatogr A*, **1353**: 99-105.

- Needham B. D., Adame M. D., Serena G., Rose D. R., Preston G. M., Conrad M. C., Campbell A. S., Donabedian D. H., Fasano A., Ashwood P.*, et al.* 2021. 'Plasma and Fecal Metabolite Profiles in Autism Spectrum Disorder', *Biol Psychiatry*, **89**: 451-462.

- Nehlig A. 2004. 'Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **70**: 265-275.

- NICE. 2020. 'National Institute for Health and Care Excellence.'.

- Nicholson J. K., Lindon J. C., and Holmes E. 1999. ''Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data', *Xenobiotica*, **29**: 1181-1189.

- Nicolas S., Chabry J., Guyon A., Zarif H., Heurteaux C., and Petit-Paitel A. 2018. '[Adiponectin: an endogenous molecule with anti-inflammatory and antidepressant properties?]', *Med Sci (Paris)*, **34**: 417-423.

- Nigg J. T., and Casey B. J. 2005. 'An integrative theory of attention-deficit/ hyperactivity disorder based on the cognitive and affective neurosciences', *Dev Psychopathol*, **17**: 785-806.

- Nordstrom A., and Lewensohn R. 2010. 'Metabolomics: moving to the clinic', *J Neuroimmune Pharmacol*, **5**: 4-17.

- Norman L. J., Carlisi C., Lukito S., Hart H., Mataix-Cols D., Radua J., and Rubia K. 2016. 'Structural and Functional Brain Abnormalities in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder: A Comparative Meta-analysis', *JAMA Psychiatry*, **73**: 815-825.

- Oades R. D. 2007. 'Role of the serotonin system in ADHD: treatment implications', *Expert Rev Neurother*, **7**: 1357-1374.

- Oades R. D. 2008. 'Dopamine-serotonin interactions in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD)', *Prog Brain Res*, **172**: 543-565.

- Oades R. D., Daniels R., and Rascher W. 1998. 'Plasma neuropeptide-Y levels, monoamine metabolism, electrolyte excretion and drinking behavior in children with attention-deficit hyperactivity disorder', *Psychiatry Res*, **80**: 177-186.

- Oades R. D., Myint A. M., Dauvermann M. R., Schimmelmann B. G., and Schwarz M. J. 2010. 'Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: an exploration of associations of cytokines and kynurenine metabolites with symptoms and attention', *Behav Brain Funct*, **6**: 32.

- Odunsi K., Wollman R. M., Ambrosone C. B., Hutson A., McCann S. E., Tammela J., Geisler J. P., Miller G., Sellers T., Cliby W.*, et al.* 2005. 'Detection of epithelial ovarian cancer using 1H-NMR-based metabonomics', *Int J Cancer*, **113**: 782-788.

- Okamoto K., and Aoki K. 1963. 'Development of a strain of spontaneously hypertensive rats', *Jpn Circ J*, **27**: 282-293.

- OMS. 2019. 'International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (11th ed)'.

- Packer R. M., Law T. H., Davies E., Zanghi B., Pan Y., and Volk H. A. 2016. 'Effects of a ketogenic diet on ADHD-like behavior in dogs with idiopathic epilepsy', *Epilepsy Behav*, **55**: 62-68.

- Pan W., Banks W. A., Fasold M. B., Bluth J., and Kastin A. J. 1998. 'Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier', *Neuropharmacology*, **37**: 1553-1561.

- Parrott J. M., Redus L., Santana-Coelho D., Morales J., Gao X., and O'Connor J. C. 2016. 'Neurotoxic kynurenine metabolism is increased in the dorsal hippocampus and drives distinct depressive behaviors during inflammation', *Transl Psychiatry*, **6**: e918.

- Passani M. B., Panula P., and Lin J. S. 2014. 'Histamine in the brain', *Front Syst Neurosci*, **8**: 64.

- Periat A., Krull I. S., and Guillarme D. 2015. 'Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins', *J Sep Sci*, **38**: 357-367.

- Pezzatti J., Boccard J., Codesido S., Gagnebin Y., Joshi A., Picard D., Gonzalez-Ruiz V., and Rudaz S. 2020. 'Implementation of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial', *Anal Chim Acta*, **1105**: 28-44.

- Pezzatti J., Gonzalez-Ruiz V., Codesido S., Gagnebin Y., Joshi A., Guillarme D., Schappler J., Picard D., Boccard J., and Rudaz S. 2019. 'A scoring approach for multi-platform acquisition in metabolomics', *J Chromatogr A*, **1592**: 47-54.

- Pingault J. B., Tremblay R. E., Vitaro F., Carbonneau R., Genolini C., Falissard B., and Cote S. M. 2011. 'Childhood trajectories of inattention and hyperactivity and prediction of

educational attainment in early adulthood: a 16-year longitudinal population-based study', *Am J Psychiatry*, **168**: 1164-1170.

- Pliszka S., and Issues Aacap Work Group on Quality. 2007. 'Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **46**: 894-921.

- Pliszka S. R., Maas J. W., Javors M. A., Rogeness G. A., and Baker J. 1994. 'Urinary catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder with and without comorbid anxiety', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **33**: 1165-1173.

- Polanczyk G., de Lima M. S., Horta B. L., Biederman J., and Rohde L. A. 2007. 'The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis', *Am J Psychiatry*, **164**: 942-948.

- Poppi L. A., Ho-Nguyen K. T., Shi A., Daut C. T., and Tischfield M. A. 2021. 'Recurrent Implication of Striatal Cholinergic Interneurons in a Range of Neurodevelopmental, Neurodegenerative, and Neuropsychiatric Disorders', *Cells*, **10**.

- Ptacek R., Weissenberger S., Braaten E., Klicperova-Baker M., Goetz M., Raboch J., Vnukova M., and Stefano G. B. 2019. 'Clinical Implications of the Perception of Time in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Review', *Med Sci Monit*, **25**: 3918-3924.

- Purper-Ouakil D., Ramoz N., Lepagnol-Bestel A. M., Gorwood P., and Simonneau M. 2011. 'Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder', *Pediatr Res*, **69**: 69R-76R.

- Raamsdonk L. M., Teusink B., Broadhurst D., Zhang N., Hayes A., Walsh M. C., Berden J. A., Brindle K. M., Kell D. B., Rowland J. J.*, et al.* 2001. 'A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations', *Nat Biotechnol*, **19**: 45-50.

- Raichle M. E., MacLeod A. M., Snyder A. Z., Powers W. J., Gusnard D. A., and Shulman G. L. 2001. 'A default mode of brain function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 676-682.

- Raja K., Patrick M., Gao Y., Madu D., Yang Y., and Tsoi L. C. 2017. 'A Review of Recent Advancement in Integrating Omics Data with Literature Mining towards Biomedical Discoveries', *Int J Genomics*, **2017**: 6213474.

- Ramautar R., Berger R., van der Greef J., and Hankemeier T. 2013. 'Human metabolomics: strategies to understand biology', *Curr Opin Chem Biol*, **17**: 841-846.

- Randazzo G. M., Tonoli D., Strajhar P., Xenarios I., Odermatt A., Boccard J., and Rudaz S. 2017. 'Enhanced metabolite annotation via dynamic retention time prediction: Steroidogenesis alterations as a case study', *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1071**: 11-18.

- Ribas G. S., Vargas C. R., and Wajner M. 2014. 'L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders', *Gene*, **533**: 469-476.

- Riley A. W., Spiel G., Coghill D., Dopfner M., Falissard B., Lorenzo M. J., Preuss U., Ralston S. J., and Group Adore Study. 2006. 'Factors related to health-related quality of life (HRQoL) among children with ADHD in Europe at entry into treatment', *Eur Child Adolesc Psychiatry*, **15 Suppl 1**: I38-45.

- Rucklidge J. J. 2010. 'Gender differences in attention-deficit/hyperactivity disorder', *Psychiatr Clin North Am*, **33**: 357-373.

- Rucklidge J. J., Frampton C. M., Gorman B., and Boggis A. 2014. 'Vitamin-mineral treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in adults: double-blind randomised placebo-controlled trial', *Br J Psychiatry*, **204**: 306-315.

- Russell V. A. 2002. 'Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat', *Behav Brain Res*, **130**: 191-196.

- Russell V. A. 2007. 'Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder', *J Neurosci Methods*, **161**: 185-198.

- Russell V. A. 2011. 'Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)', *Curr Protoc Neurosci*, **Chapter 9**: Unit9 35.

- Russell V. A., Oades R. D., Tannock R., Killeen P. R., Auerbach J. G., Johansen E. B., and Sagvolden T. 2006. 'Response variability in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a neuronal and glial energetics hypothesis', *Behav Brain Funct*, **2**: 30.

- Russell V. A., and Wiggins T. M. 2000. 'Increased glutamate-stimulated norepinephrine release from prefrontal cortex slices of spontaneously hypertensive rats', *Metab Brain Dis*, **15**: 297-304.

- Russell V., de Villiers A., Sagvolden T., Lamm M., and Taljaard J. 1995. 'Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat', *Brain Res*, **676**: 343-351.

- Russo S., Kema I. P., Bosker F., Haavik J., and Korf J. 2009. 'Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: molecular evidence and psychiatric implications', *World J Biol Psychiatry*, **10**: 258-268.

- Sagvolden T. 2000. 'Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD)', *Neurosci Biobehav Rev*, **24**: 31-39.

- Sagvolden T., Aase H., Zeiner P., and Berger D. 1998. 'Altered reinforcement mechanisms in attention-deficit/hyperactivity disorder', *Behav Brain Res*, **94**: 61-71.

- Sagvolden T., and Johansen E. B. 2012. 'Rat models of ADHD', *Curr Top Behav Neurosci*, **9**: 301-315.

- Sagvolden T., Johansen E. B., Woien G., Walaas S. I., Storm-Mathisen J., Bergersen L. H., Hvalby O., Jensen V., Aase H., Russell V. A., *et al.* 2009. 'The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain', *Neuropharmacology*, **57**: 619-626.

- Sagvolden T., Metzger M. A., Schiorbeck H. K., Rugland A. L., Spinnangr I., and Sagvolden G. 1992. 'The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants', *Behav Neural Biol*, **58**: 103-112.

- Sagvolden T., Russell V. A., Aase H., Johansen E. B., and Farshbaf M. 2005. 'Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Biol Psychiatry*, **57**: 1239-1247.

- Sainio E. L., Pulkki K., and Young S. N. 1996. 'L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects', *Amino Acids*, **10**: 21-47.

- Sasaki T., Hashimoto K., Oda Y., Ishima T., Kurata T., Takahashi J., Kamata Y., Kimura H., Niitsu T., Komatsu H.*, et al*. 2015. 'Decreased levels of serum oxytocin in pediatric patients with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder', *Psychiatry Res*, **228**: 746-751.

- Saul R. C., and Ashby C. D. 1986. 'Measurement of whole blood serotonin as a guide in prescribing psychostimulant medication for children with attentional deficits', *Clin Neuropharmacol*, **9**: 189-195.

- Schneider M., Retz W., Coogan A., Thome J., and Rosler M. 2006. 'Anatomical and functional brain imaging in adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD)--a neurological view', *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **256 Suppl 1**: i32-41.

- Schon M., Mousa A., Berk M., Chia W. L., Ukropec J., Majid A., Ukropcova B., and de Courten B. 2019. 'The Potential of Carnosine in Brain-Related Disorders: A Comprehensive Review of Current Evidence', *Nutrients*, **11**.

- Schrimpe-Rutledge A. C., Codreanu S. G., Sherrod S. D., and McLean J. A. 2016. 'Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions', *J Am Soc Mass Spectrom*, **27**: 1897-1905.

- Sciberras E., Mulraney M., Silva D., and Coghill D. 2017. 'Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD-Review of Existing Evidence', *Curr Psychiatry Rep*, **19**: 1.

- Seidman L. J., Valera E. M., and Makris N. 2005. 'Structural brain imaging of attention-deficit/hyperactivity disorder', *Biol Psychiatry*, **57**: 1263-1272.

- Sergeant J. A. 2005. 'Modeling attention-deficit/hyperactivity disorder: a critical appraisal of the cognitive-energetic model', *Biol Psychiatry*, **57**: 1248-1255.

- Shaw P., Sharp W. S., Morrison M., Eckstrand K., Greenstein D. K., Clasen L. S., Evans A. C., and Rapoport J. L. 2009. 'Psychostimulant treatment and the developing cortex in attention deficit hyperactivity disorder', *Am J Psychiatry*, **166**: 58-63.

- Shaw P., Stringaris A., Nigg J., and Leibenluft E. 2014. 'Emotion dysregulation in attention deficit hyperactivity disorder', *Am J Psychiatry*, **171**: 276-293.

- Shim S. H., Hwangbo Y., Kwon Y. J., Jeong H. Y., Lee B. H., Lee H. J., and Kim Y. K. 2008. 'Increased levels of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD)', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **32**: 1824-1828.

- Shim S. H., Hwangbo Y., Yoon H. J., Kwon Y. J., Lee H. Y., Hwang J. A., and Kim Y. K. 2015. 'Increased levels of plasma glial-derived neurotrophic factor in children with attention deficit hyperactivity disorder', *Nord J Psychiatry*, **69**: 546-551.

- Simon V., Czobor P., Balint S., Meszaros A., and Bitter I. 2009. 'Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis', *Br J Psychiatry*, **194**: 204-211.

- Slezak J. M., and Anderson K. G. 2011. 'Effects of acute and chronic methylphenidate on delay discounting', *Pharmacol Biochem Behav*, **99**: 545-551.

- Snider W. D. 1994. 'Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us', *Cell*, **77**: 627-638.

- Sonuga-Barke E. J. 2003. 'The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics', *Neurosci Biobehav Rev*, **27**: 593-604.

- Sonuga-Barke E. J., Brandeis D., Cortese S., Daley D., Ferrin M., Holtmann M., Stevenson J., Danckaerts M., van der Oord S., Dopfner M., *et al*. 2013. 'Nonpharmacological interventions for ADHD: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of dietary and psychological treatments', *Am J Psychiatry*, **170**: 275-289.

- Spencer T. J., Biederman J., Madras B. K., Dougherty D. D., Bonab A. A., Livni E., Meltzer P. C., Martin J., Rauch S., and Fischman A. J. 2007. 'Further evidence of dopamine transporter dysregulation in ADHD: a controlled PET imaging study using altropane', *Biol Psychiatry*, **62**: 1059-1061.

- Spivak B., Vered Y., Yoran-Hegesh R., Averbuch E., Mester R., Graf E., and Weizman A. 1999. 'Circulatory levels of catecholamines, serotonin and lipids in attention deficit hyperactivity disorder', *Acta Psychiatr Scand*, **99**: 300-304.

- Stergiakouli E., Hamshere M., Holmans P., Langley K., Zaharieva I., de Code Genetics, Psychiatric Gwas Consortium, Hawi Z., Kent L., Gill M., *et al*. 2012. 'Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD', *Am J Psychiatry*, **169**: 186-194.

- Stevens L. J., Zentall S. S., Abate M. L., Kuczek T., and Burgess J. R. 1996. 'Omega-3 fatty acids in boys with behavior, learning, and health problems', *Physiol Behav*, **59**: 915-920.

- Stevens L. J., Zentall S. S., Deck J. L., Abate M. L., Watkins B. A., Lipp S. R., and Burgess J. R. 1995. 'Essential fatty acid metabolism in boys with attention-deficit hyperactivity disorder', *Am J Clin Nutr*, **62**: 761-768.

- Strasser B., Berger K., and Fuchs D. 2015. 'Effects of a caloric restriction weight loss diet on tryptophan metabolism and inflammatory biomarkers in overweight adults', *Eur J Nutr*, **54**: 101-107.

- Straub C., Saulnier J. L., Begue A., Feng D. D., Huang K. W., and Sabatini B. L. 2016. 'Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum', *Neuron*, **92**: 84-92.

- Strimbu K., and Tavel J. A. 2010. 'What are biomarkers?', *Curr Opin HIV AIDS*, **5**: 463-466.

- Subramanyam M., and Goyal J. 2016. 'Translational biomarkers: from discovery and development to clinical practice', *Drug Discov Today Technol*, **21-22**: 3-10.

- Takahashi N., Ishizuka K., and Inada T. 2021. 'Peripheral biomarkers of attention-deficit hyperactivity disorder: Current status and future perspective', *J Psychiatr Res*, **137**: 465-470.

- Tarver J., Daley D., and Sayal K. 2014. 'Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): an updated review of the essential facts', *Child Care Health Dev*, **40**: 762-774.

- Thanos P. K., Michaelides M., Benveniste H., Wang G. J., and Volkow N. D. 2007. 'Effects of chronic oral methylphenidate on cocaine self-administration and striatal dopamine D2 receptors in rodents', *Pharmacol Biochem Behav*, **87**: 426-433.

- Thapar A., and Stergiakouli E. 2008. 'An Overview on the Genetics of ADHD', *Xin Li Xue Bao*, **40**: 1088-1098.

- Theodoridis G. A., Gika H. G., Want E. J., and Wilson I. D. 2012. 'Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review', *Anal Chim Acta*, **711**: 7-16.

- Thomas R., Sanders S., Doust J., Beller E., and Glasziou P. 2015. 'Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis', *Pediatrics*, **135**: e994-1001.

- Thome J., Ehlis A. C., Fallgatter A. J., Krauel K., Lange K. W., Riederer P., Romanos M., Taurines R., Tucha O., Uzbekov M.*, et al.* 2012. 'Biomarkers for attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). A consensus report of the WFSBP task force on biological markers and the World Federation of ADHD', *World J Biol Psychiatry*, **13**: 379-400.

- Tissandie E., Gueguen Y., Lobaccaro J. M., Aigueperse J., and Souidi M. 2006. '[Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases]', *Med Sci (Paris)*, **22**: 1095-1100.

- Todd R. D., Lobos E. A., Sun L. W., and Neuman R. J. 2003. 'Mutational analysis of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene in attention deficit/hyperactivity

disorder: evidence for association of an intronic polymorphism with attention problems', *Mol Psychiatry*, **8**: 103-108.

- Tong J. H., Cummins T. D., Johnson B. P., McKinley L. A., Pickering H. E., Fanning P., Stefanac N. R., Newman D. P., Hawi Z., and Bellgrove M. A. 2015. 'An association between a dopamine transporter gene (SLC6A3) haplotype and ADHD symptom measures in nonclinical adults', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **168B**: 89-96.

- Toren P., Karasik A., Eldar S., Wolmer L., Shimon I., Weitz R., Inbar D., Koren S., Pariente C., Reiss A.*, et al.* 1997. 'Thyroid function in attention deficit and hyperactivity disorder', *J Psychiatr Res*, **31**: 359-363.

- Umehara M., Ago Y., Kawanai T., Fujita K., Hiramatsu N., Takuma K., and Matsuda T. 2013. 'Methylphenidate and venlafaxine attenuate locomotion in spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, through alpha2-adrenoceptor activation', *Behav Pharmacol*, **24**: 328-331.

- Valera E. M., Faraone S. V., Murray K. E., and Seidman L. J. 2007. 'Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder', *Biol Psychiatry*, **61**: 1361-1369.

- Van Cleave J., and Leslie L. K. 2008. 'Approaching ADHD as a chronic condition: implications for long-term adherence', *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, **46**: 28-37.

- van Dyck C. H., Seibyl J. P., Malison R. T., Laruelle M., Zoghbi S. S., Baldwin R. M., and Innis R. B. 2002. 'Age-related decline in dopamine transporters: analysis of striatal subregions, nonlinear effects, and hemispheric asymmetries', *Am J Geriatr Psychiatry*, **10**: 36-43.

- Van Oudheusden L. J., and Scholte H. R. 2002. 'Efficacy of carnitine in the treatment of children with attention-deficit hyperactivity disorder', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **67**: 33-38.

- Vojinovic D., Kalaoja M., Trompet S., Fischer K., Shipley M. J., Li S., Havulinna A. S., Perola M., Salomaa V., Yang Q.*, et al.* 2020. 'Association of circulating metabolites in plasma or serum and risk of stroke: Meta-analysis from seven prospective cohorts', *Neurology*.

- Volkow N. D., Wang G. J., Newcorn J., Fowler J. S., Telang F., Solanto M. V., Logan J., Wong C., Ma Y., Swanson J. M.*, et al.* 2007. 'Brain dopamine transporter levels in treatment and drug naive adults with ADHD', *Neuroimage*, **34**: 1182-1190.

- Wang L. J., Chou W. J., Tsai C. S., Lee M. J., Lee S. Y., Hsu C. W., Hsueh P. C., and Wu C. C. 2020. 'Novel plasma metabolite markers of attention-deficit/hyperactivity disorder identified using high-performance chemical isotope labelling-based liquid chromatography-mass spectrometry', *World J Biol Psychiatry*: 1-10.

- Wang X., Cao Q., Wang J., Wu Z., Wang P., Sun L., Cai T., and Wang Y. 2016. 'The effects of cognitive-behavioral therapy on intrinsic functional brain networks in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder', *Behav Res Ther*, **76**: 32-39.

- Watanabe Y., Fujita M., Ito Y., Okada T., Kusuoka H., and Nishimura T. 1997. 'Brain dopamine transporter in spontaneously hypertensive rats', *J Nucl Med*, **38**: 470-474.

- Weibel S., Menard O., Ionita A., Boumendjel M., Cabelguen C., Kraemer C., Micoulaud-Franchi J. A., Bioulac S., Perroud N., Sauvaget A.*, et al.* 2020. 'Practical considerations for the evaluation and management of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in adults', *Encephale*, **46**: 30-40.

- Willner P. 1986. 'Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **10**: 677-690.

- Wishart D. S., Feunang Y. D., Marcu A., Guo A. C., Liang K., Vazquez-Fresno R., Sajed T., Johnson D., Li C., Karu N.*, et al.* 2018. 'HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018', *Nucleic Acids Res*, **46**: D608-D617.

- Wolf H. 1974. 'The effect of hormones and vitamin B6 on urinary excretion of metabolites of the kynurenine pathway', *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **136**: 1-186.

- Wood D. R., Reimherr F. W., and Wender P. H. 1985. 'Treatment of attention deficit disorder with DL-phenylalanine', *Psychiatry Res*, **16**: 21-26.

- Wu H. C., Dachet F., Ghoddoussi F., Bagla S., Fuerst D., Stanley J. A., Galloway M. P., and Loeb J. A. 2017. 'Altered metabolomic-genomic signature: A potential noninvasive biomarker of epilepsy', *Epilepsia*, **58**: 1626-1636.

- Wu H. Q., Ungerstedt U., and Schwarcz R. 1995. 'L-alpha-aminoadipic acid as a regulator of kynurenic acid production in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats', *Eur J Pharmacol*, **281**: 55-61.

- Wu Y., and Li L. 2016. 'Sample normalization methods in quantitative metabolomics', *J Chromatogr A*, **1430**: 80-95.

- Wultz B., Sagvolden T., Moser E. I., and Moser M. B. 1990. 'The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior', *Behav Neural Biol*, **53**: 88-102.

- Xie J., Han Y., Hong Y., Li W. W., Pei Q., Zhou X., Zhang B., and Wang Y. 2020. 'Identification of Potential Metabolite Markers for Middle-Aged Patients with Post-Stroke Depression Using Urine Metabolomics', *Neuropsychiatr Dis Treat*, **16**: 2017-2024.

- Xiong P., Zeng Y., Wan J., Xiaohan D. H., Tan D., Lu J., Xu F., Li H. Y., Zhu Z., and Ma M. 2011. 'The role of NGF and IL-2 serum level in assisting the diagnosis in first episode schizophrenia', *Psychiatry Res*, **189**: 72-76.

- Xu G., Strathearn L., Liu B., Yang B., and Bao W. 2018. 'Twenty-Year Trends in Diagnosed Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Among US Children and Adolescents, 1997-2016', *JAMA Netw Open*, **1**: e181471.

- Yang J., Chen T., Sun L., Zhao Z., Qi X., Zhou K., Cao Y., Wang X., Qiu Y., Su M., *et al*. 2013. 'Potential metabolite markers of schizophrenia', *Mol Psychiatry*, **18**: 67-78.

- Young S. N. 2007. 'How to increase serotonin in the human brain without drugs', *J Psychiatry Neurosci*, **32**: 394-399.

- Yu H., Dickson E. J., Jung S. R., Koh D. S., and Hille B. 2016. 'High membrane permeability for melatonin', *J Gen Physiol*, **147**: 63-76.

- Yurteri N., and Sahin I. E. 2020. 'Decreased serum levels of total and high molecular weight adiponectin in treatment-naive children with ADHD', *Anadolu Psikiyatri Dergisi-Anatolian Journal of Psychiatry*, **21**: 633-640.

- Zametkin A. J., Karoum F., Rapoport J. L., Brown G. L., and Wyatt R. J. 1984. 'Phenylethylamine excretion in attention deficit disorder', *J Am Acad Child Psychiatry*, **23**: 310-314.

- Zametkin A. J., Nordahl T. E., Gross M., King A. C., Semple W. E., Rumsey J., Hamburger S., and Cohen R. M. 1990. 'Cerebral glucose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset', *N Engl J Med*, **323**: 1361-1366.

- Zepf F. D., Stadler C., Demisch L., Schmitt M., Landgraf M., and Poustka F. 2008. 'Serotonergic functioning and trait-impulsivity in attention-deficit/hyperactivity-disordered boys (ADHD): influence of rapid tryptophan depletion', *Hum Psychopharmacol*, **23**: 43-51.

Camille DUPUY

Biomarqueurs du TDAH : Corrélations Métabolomiques et Neurocognitives

Résumé

Le Trouble Déficit d'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) est un trouble de cause mal connue. Ce trouble est caractérisé par l'inattention, l'hyperactivité et l'impulsivité. A ce jour, le diagnostic se fait uniquement sur la base de symptômes cliniques. Il n'existe aucun marqueur biologique. Ce travail s'inscrit dans la mise en évidence d'altérations métaboliques dans un modèle de TDAH chez le rat ainsi que dans la recherche de biomarqueurs chez des patients afin d'apporter une aide au diagnostic. La technologie appelée métabolomique permet d'identifier de petites molécules présentes dans les matrices biologiques. La première partie de ce travail a pour objectif de mieux caractériser les modifications cérébrales retrouvées dans le modèle animal de TDAH. Ces résultats permettent de mieux comprendre les perturbations physiologiques. La deuxième partie de ce travail consiste à identifier des marqueurs sanguins et urinaires spécifiques chez des patients atteints de TDAH.

Mots clés : TDAH - Métabolomique - Biomarqueurs

Résumé en anglais

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a developmental disorder which cause remain unknown. This disorder is characterized by inattention, hyperactivity and impulsivity. To date, the diagnosis is based on clinical symptoms and there is no biological marker for ADHD. This work aims to better characterized metabolic alteration in a rat model of ADHD as well as the search for clinical biomarkers to improve the diagnosis. A recent technology named metabolomics can identify small molecules which are present in different biological matrices.

The first part of this work aims to better characterize the brain modifications found in the animal model of ADHD. These results provide a better understanding of ADHD mechanisms. The second part of this work consists in the identification of specific ADHD markers in blood and urine which could be used to optimize the diagnosis in ADHD patients.

Key words : ADHD - Metabolomics - Biomarkers